



## AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact : [ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr](mailto:ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr)

## LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10

[http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg\\_droi.php](http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php)

<http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm>

Université de Metz

U.P.R.E.S. – E.B.S.E.

Centre de Recherches Ecologiques

U.F.R. Sci. F.A.

Equipe d'Ecotoxicologie

## THESE

Présentée à l'Université de Metz en vue de l'obtention du grade de :

### DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE METZ

Mention : Sciences de la vie

Spécialité : Ecotoxicologie

par

**Corinne FAVREL**

Titre

BIBLIOTHEQUE UNIVERSITAIRE - METZ	
N° inv.	19980745
Cote	S/M3 98/36
Loc	Magasin

## **Ecophysiologie de la larve de *Dinocras cephalotes* (Plécoptère, Perlidé) exposée à un milieu acidifié (pH acide, faible minéralisation et forte concentration en aluminium).**

Soutenue le 10 Juin 1998 devant la commission d'examen :

Jean Claude PIHAN	Professeur à l'Université de Metz	Directeur de Thèse
Lucien GOMOT	Professeur à l'Université de BESANCON	Rapporteur
Michel SARTORI	Docteur en Sciences, Muséum de Zoologie, Lausanne	Rapporteur
Paule VASSEUR	Professeur à l'Université de Metz	Examineur
Peter LANDOLT	Docteur en Sciences, Institut de Zoologie, Fribourg	Examineur

# SOMMAIRE

Liste des tableaux, figures, photos et planches	9
Glossaire d'histologie	16

## INTRODUCTION GENERALE

17

## CHAPITRE I. : SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

<b>I.1. L'osmorégulation chez les insectes aquatiques</b>	21
I.1.1. Introduction : les problèmes de régulation ionique chez les organismes aquatiques	21
I.1.2. Composition du milieu intérieur : principales caractéristiques physico-chimiques de l'hémolymphe	22
I.1.2.1. Volume	22
I.1.2.2. Pression osmotique	22
I.1.2.3. pH	23
I.1.2.4. Effecteurs osmolaires	24
I.1.2.4.1. Cations inorganiques	25
I.1.2.4.2. Anions inorganiques et balance ionique	25
I.1.2.5. Constituants azotés non protéiques	26
I.1.2.6. Acides aminés libres	26
I.1.2.7. Protéines	26
I.1.3. Excrétion et réabsorption	27
I.1.3.1. Les organes excréteurs	27
I.1.3.2. Fonctions des tubes de Malpighi et de la partie postérieure du tube digestif	28
I.1.3.3. Excrétion	29
I.1.3.3.1. Excrétion azotée	30
I.1.3.3.2. Excrétion des molécules organiques ingérées	30
I.1.3.4. Régulation de l'eau	30
I.1.3.5. Réabsorption	30
I.1.4. Les différents mécanismes d'osmorégulation	31
I.1.4.1. Perméabilité tégumentaire	32
I.1.4.2. Excrétion de l'eau	32
I.1.4.3. Prélèvement d'ions	32
I.1.4.3.1. Au niveau rectal	32
I.1.4.3.2. A partir du milieu extérieur	32
I.1.4.3.2.1. Cellules à chlorures	34

I.1.4.3.2.2. Epithélium à chlorures	34
I.1.4.3.2.3. Papilles anales	35
I.1.5. Respiration des insectes aquatiques	35
I.1.5.1. Physiologie de la respiration des insectes aquatiques	35
I.1.5.1.1. A partir de l'atmosphère ou des plantes aquatiques	36
I.1.5.1.2. A partir de l'oxygène dissous dans l'eau	36
I.1.5.1.2.1. Respiration cutanée	36
I.1.5.1.2.2. Respiration branchiale	37
I.1.5.2. Fonctions de la respiration	38
I.1.5.2.1. Production d'énergie	38
I.1.5.2.2. Equilibre acide - base	39
I.1.5.3. Effets des toxiques sur la respiration	39
<b>I.2. L'acidification des eaux de surface</b>	<b>41</b>
I.2.1. Problématique de l'acidification	41
I.2.1.1. Les causes	41
I.2.1.1.1. Emission des polluants précurseurs	42
I.2.1.1.2. Transport des polluants et formation des "pluies acides"	44
I.2.1.1.3. Les différents types de dépôt	46
I.2.1.2. Effets sur les écosystèmes aquatiques	47
I.2.1.2.1. Influence du sol	47
I.2.1.2.2. Caractéristiques des eaux acidifiées	48
I.2.1.2.3. Effets sur la biocénose	53
I.2.1.3. Situation dans les Vosges	57
I.2.2. Les stratégies pour le rétablissement des eaux de surface acidifiées	58
I.2.2.1. Lutte contre les causes de l'acidification	58
I.2.2.1.1. Réduction des émissions	58
I.2.2.1.2. Notion de charge critique	60
I.2.2.2. Lutte contre les effets de l'acidification	61
I.2.2.2.1. Les différents types d'amendement	61
I.2.2.2.2. Les différentes stratégies d'application	62
I.2.2.2.3. Les limites du traitement : la réacidification	63
I.2.2.3. Effets des différentes stratégies sur la physico-chimie des eaux de surface	64
I.2.2.4. Effets de la récupération physico-chimique des eaux de surface sur la biocénose	66
I.2.2.4.1. Phytoplancton	66
I.2.2.4.2. Zooplancton	66

I.2.2.4.3. Macroinvertébrés	67
I.2.2.4.4. Poissons	68
<b>I.3. Présentation de <i>Dinocras cephalotes</i> (Curtis, 1827)</b>	69
I.3.1. Systématique	69
I.3.2. Morphologie	69
I.3.3. Biologie	71
I.3.3.1. Répartition géographique	71
I.3.3.2. Biotope et biocénose	71
I.3.3.3. Cycle de développement	74
I.3.3.4. Grandes fonctions	75
1.3.3.4.1. Nutrition	75
1.3.3.4.2. Respiration	75
1.3.3.4.3. Excrétion	76
1.3.3.4.4. Osmorégulation	76

## **CHAPITRE II. : MATERIELS ET METHODES**

<b>II.1. Les insectes</b>	77
II.1.1. Choix de l'espèce	77
II.1.2. Collecte et sélection des larves	77
<b>II.2. Dispositifs expérimentaux</b>	78
II.2.1. Expérimentation <i>in situ</i>	78
II.2.1.1. Choix des sites	78
II.2.1.2. Unités expérimentales	80
II.2.2. Expérimentation en laboratoire	81
II.2.2.1. Acclimatation des larves	81
II.2.2.2. La salle	81
II.2.2.3. Les unités expérimentales	81
II.2.2.4. Entretien des larves pendant l'expérience	82
<b>II.3. Physico-chimie des milieux en laboratoire</b>	83
II.3.1. pH	83
II.3.2. Minéralisation	83

II.3.3. Concentrations en aluminium total	85
II.3.4. Codification des différents milieux	86
<b>II.4. Suivi de la physico-chimie</b>	<b>87</b>
II.4.1. <i>In situ</i>	87
II.4.1.1. Echantillonnage	87
II.4.1.2. Mesures réalisées <i>in situ</i>	87
II.4.2. En laboratoire	87
II.4.2.1. Préparation des différents milieux	87
II.4.2.2. Renouvellement des milieux	88
II.4.2.3. Suivi de la physico-chimie	88
<b>II.5. Techniques analytiques pour la physico-chimie des milieux <i>in situ</i> et en laboratoire</b>	<b>88</b>
II.5.1. pH	88
II.5.2. Conductivité	89
II.5.3. Minéralisation globale	89
II.5.4. Dosage des cations et des anions	89
II.5.5. Dosage de l'aluminium total	89
II.5.6. Alcalinité	89
<b>II.6. Techniques et analyses réalisées sur les larves de <i>Dinocras cephalotes</i></b>	<b>90</b>
II.6.1. Evaluation de la mortalité	90
II.6.2. Pourcentage de poids sec par rapport au poids frais	90
II.6.3. Prélèvement de l'hémolymphe	90
II.6.4. Dosage des cations et des chlorures de l'hémolymphe	91
II.6.5. Dosage des cations de l'organisme entier après minéralisation	92
II.6.6. Dosage des protéines totales de l'hémolymphe	93
II.6.6.1. Principe	93
II.6.6.2. Expression des résultats	93
II.6.7. Respirométrie	93
II.6.7.1. Principe	94
II.6.7.2. Dispositif expérimental	94
II.6.7.3. Protocole	94
II.6.7.4. Expression des résultats	94
II.6.8. Histologie	95
II.6.8.1. Microscopie optique	95

II.6.8.2. Microscopie électronique	96
<b>II.7. Traitements statistiques</b>	96
<b>CHAPITRE III : MISE EN EVIDENCE DES CONSEQUENCES DE L'ACIDIFICATION D'UN COURS D'EAU SUR UN INSECTE SENSIBLE, <i>DINOCRAS CEPHALOTES</i>. ETUDE <i>IN SITU</i></b>	
<b>III.1. Introduction</b>	97
<b>III.2. Protocole expérimental</b>	98
<b>III.3. Résultats - Discussion</b>	99
III.3.1. Caractéristiques physico-chimiques de la Plaine et du Rouge-Rupt	99
III.3.2. Effets des différents milieux sur les larves	100
III.3.2.1. Mortalité	100
III.3.2.2. Concentrations en chlorures et en sodium dans l'hémolymphe des larves des deux sites	102
<b>III.4. Conclusions</b>	102
<b>CHAPITRE IV. : PERTURBATIONS PHYSIOLOGIQUES ET HISTOPATHOLOGIE DES LARVES DE <i>DINOCRAS CEPHALOTES</i> EXPOSEES A UN MILIEU ACIDIFIE EN LABORATOIRE</b>	
<b>IV.1. Introduction</b>	103
<b>IV.2. Protocole expérimental</b>	104
IV.2.1. Milieux expérimentaux	104
IV.2.2. Protocole de prélèvement	104
<b>IV.3. Résultats</b>	106
IV.3.1. Caractéristiques des milieux d'exposition	106
IV.3.2. Mortalité et mue observées pendant les huit jours d'expérience	107
IV.3.3. Observation comportementale des larves de <i>Dinocras cephalotes</i> durant l'expérience	108

IV.3.4. Régulation ionique des larves soumises aux milieux contrôle et acidifié	108
IV.3.4.1. Régulation ionique au niveau de l'hémolymphe	108
IV.3.4.1.1. Concentrations en protéines totales	108
IV.3.4.1.2. Concentrations en électrolytes	109
IV.3.4.2. Régulation ionique au niveau des concentrations en électrolytes dans l'organisme entier	112
IV.3.4.3. Discussion	116
IV.3.5. Conséquences de l'exposition de <i>Dinocras cephalotes</i> à un milieu acidifié sur le pourcentage de poids sec par rapport au poids frais	120
IV.3.5.1. Résultats	120
IV.3.5.2. Discussion	121
IV.3.6. Conséquences de l'exposition de <i>Dinocras cephalotes</i> à un milieu acidifié sur la respiration	122
IV.3.6.1. Résultats	122
IV.3.6.2. Discussion	124
IV.3.7. Histopathologie des larves de <i>Dinocras cephalotes</i>	125
IV.3.7.1. Anatomie de <i>Dinocras cephalotes</i>	125
IV.3.7.2. Effets observés sur l'hémolymphe (Planches I et II)	129
IV.3.7.2.1. Résultats	129
IV.3.7.2.2. Discussion	134
IV.3.7.3. Effets observés sur les tubes de Malpighi (Planches III à VI)	135
IV.3.7.3.1. Résultats	135
IV.3.7.3.2. Discussion	146
IV.3.7.4. Effets observés sur les trachéobranchies (Planches VII à IX)	148
IV.3.7.4.1. Résultats	148
IV.3.7.4.2. Discussion	158

**IV.4. Conclusion partielle : Synthèse du chapitre IV** 159

**CHAPITRE V. : EFFETS RESPECTIFS OU COMBINES DU pH, DE LA MINERALISATION ET DE LA CONCENTRATION EN ALUMINIUM D'UN MILIEU SUR LES CONCENTRATIONS IONIQUES DE L'HEMOLYMPHE DE *DINOCRAS CEPHALOTES***

**V.1. Introduction** 163

**V.2. Protocole expérimental** 164



V.2.1. Milieux expérimentaux	164
V.2.2. Protocole de prélèvement	164
V.2.3. Traitements statistiques	165
<b>V.3. Résultats</b>	165
V.3.1. Milieux d'exposition	165
V.3.2. Effets sur <i>Dinocras cephalotes</i>	167
V.3.2.1. Mue	167
V.3.2.2. Mortalité	167
V.3.2.3. Effets des différents facteurs et de leurs combinaisons sur les concentrations en chlorures et en sodium dans l'hémolymphe	168
V.3.2.3.1. Effets de l'exposition au milieu contrôle pendant 21 jours	169
V.3.2.3.2. Effets de l'aluminium	169
V.3.2.3.3. Effets de l'aluminium et de la faible minéralisation combinés dans un même milieu	170
V.3.2.3.4. Effets de la faible minéralisation d'un milieu	171
V.3.2.3.5. Effets dus aux conditions observables <i>in situ</i>	172
V.3.2.3.6. Effets du pH acide d'un milieu	173
V.3.2.3.7. Effets de la combinaison pH acide et faible minéralisation dans un milieu	175
V.3.2.3.8. Effets de la combinaison pH acide et forte concentration en aluminium dans un milieu	176
<b>V.4. Conclusion et Discussion</b>	178

## CHAPITRE VI. : PERSPECTIVES CURATIVES

<b>VI.1. Mise en évidence de la capacité de récupération des larves de <i>Dinocras cephalotes</i> soumises préalablement à un stress acide</b>	193
VI.1.1. Objectifs	193
VI.1.2. Protocole expérimental	193
VI.1.2.1. Milieux expérimentaux	194
VI.1.2.2. Protocole de prélèvement	194
VI.1.3. Résultats	195
VI.1.3.1. Milieux d'exposition	195
VI.1.3.2. Mortalité	196
VI.1.3.3. Concentrations en chlorures et en sodium dans l'hémolymphe	196

<b>VI.2. Evaluation de l'impact des cations calcium, sodium, potassium et magnésium sur la régulation ionique des larves exposées à un milieu acidifié</b>	200
VI.2.1. Objectifs	200
VI.2.2. Protocole expérimental	200
VI.2.2.1. Milieux expérimentaux	200
VI.2.2.2. Protocole de prélèvement	202
VI.2.3. Résultats	202
VI.2.3.1. Milieux d'exposition	202
VI.2.3.2. Effets sur les larves	204
VI.2.3.2.1. Mortalité	204
VI.2.3.2.2. Concentrations en chlorures et en sodium dans l'hémolymphe	204
<b>VI.3. Effets des carbonates de sodium et de calcium sur des larves de <i>Dinocras cephalotes</i></b>	208
VI.3.1. Objectifs	208
VI.3.2. Protocole expérimental	209
VI.3.2.1. Milieux expérimentaux	209
VI.3.2.2. Protocole de prélèvement	210
VI.3.3. Résultats	211
VI.3.3.1. Milieux d'exposition	211
VI.3.3.2. Effets sur les larves	214
VI.3.3.2.1. Mortalité	214
VI.3.3.2.2. Concentrations en chlorures et en sodium dans l'hémolymphe	215
<b>VI.4. Discussion</b>	218
<b>CHAPITRE VII. : SYNTHESE GENERALE</b>	227
<b>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES</b>	233

## ANNEXES

# LISTE DES TABLEAUX

## Chapitre I. : Synthèse bibliographique

- Tableau I : pH de l'hémolymphe des insectes dans des milieux de pH différents suite à une acclimatation de 72 h minimum ; n.p. : non précisée (Cooper, 1994).
- Tableau II : Composition en cations dans l'hémolymphe d'insectes exoptérygotes (Sutcliffe, 1962).
- Tableau III : Sites d'absorption ionique chez les insectes aquatiques (Komnick, 1977).
- Tableau IV : Mécanismes respiratoires rencontrés chez les insectes aquatiques (l, larve ; n, nymphe ; a, adulte ; \* : les insectes cités ci-contre dépendent de ce mode respiratoire exclusivement) (Ward, 1992).
- Tableau V : Quantité de soufre émise dans différents pays d'Europe en 1965 (Oden, 1976).
- Tableau VI : Quantité émise des principaux précurseurs d'acidité en Grande-Bretagne et leur contribution à l'acidité potentielle (Harrison, 1987).
- Tableau VII : Secteurs émettant des composés précurseurs d'acidité (en équivalents d'acidification selon le service environnemental néerlandais) et leurs contributions respectives (Evers *et al.*, 1995).
- Tableau VIII : Caractéristiques physico-chimiques de divers lacs et ruisseaux situés dans des régions concernées par les problèmes d'acidification.
- Tableau IX : Données sur la qualité de l'eau du lac Whitepine (Canada) pendant les années 1980 - 1988 (Gunn et Keller, 1990). Les moyennes annuelles sont calculées à partir de données mensuelles obtenues par des échantillons collectés dans l'épi- et le métaalimnion.

## Chapitre II. : Matériel et méthodes

- Tableau X : Concentrations en cations des deux types de solutions finales.
- Tableau XI : Liste des différents sels utilisés pour composer les solutions mères et quantité à ajouter à l'eau nanopure (pour un litre de solution).
- Tableau XII : Facteur permettant d'estimer la minéralisation d'un milieu à partir des mesures de conductivité (Rodier, 1996).
- Tableau XIII : Liste des différentes phases et des produits employés pour réaliser les coupes à observer en microscopie électronique.

## Chapitre III. : Mise en évidence des conséquences de l'acidification d'un cours d'eau sur un insecte sensible, *Dinocras cephalotes* : étude *in situ*.

- Tableau XIV : Physico-chimie des deux cours d'eau vosgiens analysés entre le 23 juin et le 3 juillet 1994 (moyenne  $\pm$  écart-type ; n = nombre de mesures effectuées).
- Tableau XV : pH minimum, moyen et maximum mesurés dans le Rouge-Rupt et ses affluents de fin mai 91 à début 92 (Guérol, 1992).

## Chapitre IV. : Perturbations physiologiques et histopathologie des larves de *Dinocras cephalotes* exposées à un milieu acidifié en laboratoire.

- Tableau XVI : Caractéristiques nominales pour deux milieux expérimentaux : milieu contrôle (6.6M) et milieu acidifié (4.6PMAI).
- Tableau XVII : Nombre de larves utilisées pour chaque mesure de paramètres physiologiques.
- Tableau XVIII : Caractéristiques physico-chimiques des milieux (moyenne  $\pm$  écart-type ; coefficient de variation de chaque paramètre (%)) ; n = nombre de mesures. Test t de Student (n.s. : différence non significative ; \* : différence significative à  $p < 0.05$ ).
- Tableau XIX : Résultats des concentrations ( $\mu\text{g} \cdot \mu\text{l}^{-1}$ ) en protéines totales mesurées par individu avant et après exposition aux milieux contrôle (6.6M) et acidifié (4.6PMAI) pendant huit jours (C.v. : coefficient de variation ; %/\* : les lots ayant le même signe mentionné vers la valeur des moyennes ne sont pas significativement différents, tandis que celles annotées de signes différents le sont hautement au seuil de 0.01).

- Tableau XX : Coefficients de variation et rapports des concentrations moyennes en cations mesurées dans l'hémolymphe des larves témoins (T) et des larves exposées pendant huit jours aux milieux contrôle (C) et acidifié (A). Test t de Student ; ns : non significatif, \* :  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ .
- Tableau XXI : Coefficients de variation et rapports des concentrations en cations ( $\mu\text{moles.g}^{-1}$  PF (poids frais)) déterminées dans l'organisme des larves témoins (T) et des larves exposées pendant huit jours aux milieux contrôle (C) et acidifié (A). Test t de Student ; ns : non significatif, \* :  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ .
- Tableau XXII : Coefficients de variation et rapports des concentrations en cations ( $\mu\text{moles.g}^{-1}$  PS (poids sec)) déterminées dans l'organisme des larves témoins (T) et des larves exposées pendant huit jours aux milieux contrôle (C) et acidifié (A). Test t de Student ; ns : non significatif, \* :  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ .
- Tableau XXIII : Pourcentage moyen de poids sec par rapport au poids frais pour des lots de larves avant (témoin) et après exposition de huit jours aux milieux contrôle et acidifié (C.V. : Coefficient de variation ; n : nombre de larves).
- Tableau XXIV : Consommation en oxygène exprimée par rapport au poids frais ou au poids sec pour chaque série de larves (S) des lots témoin et exposés aux milieux contrôle et acidifié pendant huit jours. Chaque série est composée de deux larves dont les mesures de poids frais (PF) et de poids sec (PS) sont réunies en une unique valeur.

#### Chapitre V : Effets respectifs ou combinés du pH, de la minéralisation et de la concentration en aluminium d'un milieu sur les concentrations ioniques de l'hémolymphe de *Dinocras cephalotes*

- Tableau XXV : Liste des huit combinaisons réalisées avec les trois paramètres : composition nominale et code correspondant.
- Tableau XXVI : Composition physico-chimique moyenne mesurée dans les différents milieux pendant les 21 jours d'expérience (moyenne  $\pm$  écart-type ; n = nombre de mesures).
- Tableau XXVII : Effets des paramètres testés (pH acide, faible minéralisation, concentration en aluminium élevée) seuls ou conjugués sur la mortalité et les concentrations en chlorures et sodium dans l'hémolymphe des larves de *Dinocras cephalotes*.

#### Chapitre VI. : Perspectives curatives

- Tableau XXVIII : Concentrations nominales pour les principales caractéristiques des deux milieux expérimentaux : contrôle (6.6M) et acidifié (4.6PMAI).
- Tableau XXIX : Résultats des contrôles physico-chimiques (concentration moyenne  $\pm$  écart-type) réalisés dans les deux milieux d'exposition, 6.6M et 4.6PMAI (n = nombre de mesures).
- Tableau XXX : Facteur de dilution moyen calculé pour chaque série de prélèvement d'hémolymphe des larves témoins ( $J_0$ ), exposées au milieu acidifié pendant huit jours (4.6PMAI /  $J_8$ ), puis transférées dans le milieu contrôle (6.6M /  $J_{16}$ ,  $J_{24}$ ,  $J_{32}$ ) (moyenne  $\pm$  écart-type ; n = nombre d'individus échantillonnés).
- Tableau XXXI : Composition nominale en cations pour les dix milieux utilisés au cours de l'expérience.
- Tableau XXXII : Liste des différents sels ajoutés dans chaque milieu pour obtenir les concentrations en cations.
- Tableau XXXIII : Caractéristiques physico-chimiques mesurées pendant les huit jours d'expérience dans les dix milieux expérimentaux différents (moyenne  $\pm$  écart-type ; n = nombre de mesures).
- Tableau XXXIV : Caractéristiques attendues pour les principaux paramètres des quatre milieux utilisés pendant l'expérience.
- Tableau XXXV : Valeurs moyennes ( $\pm$  écart-type) des paramètres physico-chimiques mesurés pour les quatre milieux d'exposition pendant les seize jours d'expérience (n = nombre de mesures ; min. = minimum ; max. = maximum).

Tableau XXXVI : Mortalité dénombrée dans les différents milieux d'exposition pendant les seize jours d'expérience (n = nombre de morts ; n\* = nombre de larves stressées dans le milieu acidifié mortes après le transfert dans les milieux Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> et CaCO<sub>3</sub>).

Tableau XXXVII : Facteurs de dilution (Fd) et concentrations en chlorures (Cl<sup>-</sup>) et en sodium (Na<sup>+</sup>) dans l'hémolymphe de chaque larve préalablement stressée, puis transférée dans des milieux initialement acidifiés modifiés par l'ajout de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> ou CaCO<sub>3</sub> pendant huit jours (16<sup>ème</sup> jour d'expérience) (Pl. = Identification de la larve de Plécoptère).

## LISTE DES FIGURES

### Chapitre I. : Synthèse bibliographique

- Figure 1 : Effets osmotiques des différents composants représentés en pourcentage de la concentration osmolaire totale dans l'hémolymphe des insectes (Sutcliffe, 1963). Chaque bloc est divisé en deux ; chaque section verticale représentant chacune 50 % de la concentration osmolaire totale.
- Figure 2 : Appareil excréteur de *Rhodnius* (dans Wigglesworth, 1965).  
a : Vue générale.  
b : Détail d'un tube (coupe longitudinale) à la jonction des segments proximaux et distaux.
- Figure 3 : Représentation de l'excrétion et de l'osmorégulation comme un procédé en deux temps (Hevert, 1985).  
a : Situation anatomique.  
b : Relations entre les différents compartiments.
- Figure 4 : Régulation hyperosmotique chez les insectes d'eau douce. Les flèches indiquent les tendances principales pour l'eau et les ions. Ce schéma représente une larve de moustique avec une papille anale développée (Komnick, 1977).
- Figure 5 : Exemples de localisation des différents sites d'absorption ionique des insectes aquatiques.  
a : cellules à chlorures (Ephéméroptères ; Baetidés) ; b : épithélium à chlorures abdominal (Trichoptères ; Limnephilidés) ; c : épithélium à chlorures anal (Diptères ; Tabanidés) ; d : épithélium à chlorures rectal (Odonates ; Coenagrionidés) ; e : papille préanale (Diptères ; Simulidés) (Komnick, 1977).
- Figure 6 : Appareil respiratoire des insectes aquatiques : branchies sanguines (a et b) et trachéo-branchies (c et d). a : larve de Chironome (Diptères ; Nématocères), b : larve de Simulie (Diptères ; Nématocères), c : larve d'*Ecdyonurus* (Ephéméroptères) : localisation abdominale, d : larve de Zygoptère (Odonates) : localisation caudale.
- Figure 7 : Les différentes phases intervenant dans le processus d'acidification des eaux de surface (Howells, 1990).
- Figure 8 : Déplacement dit en "looping" sous la trajectoire du vent (Oden, 1976).
- Figure 9 : Cycle de la réaction transformant les gaz en acides (Mohnen, 1988).
- Figure 10 : Comparaison entre des analyses de pluie et de brouillard (1984) dans les environs de Zurich (Stumm *et al.*, 1987).
- Figure 11 : Réactions se produisant lors des entrées d'acide sulfurique dans les sols (Mohnen, 1988).
- Figure 12 : Composition relative moyenne de trois groupes d'eau à faible force ionique avec différents pH (1 : pH ≤ 4,5 ; 2 : 4,5 < pH < 7,0 ; 3 : pH ≥ 7,0) (Leuven *et al.*, 1992).
- Figure 13 : Les différentes formes d'hydroxydes d'aluminium et leur distribution relative en fonction du pH et de la température (Lydersen, 1990).
- Figure 14 : a : Carte de l'état d'acidification des cours d'eau vosgiens. b : Carte du changement de l'alcalinité dans les cours d'eau vosgiens (Probst *et al.*, 1995).
- Figure 15 : Emissions de SO<sub>2</sub> dans la région de Sudbury pendant la période 1960 - 1988 (Keller, 1992b).
- Figure 16 : Carte des charges critiques d'acidité dans les eaux des ruisseaux vosgiens et zone de sensibilité correspondante (Party *et al.*, 1995).

- Figure 17 : Schéma d'un doseur de carbonate de calcium en poudre automatique (Hall *et al.*, 1994).
- Figure 18 : Valeurs de pH, alcalinité et concentrations en sodium mesurées avant et après traitement avec du carbonate de sodium dans le lac Lilla Galtsjön (Suède) (Lindmark, 1993).
- Figure 19 : Larve de *Dinocras cephalotes* (grossissement x 4) (Puig, 1984).
- Figure 20 : a : Diversité spécifique des Perlidés d'Europe ; b : Distribution de *Dinocras spp.* et les températures qui déterminent le déclenchement du développement des œufs (Zwick, 1996b).

## Chapitre II : Matériel et méthodes

- Figure 21 : Localisation des deux sites d'expérimentation dans le massif vosgien.

## Chapitre III. Mise en évidence des conséquences de l'acidification d'un cours d'eau sur un insecte sensible, *Dinocras cephalotes* : étude *in situ*.

- Figure 22 : Protocole de prélèvement des échantillons d'eau et des larves sur les deux cours d'eau pendant les onze jours d'expérience. (\* : prélèvement d'eau ; p : prélèvement d'hémolymphe).
- Figure 23 : Concentrations moyennes en chlorures mesurées dans l'hémolymphe des larves exposées à une eau acidifiée (Rouge-Rupt) et non acidifiée (Plaine) pendant 11 jours. Les barres verticales représentent l'écart-type sur la valeur de la moyenne (o/+ : les moyennes ayant le même signe ne sont pas significativement différentes tandis que celles annotées de signes différents le sont hautement au seuil de 0.01).
- Figure 24 : Concentrations moyennes en sodium mesurées dans l'hémolymphe des larves exposées à une eau acidifiée (Rouge-Rupt) et non acidifiée (Plaine) pendant 11 jours. Les barres verticales représentent l'écart-type sur la valeur de la moyenne (o/+ : les moyennes ayant le même signe ne sont pas significativement différentes tandis que celles annotées de signes différents le sont hautement au seuil de 0.01).

## Chapitre IV. : Perturbations physiologiques et histopathologie des larves de *Dinocras cephalotes* exposées à un milieu acidifié en laboratoire.

- Figure 25 : Déroulement de l'expérience au laboratoire.
- Figure 26 : Mortalité cumulée relevée pendant les huit jours d'expérience.
- Figure 27 : Concentrations moyennes (mmoles.l<sup>-1</sup>) en cations dans l'hémolymphe de *D. cephalotes* avant (lot témoin T) et après exposition aux milieux contrôle (C) et acidifié (A) pendant huit jours. Les barres verticales représentent l'écart-type sur la moyenne (n = 7) (o/+ : pour chaque cation, les moyennes ayant le même signe ne sont pas significativement différentes, tandis que celles annotées de signes différents le sont, avec ++ : p < 0.01 et + : p < 0.05).
- Figure 28 : Concentrations moyennes en cations (µmoles.g<sup>-1</sup> PF (poids frais)) dans l'organisme des larves témoins (T) et des larves exposées aux milieux contrôle (C) et acidifié (A) pendant huit jours. Les barres verticales représentent l'écart-type sur la moyenne des mesures (pour chaque élément o/+ : les moyennes ayant le même signe ne sont pas significativement différentes ; celles annotées de signes différents le sont avec : ++ : p < 0.01 et + : p < 0.05).
- Figure 29 : Concentrations moyennes en cations (µmoles.g<sup>-1</sup> PS (poids sec)) dans l'organisme des larves témoins (T) et des larves exposées aux milieux contrôle (C) et acidifié (A) pendant huit jours. Les barres verticales représentent l'écart-type sur la moyenne des mesures (pour chaque élément o/+ : les moyennes ayant le même signe ne sont pas significativement différentes ; celles annotées de signes différents le sont avec : ++ : p < 0.01 et + : p < 0.05).
- Figure 30 : Schéma du système circulatoire de *Dinocras cephalotes*.
- Figure 31 : Schéma des système digestif et excréteur de *Dinocras cephalotes*.
- Figure 32 : Schéma du système nerveux de *Dinocras cephalotes*.
- Figure 33 : Représentation schématique du réseau trachéen de *Dinocras cephalotes*. 1, Tronc trachéen principal latéro - dorsal ; 2, Anastomose trachéenne dorsale ; 3 et 4., Tronc stigmatique (St) non fonctionnel (4) sur connectif transverse (3) ; 5, Tronc trachéen principal latéro ventral ; 6, Branchie ; 7, Trachée viscérale. Exemple de système "Porte" Trachéen" (6+7).

- Figure 34 : Schéma d'une cellule primaire de tube de Malpighi prélevée chez une larve témoin.
- Figure 35 : Schéma d'une cellule primaire de tube de Malpighi prélevée chez une larve exposée huit jours à un milieu acidifié.
- Figure 36 : Schéma d'une "houppes" branchiale.
- Figure 37 : Schéma récapitulatif des modifications histologiques et physiologiques au niveau des trachées de larves de *Dinocras cephalotes* exposées à un milieu acidifié.
- Figure 38 : Résumé des différents phénomènes histologiques et physiologiques observés dans l'organisme d'une larve de *Dinocras cephalotes* lors d'une exposition à un milieu acidifié.

## **Chapitre V : Effets respectifs ou combinés du pH, de la minéralisation et de la concentration en aluminium d'un milieu sur les concentrations ioniques de l'hémolymphe de *Dinocras cephalotes***

- Figure 39 : Déroulement de l'expérience.
- Figure 40 : Mortalité cumulée observée dans les différents milieux d'exposition pendant les 21 jours d'expérience.
- Figure 41 : Concentrations en chlorures (a) et en sodium (b) mesurées à J<sub>0</sub>, J<sub>7</sub>, J<sub>14</sub> et J<sub>21</sub> dans l'hémolymphe des larves exposées aux milieux contrôle (6.6M) et enrichi en aluminium (6.6MAI). Les barres verticales représentent l'écart-type sur la moyenne des mesures.
- Figure 42 : Concentrations en chlorures (a) et en sodium (b) mesurées à J<sub>0</sub>, J<sub>7</sub>, J<sub>14</sub> et J<sub>21</sub> dans l'hémolymphe des larves exposées aux milieux faiblement minéralisés sans aluminium (6.6PM) et avec aluminium (6.6PMAI). Les barres verticales représentent l'écart-type sur la moyenne des mesures.
- Figure 43 : Concentrations en chlorures (a) et en sodium (b) mesurées à J<sub>0</sub>, J<sub>7</sub>, J<sub>14</sub> et J<sub>21</sub> dans l'hémolymphe des larves exposées aux milieux contrôle (6.6M) et faiblement minéralisé (6.6PM). Les barres verticales représentent l'écart-type sur la moyenne des mesures.
- Figure 44 : Concentrations en chlorures (a) et en sodium (b) mesurées à J<sub>0</sub>, J<sub>7</sub>, J<sub>14</sub> et J<sub>21</sub> dans l'hémolymphe des larves exposées aux milieux faiblement minéralisés riches en aluminium (6.6PMAI) et acidifié (4.6PMAI). Les barres verticales représentent l'écart-type sur la moyenne des mesures.
- Figure 45 : Concentrations en chlorures (a) et en sodium (b) mesurées à J<sub>0</sub>, J<sub>7</sub>, J<sub>14</sub> et J<sub>21</sub> dans l'hémolymphe des larves exposées aux milieux contrôle (6.6M) et acide (4.6M). Les barres verticales représentent l'écart-type sur la moyenne des mesures.
- Figure 46 : Concentrations en chlorures (a) et en sodium (b) mesurées à J<sub>0</sub>, J<sub>7</sub>, J<sub>14</sub> et J<sub>21</sub> dans l'hémolymphe des larves exposées aux milieux acide minéralisé (4.6M) et acide faiblement minéralisé (4.6PM). Les barres verticales représentent l'écart-type sur la moyenne des mesures.
- Figure 47 : Concentrations en chlorures (a) et en sodium (b) mesurées à J<sub>0</sub>, J<sub>7</sub>, J<sub>14</sub> et J<sub>21</sub> dans l'hémolymphe des larves exposées aux milieux acides sans (4.6M) et avec aluminium (4.6MAI). Les barres verticales représentent l'écart-type sur la moyenne des mesures.
- Figure 48 : Pourcentage des pertes ou des gains en chlorures mesuré dans l'hémolymphe des larves exposées aux différents milieux pendant une durée de 7, 14 et 21 jours (\* : pas de mesures).
- Figure 49 : Pourcentage des pertes ou des gains en sodium mesuré dans l'hémolymphe des larves exposées aux différents milieux pendant une durée de 7, 14 et 21 jours (\* : pas de mesures).

### **Chapitre VI.1. : Perspectives curatives.**

- Figure 50 : Déroulement de l'expérience au laboratoire.
- Figure 51 : Mortalité relevée pendant les 32 jours d'expérience.
- Figure 52 : Concentrations moyennes en chlorures (a) et en sodium (b) dans l'hémolymphe des larves avant (J<sub>0</sub>), et après exposition au milieu acidifié (4.6PMAI / J<sub>8</sub>) et transfert dans le milieu contrôle (6.6M / J<sub>16</sub>, J<sub>24</sub>, J<sub>32</sub>). Les traits noirs représentent l'évolution des concentrations moyennes, les petits carrés les valeurs individuelles.
- Figure 53 : Protocole suivi pendant l'expérience.

- Figure 54 : Mortalité cumulée dans les dix milieux d'exposition en fonction de la durée d'expérience.
- Figure 55 : Concentrations en chlorures et en sodium mesurées dans l'hémolymphe des larves des lots témoin ( $J_0$ ) et après huit jours d'exposition dans les dix différents milieux. Les barres verticales représentent l'écart-type sur la moyenne des mesures.
- Figure 56 : Protocole suivi pendant les 16 jours d'expérience.
- Figure 57 : Evolution du pH dans les milieux  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  et  $\text{CaCO}_3$  pendant 16 jours de l'expérience.
- Figure 58 : Evolution de la conductivité dans les milieux  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  et  $\text{CaCO}_3$  pendant 16 jours de l'expérience.
- Figure 59 : Evolution des concentrations en sodium et en calcium dans les milieux  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  et  $\text{CaCO}_3$  pendant 16 jours de l'expérience.
- Figure 60 : Concentrations en chlorures mesurées dans l'hémolymphe les différents lots de larves. Les barres verticales représentent l'écart-type sur la moyenne des mesures.
- Figure 61 : Concentrations en sodium mesurées dans l'hémolymphe les différents lots de larves. Les barres verticales représentent l'écart-type sur la moyenne des mesures.

## LISTE DES PHOTOS

- Photo 1 : Dispositif expérimental *in situ*.
- Photo 2 : Dispositif expérimental en laboratoire.
- Photo 3 : Prélèvement de l'hémolymphe d'une larve de *Dinocras cephalotes*.

## LISTE DES PLANCHES

- PLANCHE I : Mise en évidence de la diminution du volume d'hémolymphe chez des larves de *Dinocras cephalotes* suite à une exposition de huit jours à un milieu acidifié.
- PLANCHE II : Détail de la structure de l'hémolymphe de larves de *Dinocras cephalotes* témoins et après une exposition de huit jours à un milieu acidifié.
- PLANCHE III : Mise en évidence de l'organisation cellulaire des tubes de Malpighi de larves témoins et exposées pendant huit jours à un milieu acidifié par l'observation de coupes en microscopie optique.
- PLANCHE IV : Mise en évidence de l'organisation cellulaire des tubes de Malpighi de larves témoins et exposées pendant huit jours à un milieu acidifié par l'observation de coupes semi-fines.
- PLANCHE V : Mise en évidence de l'ultrastructure des cellules primaires des tubes de Malpighi de larve témoin par l'observation de coupes en microscopie électronique.
- PLANCHE VI : Références du témoin et mise en évidence des modifications dans les cellules primaires des tubes de Malpighi de larves de *Dinocras cephalotes* exposées pendant huit jours à un milieu acidifié.
- PLANCHE VII : Mise en évidence de l'organisation cellulaire des branchies de larves témoin et exposées pendant huit jours à un milieu acidifié par l'observation de coupes en microscopie optique.
- PLANCHE VIII : Mise en évidence de l'organisation cellulaire des branchies de larves témoin et exposées pendant huit jours à un milieu acidifié par l'observation de coupes semi fines.
- PLANCHE IX : Mise en évidence de l'ultrastructure des branchies de larves témoin et exposées pendant huit jours à un milieu acidifié par l'observation en microscopie électronique.



# GLOSSAIRE D'HISTOLOGIE

- ca** corps allate  
**cc** corps cardiaque  
**A** tissus adipeux

## Pour le compartiment hémolympatique

- H** hémolymphe  
**Hc** hémocole  
**He** hémocyte  
**c** coagulum

## Pour les trachéobranches

- Cc** cellule à chlorures  
**Ch** cellule hypodermique  
**Cy** cytoplasme  
**N** noyau  
**Cu** cuticule  
**En** endocuticule  
**Ep** épicuticule  
**Ex** exocuticule  
**T** trachée  
**CT** cellule trachéenne  
**L** lumière  
**N** noyau de cellule trachéenne  
**t** ténidie  
**tc** ténidie plus ou moins collapsée  
**To** Trachéole  
**CTo** cellule trachéolaire  
**LTo** liquide trachéolaire

## Pour les tubes de Malpighi

- Ce** cellule étoilée  
**Cy** cytoplasme  
**N** noyau  
**Cp** cellule primaire  
**Cy** cytoplasme  
**N** noyau  
**I** invagination  
**L** lumière  
**M** mitochondrie  
**Mb** membrane basale  
**Mi** microvillosité  
**S** sphérule  
**V** vacuole

## INTRODUCTION GENERALE

"L'écophysiologie est la science qui étudie l'ensemble des rapports existant entre les êtres vivants et le milieu qui les entoure" (Définition donnée dans "Le vocabulaire d'écologie", Daget et Godron, 1974).

La recherche écophysiologique est conduite au niveau de l'organisme dans son environnement naturel, mais aussi, dans des conditions perturbées, manipulées ou même créées par l'intervention humaine. D'un point de vue méthodologique, l'approche écophysiologique peut et doit être concernée non seulement avec des réponses physiologiques globales aux variations dans un environnement complexe (qui est mieux étudié en conditions naturelles), mais aussi, avec les effets isolés de chacun des facteurs impliqués ainsi qu'avec leurs interactions. Dans ce dernier contexte, les expérimentations en laboratoire et les études conduites en milieu expérimental et manipulé sont les plus appropriées (Block et Vannier, 1992).

L'approche décrite ci-dessus est appliquée dans ce travail dont l'objectif est d'étudier l'écophysiologie d'un insecte exposé à un environnement perturbé. Pour cela, l'organisme choisi est *Dinocras cephalotes* (Plécoptères ; Perlidés) et la perturbation étudiée est l'acidification des cours d'eau, avec comme représentation *in situ*, le cas du massif vosgien. Du point de vue écophysiologique, la question clé est d'identifier les perturbations biochimiques et physiologiques qui contribuent à la disparition de cette espèce des cours d'eau acidifiés tout en déterminant les facteurs physico-chimiques du milieu à l'origine de ces perturbations.

L'acidification des écosystèmes aquatiques est provoquée par les retombées atmosphériques acides qui découlent de l'émission de composés précurseurs d'acidité. Ce type de pollution anthropique a été rapporté, entre autres, aux Etats-Unis, au Canada, en Ecosse, en Suède, en Norvège et en France, particulièrement dans les Vosges.

Au niveau des écosystèmes aquatiques situés dans les régions affectées par les problèmes d'acidification, une détérioration de la qualité de l'eau est observée avec une baisse significative du pH. En plus de cette dernière, des métaux potentiellement toxiques apparaissent dans ces cours d'eau, ainsi qu'un appauvrissement en éléments physiologiquement importants tels que le calcium et le sodium. Les conséquences de ces modifications sont un appauvrissement biologique mis en évidence pour toutes les communautés aquatiques allant du phytoplancton aux poissons (Stokes, 1986 ; Brett, 1989 ; Raddum et Fjellheim, 1984 ; Rask *et al.*, 1995). Ces disparitions peuvent être attribuées à la forte

concentration en protons (Neville, 1985 ; Dalziel *et al.*, 1986), à la toxicité de l'aluminium (Driscoll, 1980 ; Baker et Schofield, 1982) et à la diminution des concentrations en calcium et en sodium (Brown, 1981 ; Wood *et al.*, 1990).

Afin de contrecarrer ces perturbations et de permettre le rétablissement des population animales initiales, deux approches sont employées. L'une s'attaque aux causes mêmes de l'acidification et vise à réduire les émissions des polluants précurseurs d'acidité, tandis que l'autre consiste à restaurer les écosystèmes affectés par l'apport de matériaux neutralisants. Toutefois, afin que ces méthodes curatives soient les plus efficaces, les causes à l'origine de la diminution de la diversité biologique doivent être bien appréhendées.

Dans cet objectif, divers études ont été réalisées, mais elles portent surtout sur les poissons Salmonidés dont l'enjeu économique est indiscutable et sur les écrevisses.

Les insectes ont suscité moins d'intérêt. De plus, la plupart des travaux concernant cette classe sont des constats d'absence ou de présence d'espèces dans les cours d'eau acidifiés. Peu concernent les réponses physiologiques induites par un tel environnement et, de ce fait, les explications de la mortalité observée sont souvent issues des conclusions tirées pour les poissons. Il existe toutefois, des travaux de recherche en laboratoire concernant les perturbations physiologiques des insectes suite à une exposition en milieu acidifié. Malheureusement, les conditions expérimentales ne sont pas toujours très détaillées et les paramètres physico-chimiques testés ne sont pas toujours pertinents avec des données de terrain (pH de 2.3, concentration en aluminium de 30 mg.l<sup>-1</sup>). De plus, les études pour mettre en évidence les effets de l'acidification ne dissocient pas toujours les paramètres caractéristiques de cette perturbation et considèrent ainsi le milieu acidifié dans sa globalité. Dans d'autres cas, elles ne prennent en compte que les paramètres pH et aluminium, sans intégrer la minéralisation, ou alors en réduisant cette dernière à la concentration en calcium. Enfin, il existe presque autant d'études réalisées que d'insectes testés, ainsi que de critères physiologiques mesurés, et cela, avec des conditions d'exposition différentes ne permettant pas de synthèse.

De ce fait, plusieurs points sont apparus essentiels pour réaliser une étude mettant en évidence les perturbations de la physiologie d'un insecte exposé à une eau acidifiée :

- travailler avec des milieux dont les paramètres physico-chimiques testés en laboratoire sont similaires à ceux mesurés sur le terrain, en l'occurrence dans des cours d'eau du massif vosgien acidifié ou non,
- travailler avec une unique espèce d'insecte acido-sensible dont les caractéristiques morphologiques et physiologiques permettent de réaliser la mesure des critères choisis pour l'étude.

La première partie de ce travail (Chapitre III) est réalisée *in situ* et consiste à exposer *Dinocras cephalotes* à un milieu acidifié afin de mettre en évidence les réponses de cette espèce lorsqu'elle est soumise à ce type de perturbations environnementales. Cette expérience a également pour objectif de déterminer si ce Plécoptère présente les conditions requises pour être utilisé au laboratoire dans des conditions d'exposition contrôlées.

Suite à ces conclusions, une approche écophysiologique du problème "réponse de *Dinocras cephalotes* exposé à un milieu acidifié" est réalisée en laboratoire divisant ce travail en trois parties distinctes.

La première (Chapitre IV) étudie les réponses physiologiques fondamentales de l'insecte exposé à un milieu acidifié global reconstitué en laboratoire afin d'expliquer la mortalité provoquée par un tel environnement et de déterminer des critères de stress caractéristiques d'une exposition en milieu acidifié.

Toutefois, les causes à l'origine de ces dérèglements sont encore mal connues, surtout pour les insectes. En effet, un milieu acidifié global réunit un pH acide, une faible minéralisation et une concentration élevée en aluminium. Tous les effets mis en évidence dans la partie précédente sont dus à l'action combinée de ces trois facteurs. Il convient de préciser ici que les expressions qualitatives employées pour qualifier les paramètres physico-chimiques testés dans cette étude sont relatives aux données mesurées dans les cours d'eau s'écoulant sur le massif vosgien. La deuxième partie expérimentale (Chapitre V) a pour objectif de déterminer l'effet spécifique de chacun de ces facteurs, ainsi que leurs interactions sur d'une part, la mortalité et d'autre part, les concentrations en chlorures et en sodium de l'hémolymphe.

La dernière partie de cette recherche est une application des deux précédentes vers une perspective curative. En effet, connaissant les perturbations physiologiques de l'insecte provoquant la mortalité, ainsi que les facteurs à l'origine de ces perturbations, il est apparu intéressant de déterminer dans quelles limites l'apport de cations (sodium, calcium, potassium et magnésium), ainsi que de produits utilisés dans la lutte contre l'acidification ( $\text{CaCO}_3$ ,  $\text{NaCO}_3$ ) permettent d'avoir un effet bénéfique sur les réponses de l'insecte exposé.

# CHAPITRE I. : SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE

## I.1. L'OSMOREGULATION CHEZ LES INSECTES AQUATIQUES

### I.1.1. Introduction : les problèmes de régulation ionique chez les organismes aquatiques

Le tégument des animaux aquatiques n'étant pas imperméable, toute différence de concentration et de composition entre les deux compartiments corporel et extra-corporel entraîne des mouvements d'eau, d'ions et/ou de solutés à travers la paroi du corps. La nature, l'intensité et les sens de ces transferts dépendent en premier lieu du milieu dans lequel évolue l'animal et en second lieu, de son état physiologique, son fonctionnement cellulaire propre étant lui même source de modifications de la composition du milieu intérieur (Turquier, 1994). Les problèmes osmotiques pour maintenir une composition interne relativement constante sont liés à la nature de l'environnement externe.

Les eaux douces sont définies par leur salinité inférieure à 0.5 g.l<sup>-1</sup>. Dans ce milieu très dilué, les insectes aquatiques possèdent une pression osmotique interne plus élevée que celle du milieu extérieur environnant ; ils sont hypertoniques par rapport au milieu dans lequel ils vivent. Ainsi, l'eau douce tend à pénétrer dans l'organisme alors que les sels passent du milieu intérieur vers le milieu environnant de façon passive (Ward, 1992).

Ce phénomène prend une ampleur particulière chez les espèces qui fréquentent des eaux fortement déminéralisées comme celles ruisselant sur des substrats peu solubles (roches éruptives ou métamorphiques). A la pauvreté en ions du milieu s'ajoute souvent une tendance à l'acidité, qui complique le maintien de l'équilibre acido-basique du sang ou de l'hémolymphe des organismes exposés (Turquier, 1994). Dans une eau peu minéralisée non acidifiée, deux mécanismes permettent à l'animal d'équilibrer sa balance hydrominérale : d'une part, il réduit la perméabilité de ses branchies pour limiter les mouvements d'eau et d'ions, d'autre part, il pompe activement des ions dans le milieu extérieur pour compenser la perte de sels. Dans une eau peu minéralisée et de surcroît acidifiée, ces deux mécanismes perdent leur efficacité. L'animal devient plus perméable et ne parvient plus à pomper suffisamment d'ions de l'eau vers le sang.

En terme général, l'osmorégulation inclut tous les mécanismes qui excrètent de l'eau en excès aussi bien que tous ceux qui interviennent pour la rétention des sels ou le prélèvement d'ions dans le milieu environnant pour permettre le maintien d'une composition interne constante dans le sang ou l'hémolymphe.

## **I.1.2. Composition du milieu intérieur : principales caractéristiques physico-chimiques de l'hémolymphe**

Les insectes possèdent un unique fluide extra-cellulaire, l'hémolymphe, qui circule dans tout le corps, et qui est ainsi en contact direct avec toutes les cellules et les organes. Le terme d'hémolymphe est employé au lieu de sang afin de souligner les différences de ce fluide avec celui des vertébrés (Wyatt, 1961). Sa couleur est très variable (jaune, brun vert, rouge) et peut être intense ou à peine perceptible. Les pigments ont une origine alimentaire et n'ont, en général, pas de signification physiologique particulière. En effet, l'hémolymphe n'a apparemment aucune fonction respiratoire, mis à part pour certaines espèces inféodées à des milieux fortement désoxygénés (certains Chironomes).

### **I.1.2.1. Volume**

La quantité d'hémolymphe varie beaucoup en fonction de l'espèce et de la condition physiologique, ainsi que du stade de développement de l'insecte. Elle est généralement composée à 90% d'eau, avec toutefois des variations. En effet, juste avant la mue, le volume augmente car l'eau est moins excrétée et, de plus, les tissus en rejettent une certaine quantité. Après la mue, le volume diminue. L'alimentation entraîne également des changements à plus courts termes (Chapman, 1982).

### **I.1.2.2. Pression osmotique**

Généralement, la pression osmotique est maintenue à un taux relativement constant mais, des variations à court terme peuvent se produire, notamment pendant l'alimentation.

La pression osmotique de l'hémolymphe est importante dans le contrôle du contenu en eau des cellules. Elle intervient également avec celle des fluides tissulaires sur les mouvements d'eau entre ces deux compartiments en plus de la régulation active.

Généralement les insectes sont capables de réguler la pression osmotique de leur hémolymphe. En effet, pendant la déshydratation, alors que le volume d'hémolymphe diminue, la pression reste constante grâce à la baisse concomitante dans les concentrations en solutés (Florkin et Jeuniaux, 1974). Ainsi, pour *Periplaneta*, même après 8 jours sans eau, alors que le volume d'hémolymphe est réduit de moitié, la pression osmotique n'augmente que légèrement. Cette régulation est réalisée par le prélèvement du sodium et du potassium de l'hémolymphe et leur stockage dans le corps gras (Chapman, 1982). Chez les insectes aquatiques, les acides aminés libres jouent également un rôle régulateur de la pression osmotique (Schoffeniels, 1960 ; Edwards, 1982).

La capacité des insectes d'eau douce à réguler la composition et la pression osmotique de l'hémolymphe est efficace dans une gamme de conditions environnementales auxquelles ils sont normalement sujets. En effet, dans des milieux hypertoniques, l'hémolymphe devient rapidement

isotonique avec le milieu et la régulation échoue. Apparemment, ils sont incapables de produire un fluide dans le rectum qui soit hypertonique à l'hémolymphe.

### I.1.2.3. pH

Le pH de l'hémolymphe des insectes aquatiques est variable selon les espèces (Tableau I).

Tableau I : pH de l'hémolymphe des insectes dans des milieux de pH différents, suite à une acclimatation de 72 h minimum ; n.p. : non précisée (Cooper, 1994).

	pH du milieu	pH de l'hémolymphe	Température (°C)
<b>Odonates</b>			
<i>Somatochlora cingulata</i>	6.80	7.60	21
	3.50	8.27	21
<i>Libellula julia</i>	6.00	7.58	18
	4.00	7.53	18
	2.30	7.41	18
<b>Diptères</b>			
<i>Aedes dorsalis</i>	9.50	7.55	25
	8.85	7.70	25
	9.75	7.70	25
<b>Hemiptères</b>			
<i>Corixa dentipes</i>	6.00	7.04	n.p.
	3.00	6.97	n.p.
<i>Corixa punctata</i>	6.00	6.89	n.p.
	3.00	6.88	n.p.

Lorsque le milieu environnant présente des variations de pH, le pH de l'hémolymphe des insectes peut refléter ces variations en s'acidifiant ou en s'alcalinisant.

Des différences peuvent apparaître dans les réponses des insectes d'un même ordre exposés à des changements similaires. Ainsi, les deux espèces d'Odonates, *Somatochlora cingulata* et *Libellula julia*, présentent un pH hémolympatique similaire de 7.6 lorsqu'elles sont toutes deux dans un environnement de pH proche de la neutralité (6.0 - 6.8). Une diminution du pH du milieu entraîne une alcalinisation du fluide extra-cellulaire de *Somatochlora cingulata* (Tableau I) tandis que *Libellula julia* est capable de maintenir le pH de son hémolymphe quand elle est exposée à un environnement de pH 4.0. Cependant, à pH 2.3, une très légère baisse est mesurée (Rockwood et Coler, 1991).

Les différences observées dans les réponses des espèces testées, même au sein d'un même ordre mettent en évidence celles ayant une forte capacité à réguler leur pH extra-cellulaire malgré des modifications dans la concentration en protons du milieu extérieur (Cooper, 1994).

#### I.1.2.4. Effecteurs osmolaires

La pression osmotique du fluide corporel est assurée par les constituants minéraux parmi lesquels le sodium est généralement le principal cation, et les chlorures, les principaux anions.

Sutcliffe (1963) a classé les Plécoptères dans le groupe des insectes pour lesquels le sodium et les chlorures comptent pour la plus grande part dans la concentration osmolaire représentative du type de base de l'hémolymphe des insectes exoptérygotes. Les différents types d'hémolymphe en fonction des ordres sont donnés par la figure 1.

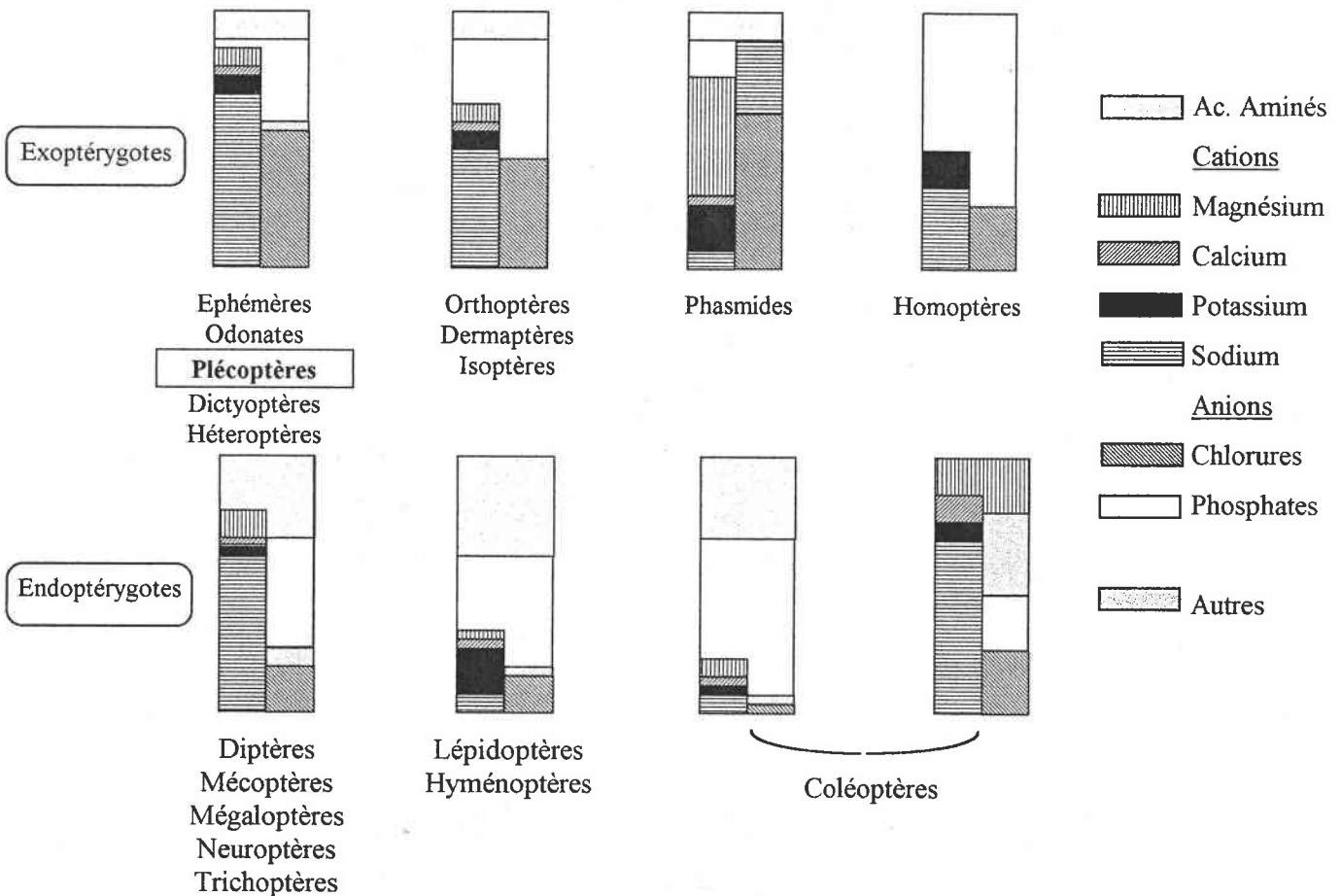


Figure 1 : Effets osmotiques des différents composants représentés en pourcentage de la concentration osmolaire totale dans l'hémolymphe des insectes (Sutcliffe, 1963). Chaque bloc est divisé en deux ; chaque section verticale représentant chacune 50 % de la concentration osmolaire totale.



#### I.1.2.4.1. Cations inorganiques

Chez les insectes exoptérygotes les plus primitifs (groupe des Plécoptères), la somme des quatre cations (Na + K + Ca + Mg) contribue environ pour moitié à la pression osmotique, le sodium jouant le rôle principal tandis que le calcium, le potassium et le magnésium sont minoritaires. Le tableau II donne quelques résultats obtenus pour l'hémolymphe de larves d'exoptérygotes par Sutcliffe (1962).

Tableau II : Composition en cations dans l'hémolymphe d'insectes exoptérygotes (Sutcliffe, 1962).

	mmoles.l <sup>-1</sup>			
	Na	K	Ca	Mg
EXOPTERYGOTES				
Ephéméroptères				
<i>Ephemera danica</i>	103.1	18.0		
Odonates				
<i>Aeschna grandis</i>	145.1	8.9	3.8	3.8
Plécoptères				
<i>Dinocras cephalotes</i>	117.1	10.0		
<i>Perla bipunctata</i>	127.1	12.0		

Par ailleurs, la quantité de sodium est fonction du régime alimentaire. Ainsi, il prédomine chez les prédateurs, alors que le magnésium est le plus abondant chez les herbivores. Chez beaucoup d'insectes, principalement exoptérygotes, la concentration ionique de l'hémolymphe est similaire pour les larves et les adultes (Chapman, 1982).

#### I.1.2.4.2. Anions inorganiques et balance ionique

Une forte concentration en chlorures dans l'hémolymphe est caractéristique des exoptérygotes. Cette quantité élevée neutralise 50 à 82 % de l'équivalent en cations inorganiques. La contribution en phosphates inorganiques et ions bicarbonates est de moindre importance.

En conclusion, la somme chlorures, bicarbonates et phosphates balance approximativement la somme des cations dans l'hémolymphe des exoptérygotes (Florkin et Jeuniaux, 1974).

### **I.1.2.5. Constituants azotés non protéiques**

Sur le total des composés azotés non protéiques de l'insecte, seule une fraction (35 à 65%) est attribuable aux acides aminés. Les autres composés sont les produits de fin de métabolisme azoté, acide urique, allantoïne, acide allantoïque, urée et ammoniacque. L'acide urique, principale forme d'excrétion des insectes est souvent très concentré et sous forme de cristaux dans l'hémolymphe. L'ammoniacque est une forme présente en faible concentration chez les espèces aquatiques.

### **I.1.2.6. Acides aminés libres**

L'hémolymphe est caractérisée par une concentration élevée en acides aminés dans le plasma, et représentant 33 à 65 % des constituants azotés non-protéiques (Chapman, 1982). Ils peuvent être 20 à 30 fois plus abondants que dans le sang humain, formant presque 15% de l'azote total (Wigglesworth, 1959). Chez les exoptérygotes, la concentration en acides aminés est moins élevée que chez les endoptérygotes et pour chaque acide aminé considéré, elle est généralement du même ordre de grandeur (de 10 à 60 mg/100 ml) contrairement aux endoptérygotes qui présentent des quantités très variables selon les acides aminés (Florkin et Jeuniaux, 1974).

Les 20 acides aminés, dont 16 prédominent, sont présents dans l'hémolymphe des insectes à des proportions variables selon les espèces et leur stades de développement. Leurs concentrations dépendent également de ceux disponibles dans la nourriture et leur concentration varie avec les stades de développement. Ils peuvent intervenir dans la régulation de la pression osmotique

### **I.1.2.7. Protéines**

La concentration en protéines dans l'hémolymphe des insectes est similaire à celle du sang humain ou des autres vertébrés.

Chez la plupart des insectes étudiés, les protéines ne sont pas toutes présentes en même temps, mais il y a des changements progressifs au fur et à mesure des cycles de vie de l'insecte (Wyatt, 1961). Ainsi, les concentrations augmentent durant la vie larvaire, puis diminuent à la fin du stade nymphal et pendant la vie adulte (Chen et Levenbook, 1966). Ces variations quantitatives suggèrent qu'elles peuvent fonctionner comme une réserve pour la biosynthèse des protéines adultes, et être à l'origine des acides aminés libres de l'hémolymphe. Elles interviennent également dans la réponse immunologique, la vitellogénèse et la synthèse des enzymes (Julien *et al.*, 1977).

### **I.1.3. Excrétion et réabsorption**

Comme l'hémolymphe des insectes d'eau douce est hypertonique par rapport au milieu extérieur, ils sont confrontés à une entrée d'eau par diffusion et à une perte d'ions vers le milieu environnant.

Il est important que l'environnement autour des cellules soit maintenu aussi stable que possible. Cela implique le maintien d'un niveau constant en sels, eau et en pression osmotique dans l'hémolymphe, avec l'élimination des produits azotés toxiques dérivés principalement du métabolisme des protéines (Chapman, 1982).

#### **I.1.3.1. Les organes excréteurs**

Le système excréteur des insectes remplit une double fonction, l'élimination des déchets et le maintien de la balance sels - eau. Ces fonctions dépendent de la production d'un fluide excrétoire primaire contenant des sels et des métabolites organiques, et d'une réabsorption différentielle à partir de ce fluide.

L'élimination des déchets est multiple, assurée par les tubes de Malpighi, par des cellules d'origine mésodermique (cellules péricardiales, cellules à urates) et, accessoirement, chez les formes primitives, par des organes segmentaires ou reins céphaliques. Seuls les tubes de Malpighi sont décrits dans cette partie.

Ce sont des formations tubulaires (Figures 2 a et b), closes à leur extrémité distale (Stobbart et Shaw, 1974) débouchant dans le tube digestif à la limite du mésentéron et du proctodeum. Leur nombre est extrêmement variable selon les insectes, mais constant dans une espèce donnée et même un ordre ; il est de 50 à 60 chez les Odonates et les Plécoptères. Leur coloration est variable (jaune, vert, brun, blanchâtre) et liée à la nature et à l'abondance des substances de déchets qu'ils renferment (Beaumont, 1973).

Ils assurent la formation d'une urine par sécrétion (portion distale) et réabsorption (portion moyenne); le segment proximal ayant essentiellement un rôle vecteur. Ils extraient, par leur portion distale, l'acide urique, l'urée, l'oxalate de calcium, des phosphates, des carbonates, des chlorures de sodium, calcium, magnésium et des pigments de l'hémolymphe dans laquelle ils baignent, toutes ces substances étant déversées dans l'intestin. Ils participent aussi à la réabsorption de l'eau (Beaumont, 1973).

Les insectes aquatiques d'eau douce tendent de plus à perdre des sels dans le milieu environnant, résultat de l'excrétion et de la perméabilité cuticulaire. Toutefois, la quantité perdue par excrétion est réduite à un très faible niveau par la réabsorption au niveau du rectum.

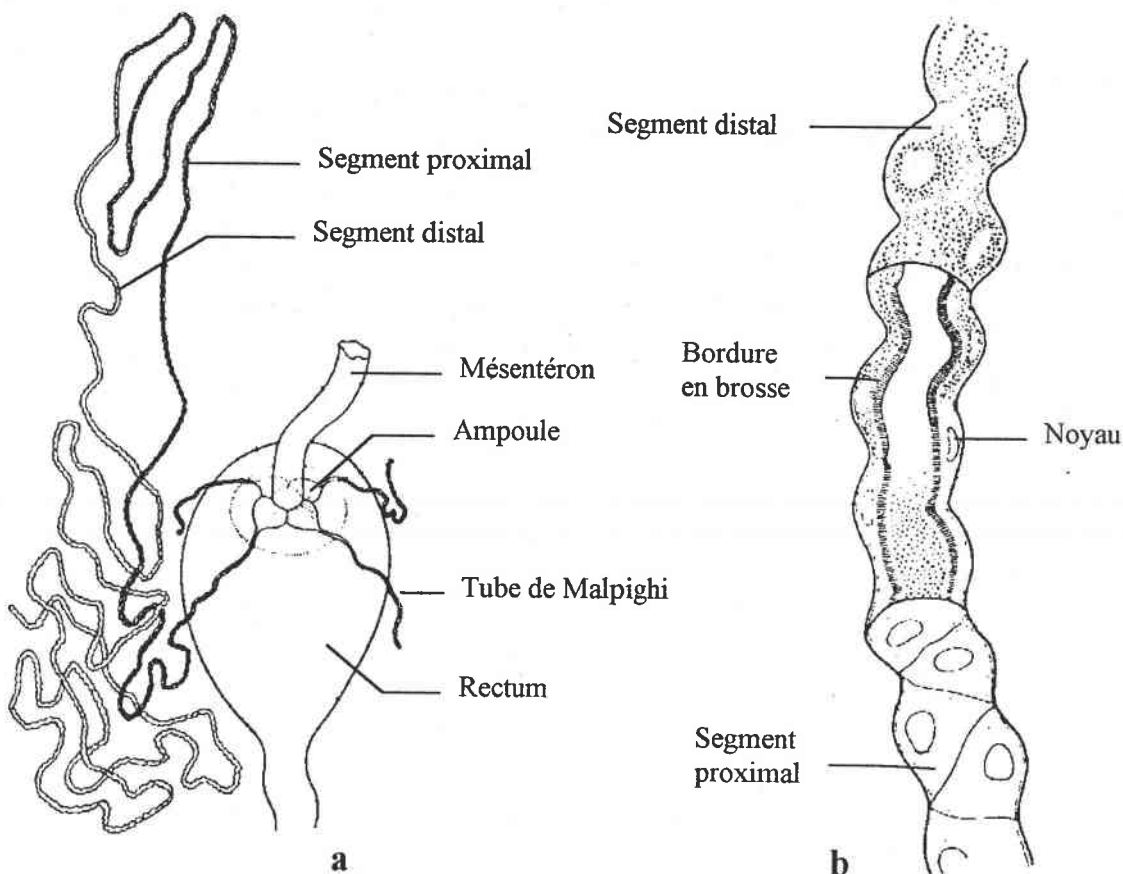


Figure 2 : Appareil excréteur de *Rhodnius* (dans Wigglesworth, 1965).

a : vue générale.

b : détail d'un tube (coupe longitudinale) à la jonction des segments proximaux et distaux.

### I.1.3.2. Fonction des tubes de Malpighi et de la partie postérieure du tube digestif

Le rôle principal des tubes de Malpighi est d'apporter au tube digestif postérieur des fluides contenant la plupart des constituants de l'hémolymphe. Le tube digestif postérieur réabsorbe les constituants nécessaires à l'insecte et rejette les autres. De cette façon, la composition et le volume de l'hémolymphe sont maintenus relativement constants (Maddrell, 1977).

Le fluide venant des tubes de Malpighi et entrant dans le tube digestif postérieur est dans la plupart des cas iso-osmotique à l'hémolymphe et considérablement riche en potassium. Le rôle du tube digestif postérieur, et plus spécialement du rectum est de réabsorber la plupart de l'eau et du potassium.

L'excrétion et l'osmorégulation liées peuvent être considérées comme un processus en deux temps (Figure 3 a et b)

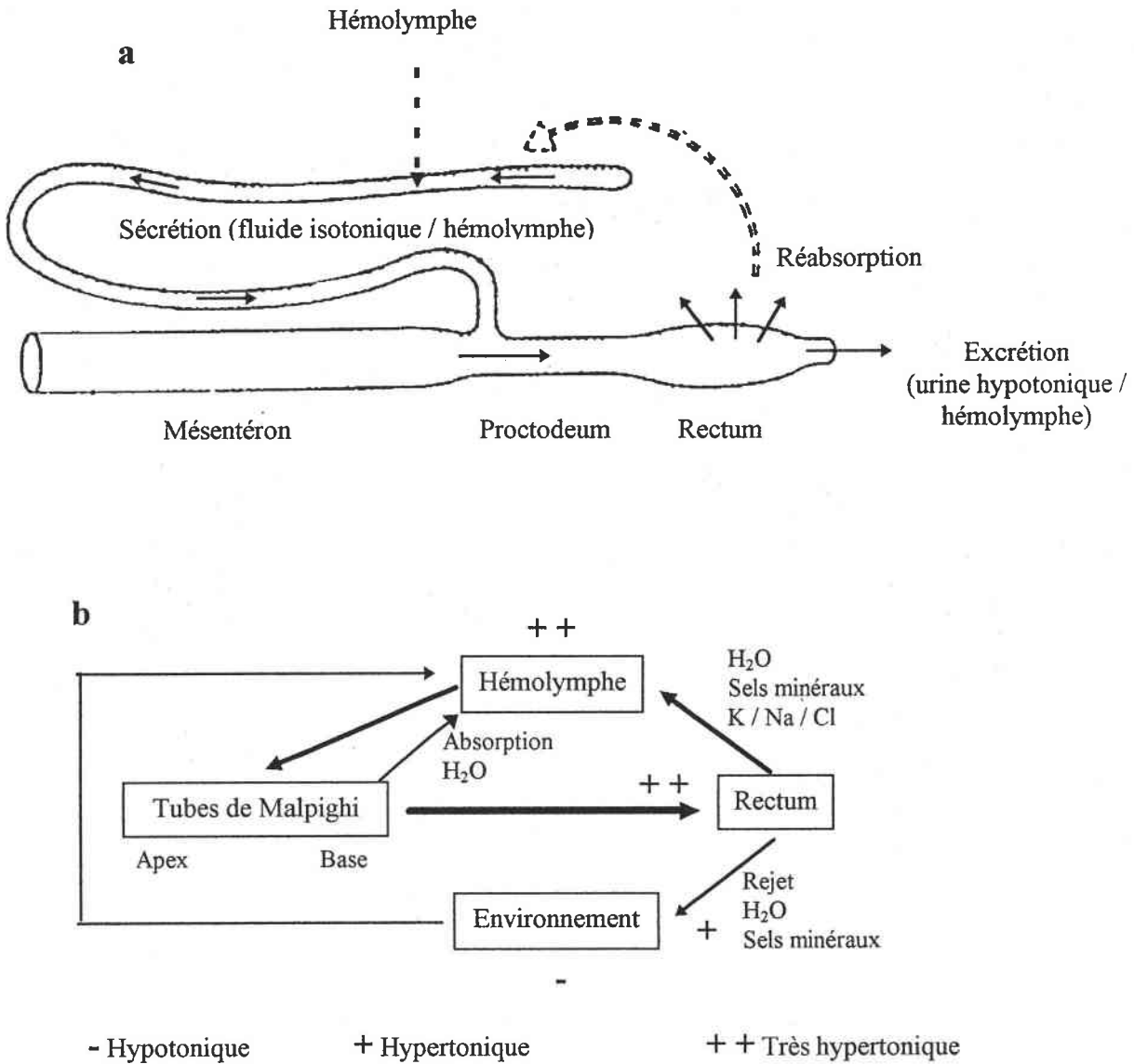


Figure 3 : Représentation de l'excrétion et de l'osmorégulation comme un procédé en deux temps (Hevert, 1985, modifié).

a : situation anatomique

b : relations entre les différents compartiments

### I.1.3.3. Excrétion

Chez la plupart des insectes, les tubes de Malpighi et le rectum sont concernés par l'excrétion et la régulation des sels et de l'eau. Les déchets azotés sont généralement excrétés sous forme d'acide urique qui est relativement peu toxique et insoluble. Quelquefois, des produits azotés terminaux sont stockés sous forme non toxique plutôt que d'être excrétés (Chapman, 1982).

#### I.1.3.3.1. Excrétion azotée

Les deux substances azotées principalement excrétées sont l'ammoniaque, produit final prédominant du métabolisme azoté, et l'acide urique.

Ces produits d'excrétion azotée sont, chez la plupart des insectes, éliminés à partir de l'hémolymphe via les tubes de Malpighi. Le mouvement dans les tubules est probablement passif, le taux dépendant de la taille des molécules et du taux de sécrétion du fluide. Le passage vers l'extérieur de l'urée et de l'acide urique semble relié à l'excrétion du potassium.

L'excrétion d'ammoniaque est démontrée chez les larves d'Odonates (*Somatochlora cingulata*). Les auteurs ont également mis en évidence que lorsque le pH du milieu baisse de 6.8 à 3.5, le taux d'excrétion diminue entraînant ainsi une alcalinisation de l'hémolymphe (Correa *et al.*, 1985).

#### I.1.3.3.2. Excrétion des molécules organiques ingérées

Le mode d'excrétion est fonction de la taille des molécules : les grosses molécules et les particules colloïdales sont métabolisées par les néphrocytes ; les molécules plus petites pénètrent activement dans les tubes de Malpighi.

En plus de ces procédés actifs, certaines molécules entrent dans les tubes de Malpighi du fait des gradients de concentration. Dans ce cas, leur taux de diffusion dépend de leur poids moléculaire et du taux de mouvement du fluide dans les tubules.

#### I.1.3.4. Régulation de l'eau

Le contenu en eau des insectes varie de 50 à 90 % du poids du corps, incluant la cuticule avec un très faible contenu en eau.

Chez les insectes aquatiques, un passage transcutané d'eau se produit, variant pour les différentes espèces de 1 à 15 % du poids du corps par jour (Komnick, 1977). Afin d'éliminer cette eau entrée en excès, les insectes excrètent une grande quantité d'urine. La quantité d'ions perdue par ce mode d'excrétion est réduite à un très faible niveau du fait de la réabsorption au niveau du rectum de certains éléments tels que le sodium, le potassium et les chlorures, conduisant ainsi à la production d'une urine hypotonique par rapport à l'hémolymphe (Stobbart et Shaw, 1974).

#### I.1.3.5. Réabsorption

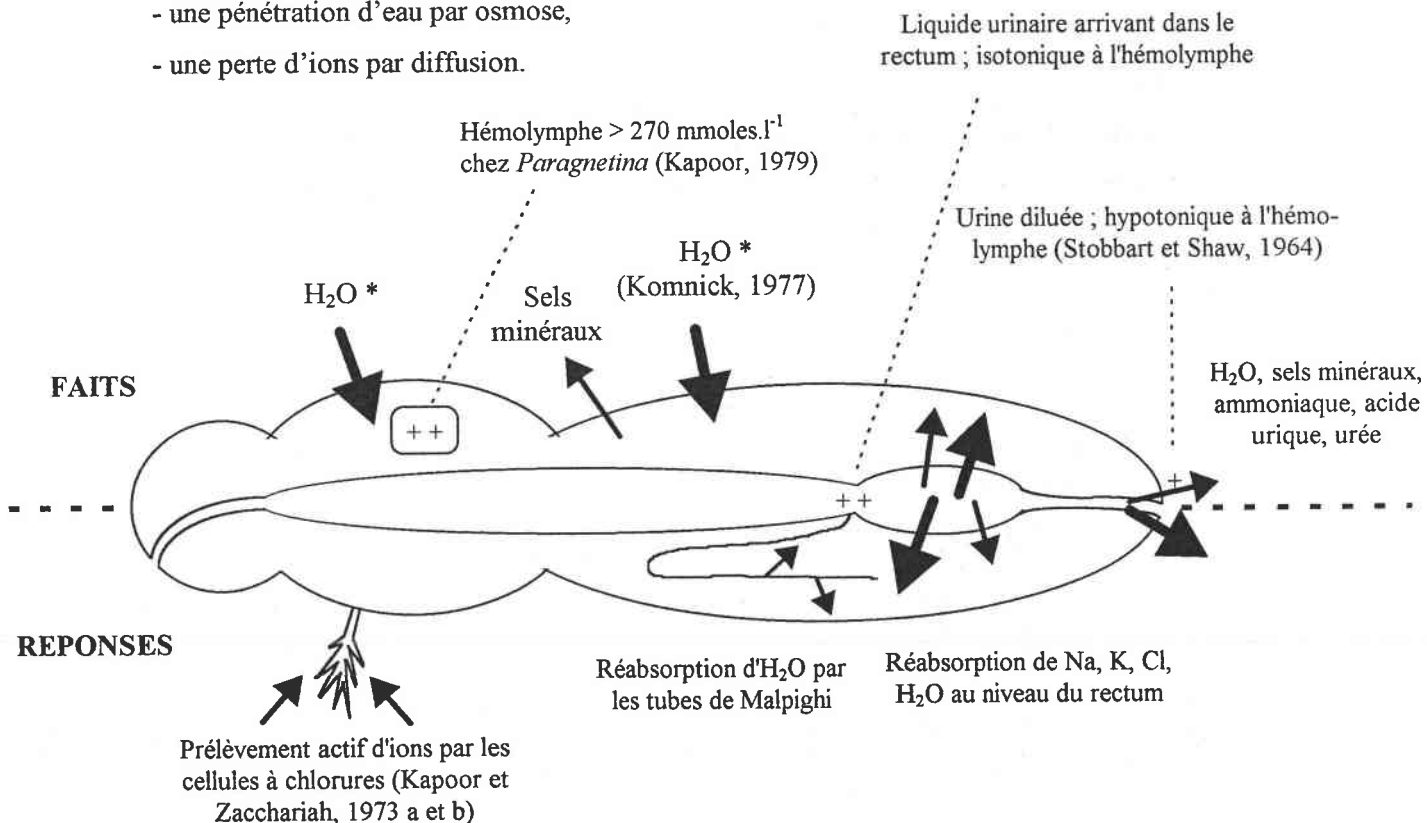
Eau, sels et produits d'excrétion passent dans les tubes de Malpighi à partir de l'hémolymphe et une réabsorption contrôlée prend place dans le rectum.

Le sodium, le potassium et les chlorures sont connus pour être réabsorbés, le procédé étant actif dans le cas du sodium et des chlorures et régulé en fonction de la composition de l'hémolymphe (Stobbart et Shaw, 1974). Ces ions inorganiques sont absorbés dans le tube digestif moyen puis réabsorbés à partir des fluides dans le rectum. Dans ces deux tissus, la présence de nombreuses mitochondries dans les invaginations des membranes cellulaires indique que les ions sont pompés activement à partir des cellules dans les espaces intercellulaires. Cela provoque une augmentation de la pression osmotique dans ces espaces, entraînant ainsi un passage passif de l'eau à partir de la lumière du tube digestif. Cet influx d'eau crée une pression hydrostatique positive dans les espaces intercellulaires, entraînant le passage de l'eau et des ions dans l'hémolymphe. La demande continue en ions est nécessaire pour maintenir la pression osmotique.

### I.1.4. Les différents mécanismes d'osmorégulation

Les insectes vivant dans les eaux douces doivent, du fait de la différence de minéralisation entre le milieu extérieur et leur milieu intérieur, faire face à :

- une pénétration d'eau par osmose,
- une perte d'ions par diffusion.



\* : gain de H<sub>2</sub>O allant de 1 à 15 % du poids du corps par jour

Figure 4 : Régulation hyperosmotique chez une larve d'insecte d'eau douce. Les flèches indiquent les tendances principales pour l'eau et les ions. Ce schéma synthétise des données spécifiques aux Plécoptères recueillies dans diverses études.

Afin de compenser ce double flux, les organismes disposent de trois moyens distincts dont l'efficacité varie selon les groupes :

- réduire la perméabilité tégumentaire pour limiter les flux,
- évacuer un maximum d'eau par voie urinaire,
- prélever activement des ions (soit au niveau rectal, soit à partir du milieu extérieur) (Figure 4).

#### **I.1.4.1. Perméabilité tégumentaire**

Certains insectes aquatiques sont plus perméables que d'autres, principalement à cause des différences dans la structure de la cuticule, et spécifiquement dans la nature de la cire épicuticulaire (Williams et Felmate, 1992). Ainsi, la cuticule des insectes aquatiques montre une grande variabilité de perméabilité. Les espèces ayant la cuticule la moins perméable sont celles qui réussissent le mieux dans un environnement acide (Havas et Advokaat, 1995). *Corixa punctata* (Hémiptère), dont la cuticule est très imperméable, est extrêmement tolérante vis-à-vis des eaux douces acidifiées, pouvant supporter des pH aussi faibles que 3.5 (Vangenechten *et al.*, 1989).

#### **I.1.4.2. Excrétion de l'eau**

Il y a un influx cutané d'eau, variant pour les différentes espèces d'insectes aquatiques de 1 à 15% du poids du corps par jour (Komnick, 1977). Afin d'éliminer cette eau entrée en excès, les insectes excrètent une grande quantité d'urine (cf. § I.3.4.).

#### **I.1.4.3. Prélèvement d'ions**

##### **I.1.4.3.1. Au niveau rectal**

Une partie des sels est réabsorbée dans certaines sections du tube digestif et du rectum. Ces processus permettent de limiter l'efflux d'ions (cf. § I.1.3.5.).

##### **I.1.4.3.2. A partir du milieu extérieur**

Bien que les insectes d'eau douce possèdent des mécanismes efficaces pour la conservation des ions (réabsorption ionique rectale, iléale), leur perte est inévitable. Aussi, pour compenser cette dernière, une absorption active d'ions à partir du milieu extérieur est nécessaire pour la régulation osmotique. Des structures épithéliales spécialisées plus ou moins complexes participent à l'homéostasie des individus par un procédé de transport actif d'ions. Trois types de sites d'absorption ionique existent chez les insectes aquatiques d'eau douce. Ils peuvent être classés en fonction de leur complexité histologique croissante : cellules à chlorures (unicellulaires ou complexes cellulaires), épithélium à chlorures et papilles anales (Figure 5).



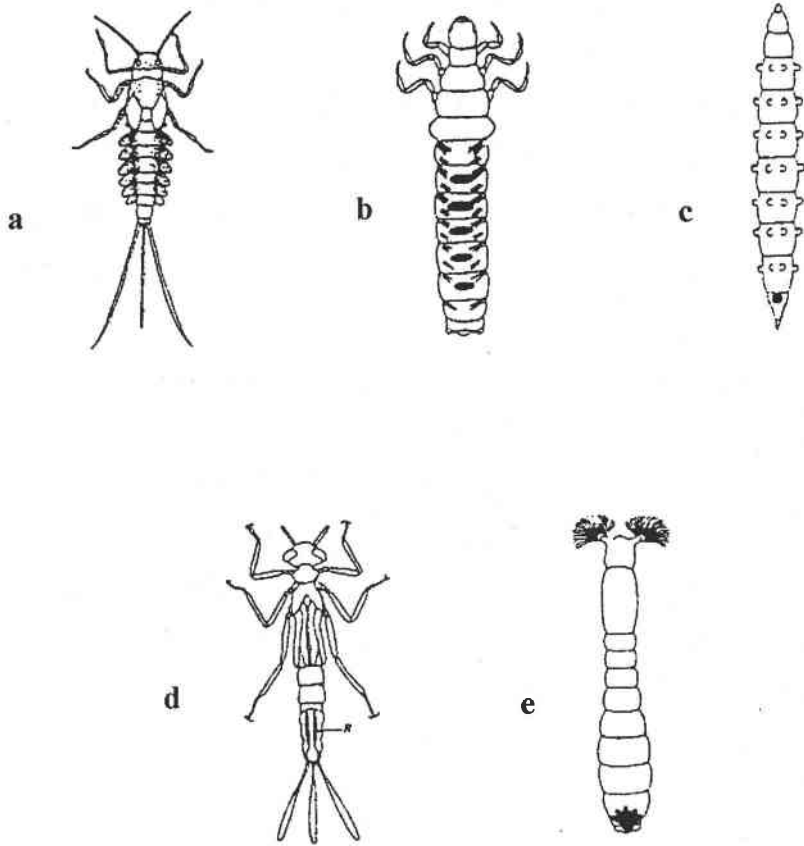


Figure 5 : Exemples de localisation des différents sites d'absorption ionique des insectes aquatiques.  
 a : cellules à chlorures (Ephéméroptères ; Baetidés) ; b : épithélium à chlorures abdominal (Trichoptères ; Limnephilidés) ; c : épithélium à chlorures anal (Diptères ; Tabanidés) ; d : épithélium à chlorures rectal (Odonates ; Coenagrionidés) ; e : papille préanale (Diptères ; Simulidés) (Komnick, 1977).

Le tableau III récapitule les différents types de site d'absorption et les espèces concernées par ces structures.

Tableau III : Sites d'absorption ionique chez les insectes aquatiques (Komnick, 1977).

Sites d'absorption		Espèces
Cellules à chlorures		Ephéméroptères, Plécoptères, Hétéroptères
Epithélium à chlorures	Abdominal	Trichoptères : Limnephilidés, Goeridés
	Anal	Diptères : Ephyridés, Muscidés, Drosophilidés, Tabanidés, Stratiomyidés, lepidés
	Rectal	Odonates : Anisoptères, Zygoptères
Papille anale		Diptères : Nématocères, Syrphidés
		Trichoptères : Glossosomatidés, Philopotamidés
		Coléoptères : Helodidés

#### I.1.4.3.2.1. Cellules à chlorures

Les nymphes de Plécoptères (Wichard et Komnick, 1973 ; 1974) et d'Ephémères (Komnick *et al.*, 1972 ; Filshie et Campbell, 1984), ainsi que les adultes de certains Hétéroptères, possèdent des cellules à chlorures, spécialisées dispersées sur certaines parties de leur corps et impliquées dans l'absorption des ions à partir de l'eau.

Chez les Plécoptères, la distribution de ces cellules sur la surface du corps varie selon l'espèce. Toutefois, les branchies et les membranes inter-segmentaires sont les sites les plus répandus.

Pour les Ephémères, elles peuvent être réparties sur presque toute la surface du corps, mais elles sont surtout concentrées sur les trachéo-branchies et sur les cotés latéraux des sternites et des tergites abdominaux.

Les cellules à chlorures sont plus généralement distribuées sur le corps des punaises, en contact direct avec l'eau environnante.

Komnick *et al.* (1972) montrent que les cellules à chlorures des Ephémères absorbent les chlorures à partir du milieu extérieur. La morphologie de ces cellules, leur distribution et les enzymes associées confirment qu'elles sont impliquées dans l'osmorégulation (Wichard *et al.*, 1973). Elles sont donc capables de prélever les ions contre un fort gradient de concentration, impliquant une forte dépense énergétique (Turquier, 1994).

Lorsqu'elles sont soumises à des salinités extérieures différentes, des changements ultrastructuraux et/ou des variations numériques sont observés au niveau des cellules à chlorures (Kapoor, 1978, Komnick, 1977). L'exposition de plécoptères à des conditions de pH extrême provoque également des changements ultrastructuraux (Lechleitner *et al.*, 1985). Komnick *et al.* (1972) ont montré un nombre de cellules à chlorures plus élevé chez des larves d'Odonates exposées à un milieu ayant un pH acide (pH 4) par rapport à celles à un milieu neutre (pH 7). A l'opposé, Berrill *et al.* (1991) n'ont trouvé aucune corrélation entre le pH du milieu et la densité de cellules à chlorures chez plusieurs espèces d'Ephémères.

#### I.1.4.3.2.2. Epithélium à chlorures

Les nymphes d'Odonates et les larves de plusieurs espèces de Trichoptères et de Diptères présentent des zones tégumentaires riches en cellules spécialisées dans le prélèvement d'ions. Ces zones, connues sous le nom d'épithéliums à chlorures, sont localisées ventralement ou dorsalement sur l'abdomen des Trichoptères, adjacentes à l'anus des Diptères et dans la chambre rectale des Odonates (Williams et Felmate, 1992).

Dans un épithélium à chlorures, l'abondance des mitochondries et l'invagination des membranes sont typiques des épithéliums de transport (Wichard et Komnick, 1973).

Chez les larves de Diptères, les épithéliums à chlorures anaux participent activement à l'absorption des ions à partir du milieu extérieur (Schwantes et Seibold, 1989). Il en est de même chez les larves de Trichoptères au niveau des épithéliums à chlorures abdominaux (Schmitz et Wichard, 1975).

#### I.1.4.3.2.3. Papilles anales

Les papilles anales sont le site actif du prélèvement d'ions. Chez les moustiques et les larves de Chironomidés, elles sont plus ou moins permanentes bien que leur taille varie en fonction de la salinité de l'eau environnante (plus développées dans les solutions les plus diluées). Des ions tels que le sodium, les chlorures et les phosphates sont absorbés à travers les papilles chez les larves d'*Aedes*, *Culex* et *Chironomus* (Chapman, 1982). L'ultrastructure des papilles anales des larves de *Chironomus tentans* (Diptères) traduit leur rôle dans le transport actif des ions de l'environnement vers l'hémolymphe (Jarial, 1995).

Ces différentes structures spécialisées sont localisées à différents endroits sur le corps des insectes aquatiques (Figure 5).

### I.1.5. Respiration des insectes aquatiques

La plupart des animaux vivant dans un environnement aquatique maintient leurs concentrations ioniques et la pression interne de leur fluide corporel à des niveaux substantiellement différents de ceux du milieu externe. Le maintien de tels gradients ioniques et osmotiques entraîne une consommation d'énergie qui est d'autant plus grande que le milieu est hypotonique.

L'énergie pour les mécanismes osmorégulateurs est apportée par les métabolismes d'oxydation et la mesure de la consommation en oxygène pourrait être une mesure indirecte de l'énergie utilisée (Potts, 1954). De plus, les échanges gazeux jouent un rôle dans l'équilibre acide - base.

#### I.1.5.1. Physiologie de la respiration des insectes aquatiques

Les insectes aquatiques respirent selon des modes très variés. Beaucoup respirent l'air atmosphérique et, viennent renouveler leur provision d'air à la surface de l'eau. D'autres espèces ont un système trachéen fermé avec obligation d'utiliser l'oxygène dissous dans l'eau. L'hémolymphe n'intervient guère car elle n'a aucun pigment respiratoire, sauf pour certains Chironomidés qui possèdent une hémoglobine.

#### I.1.5.1.1. A partir de l'atmosphère ou des plantes aquatiques

Les insectes qui dépendent de l'oxygène atmosphérique, vont périodiquement à la surface ou restent de façon plus ou moins permanente à l'interface air - eau. Ce mode de respiration a entraîné des adaptations variées. La surface totale de la cuticule ou au minimum la région autour des stigmates possède des propriétés hydrophobes (Chapman, 1982). Plusieurs espèces d'insectes ont des siphons respiratoires spéciaux pour percer le film de surface et certains ont même développé des extensions tubulaires leur permettant de prélever l'air atmosphérique sans aller à la surface (Ward, 1992). D'autres ont, près des stigmates ouverts, une pilosité hydrofuge dense et fine qui a une plus grande affinité pour l'air que pour l'eau, permettant ainsi de retenir une réserve d'air permanente, sans que l'insecte n'ait à gagner la surface (Eriksen *et al.*, 1984). Le film d'air ainsi piégé est appelé *plastron*. Deux types de *plastrons* existent : le *macroplastron* qui joue, en plus du rôle de réservoir additionnel d'air, celui de *branchie* physique permettant à l'oxygène d'être extraite de l'eau et le *plastron* permanent constitué d'un *feutrage* dense de soies fines résistantes à l'écrasement (Williams et Felmate, 1992). Le piégeage d'air est commun chez les adultes de punaises et de Coléoptères.

Afin d'obtenir leur oxygène à partir des tissus parenchymateux des plantes aquatiques, certains insectes ont des stigmates modifiés pour percer la tige et s'y accrocher. Grâce à cette adaptation, les tissus végétaux sont percés et l'oxygène contenu dans les lacunes aérifères est prélevé.

#### I.1.5.1.2. A partir de l'oxygène dissous dans l'eau

Pour qu'un insecte soit complètement aquatique, il ne doit utiliser que l'oxygène dissous dans l'eau pour respirer. Il nécessite alors une grande surface respiratoire sous forme d'un épithélium respiratoire externe et des modifications du système trachéen. Ainsi, l'oxygène diffuse soit simplement à travers la cuticule, soit à travers de fines membranes, lesquelles sont soit des trachéo-branchies portées par le thorax ou l'abdomen, soit des lamelles très vascularisées et pourvues de nombreuses ramifications trachéennes contenues dans le rectum. Les insectes respirant ainsi sont fréquents dans les eaux courantes ou lenticules bien aérées.

##### I.1.5.1.2.1. Respiration cutanée

Fondamentalement, tous les insectes aquatiques utilisent les échanges à travers la paroi du corps pour satisfaire une partie de leur besoin respiratoire. Un grand nombre d'espèces ne repose que sur ce mode de respiration, tels les insectes de petite taille qui présentent un rapport surface/volume favorable pour les échanges respiratoires (Cooper, 1994). La diffusion cutanée dépend de la perméabilité de la cuticule, ce qui implique généralement la perte de la couche de cire, et souvent celle du ciment de l'épicuticule, et une plus faible pression en oxygène dans les tissus que dans l'eau (Chapman, 1982).

### I.1.5.1.2.2. Respiration branchiale

En plus de la respiration cutanée, certaines espèces d'insectes disposent d'organes cuticulaires variés tels que les branchies qui augmentent la zone de surface effective pour les échanges gazeux (Williams et Felmate, 1992). Pour beaucoup de larves, ces branchies sont les sites principaux de la respiration. Elles sont de trois types: les branchies sanguines, les trachéo-branchies et les branchies spiraculaires.

Les branchies sanguines sont des expansions du tégument (Figure 6). Elles sont remplies d'hémolymphe et dépourvues de tout élément trachéen. Leur localisation varie avec les espèces : papilles ventrales des Chironomes, papilles anales des moustiques. Il semblerait cependant qu'elles n'aient qu'un rôle secondaire dans la respiration (Wigglesworth, 1959).

Les trachéo-branchies (Figure 6) consistent en un système de tubes creux et ramifiés - les trachées - distribuées dans tout le corps de l'organisme. Les ultimes ramifications - les trachéoles - sont très fines (0.1 à 1  $\mu\text{m}$  de diamètre) et pénètrent dans la plupart des organes. Si les trachéoles, dans leur partie distale, peuvent être remplies de liquide, le reste du système trachéen est rempli d'air. L'oxygène dissous dans l'eau diffuse à travers les parois des trachéo-branchies tandis que le rejet de gaz carbonique s'effectue sur toute la surface du corps, et plus particulièrement dans les zones où la cuticule est plus mince, telles que les zones intersegmentaires. Ces branchies sont trouvées chez les larves d'Ephémères et d'Odonates (Wigglesworth, 1959).

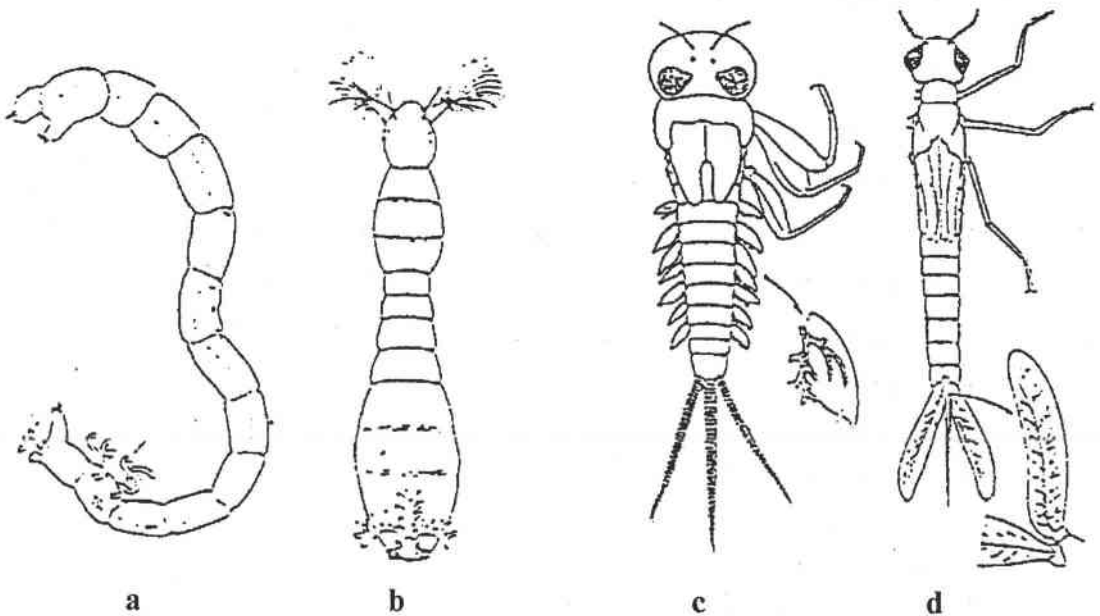


Figure 6 : Appareil respiratoire des insectes aquatiques : branchies sanguines (a et a) et trachéo-branchies (c et d). a : larve de Chironome (Diptères ; Nématocères) ; b : larve de Simulie (Diptères ; Nématocères) ; c : larve d'*Ecdyonurus* (Ephéméroptères) : localisation abdominale, d : larve de Zygoptère (Odonates) : localisation caudale.

Quelques larves de Plécoptères et de Coléoptères possèdent en plus des trachéo-branchies filamenteuses anales (Ward, 1992). Chez les insectes respirant ainsi, l'approvisionnement en oxygène et l'efficacité respiratoire sont contrôlés par des mécanismes tels que le mouvement rythmique des branchies, la remontée à la surface et des mouvements de pattes; les larves de Plécoptères, par exemple, effectuent des tractions.

Les branchies spiraculaires sont observées chez quelques pupes aquatiques. Ces formations sont adaptées à la vie aquatique et aérienne en atmosphère humide (certains Tipulidés, Blépharocéridés, Simulidés) (Beaumont, 1973). Le tableau IV récapitule les modes respiratoires selon les ordres.

Tableau IV : Mécanismes respiratoires rencontrés chez les insectes aquatiques (l, larve ; n, nymphe ; a, adulte ; \* : les insectes cités ci-contre dépendent de ce mode respiratoire exclusivement), (Ward, 1992).

Mécanisme respiratoire	Ordres et stades de développement
Cutanée *	Certains Plécoptères (l), Diptères (l), Trichoptères (l,n), Hémiptères (l,a). Les premiers stades de nombreux ordres d'insectes aquatiques.
Trachéo-branchie	Ephéméroptères (l), Odonates (l), Megaloptères (l), Neuroptères (l). Certains Plécoptères (l), Lépidoptères (l), Diptères (l), Coléoptères (l), Trichoptères (l,n).
Excursions à la surface	Certains Hémiptères (l,a), Megaloptères (l), Lépidoptères (l), Coléoptères(l,a), Diptères (l,n).
Extensions à la surface	Quelques Diptères (l).
A partir des plantes	Quelques Coléoptères (l,n,a), Diptères (l,n), Lépidoptères (l).
Branchie physique	Quelques Hémiptères (l,a), Coléoptères (a), Lépidoptères l).
Plastron	Quelques Hémiptères (a), Coléoptères (a), Lépidoptères ( <i>Acentropus niveus</i> ).
Branchie spiraculaire	Quelques Coléoptères (l,n), Diptères (n).

### I.1.5.2. Fonctions de la respiration

#### I.1.5.2.1. Production d'énergie

L'oxygène est utilisé dans la respiration cellulaire où il est l'accepteur final d'électrons dans une série de réactions mitochondriales qui relarguent de l'énergie à partir des molécules organiques provenant de la digestion de la nourriture (Dejours, 1994). Cette énergie est ensuite utilisée pour toutes les fonctions du corps. La respiration cellulaire aérobie relargue 19 fois plus d'énergie que la respiration anaérobie. Etant donné que les besoins en énergie des organismes multicellulaires sont plus élevés que l'énergie produite par la respiration anaérobie, l'obtention d'oxygène pour permettre une respiration aérobie est fondamentale (Eriksen *et al.*, 1984).

#### I.1.5.2.2. Equilibre acide-base

Le résultat du métabolisme produisant de l'énergie est la production d'eau et de dioxyde de carbone. La libération de ce dernier a des répercussions sur l'équilibre acide-base de l'hémolymphe des insectes. En effet, à un pH extra-cellulaire donné, correspond un certain rapport de l'acide carbonique non dissocié,  $H_2CO_3$ , et de sa première forme de dissociation, l'ion bicarbonate  $HCO_3^-$ . Or, la concentration en acide carbonique est directement liée à la pression partielle du dioxyde de carbone (Dejours, 1994).

Chez les insectes aquatiques, le rôle de la respiration dans la régulation du pH extra-cellulaire a reçu peu d'attention. Malgré l'effet certain de la pression en dioxyde de carbone, du pH de l'hémolymphe et du milieu extérieur sur l'équilibre acide-base, les rôles précis de chacun de ces facteurs sont encore mal connus. Cela, d'autant plus, que les échanges ioniques à travers les surfaces cuticulaires et respiratoires seraient les réponses dominantes au changement dans la balance acido-basique (Cooper, 1994).

#### I.1.5.3. Effets des toxiques sur la respiration

Les toxiques peuvent provoquer un stress de la respiration des insectes aquatiques, soit en modifiant le taux de consommation d'oxygène, soit en provoquant des dommages physiques.

Le système respiratoire des insectes aquatiques est particulièrement sensible aux toxiques, car les trachéo-branchies sont des surfaces respiratoires, mais aussi des sites de prélèvement actif d'ions (Komnick, 1977) et, par conséquent, probablement de toxiques chimiques.

La plupart des études sur la réponse respiratoire des insectes par rapport à de tels éléments est faite en laboratoire car, elles demandent des appareils précis et des conditions rigoureuses d'expérimentation. Les insectes d'eau douce montrent soit une diminution, soit une augmentation du taux respiratoire en réponse à une exposition à un toxique présent en concentration sublétales. Chaque type de réponse a des répercussions sur la physiologie de l'individu stressé. Ainsi, une augmentation de la respiration entraîne un coût métabolique important tandis qu'une réduction peut conduire à la mort. Une exposition à un milieu contenant du cuivre en concentration sublétales augmente le taux de consommation en oxygène des Plécoptères (Kapoor et Griffiths, 1976). A l'inverse, la respiration peut être diminuée quand des métaux, tels le fer précipitent sur les surfaces branchiales sous des conditions acides ou déplacent des cations fonctionnels du site actif des enzymes entraînant une perturbation respiratoire (Gerhardt, 1992).

Dans certains cas, la respiration n'est pas affectée directement par les toxiques. En effet, les surfaces respiratoires, du fait de leur contact direct avec le milieu extérieur, sont impliquées dans leur absorption et permettent leur diffusion vers d'autres organes (Eriksen *et al.*, 1984).

Les surfaces respiratoires, surtout les trachéo-branchies sont extrêmement sensibles aux éléments contaminant l'environnement. Les toxiques peuvent provoquer des dommages physiques sur les surfaces respiratoires (Lechtleiner *et al.*, 1985), ou utiliser ce système pour pénétrer dans l'organisme et affecter d'autres organes. Le résultat, quelque soit la cible, est un stress respiratoire pouvant aller jusqu'à la mort de l'insecte.

En conclusion, de la partie I.1., il apparaît que grâce aux différents mécanismes d'osmorégulation, les insectes aquatiques parviennent à maintenir une composition interne constante.

Toutefois, lorsqu'ils se trouvent confrontés à un environnement perturbé, leur équilibre peut être altéré à cause de caractéristiques physico-chimiques du milieu extérieur (trop grande différence de pression osmotique entre le milieu intérieur de l'insecte et le milieu extérieur, présence de composés toxiques, etc.).

L'acidification des eaux de surface, dont les caractéristiques sont décrites dans la partie I.2. est la perturbation étudiée dans ce travail afin de mettre en évidence des modifications de l'équilibre interne chez une larve d'insecte exposé à un tel environnement.



## I.2. L'ACIDIFICATION DES EAUX DE SURFACE

La figure 7 présente les différentes phases intervenant dans le processus d'acidification des eaux de surface, et qui seront décrites plus en détail ci-dessous.

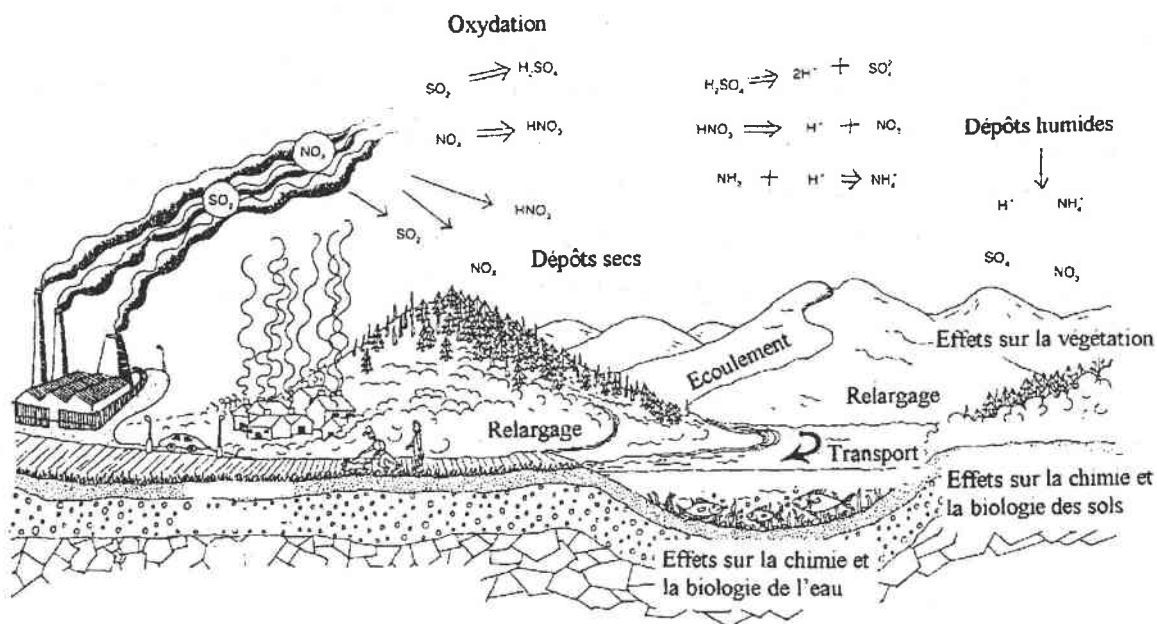


Figure 7 : Les différentes phases intervenant dans le processus d'acidification des eaux de surface (Howells, 1990).

### I.2.1. Problématique de l'acidification

#### I.2.1.1. Les causes

Les dépôts acides, problème environnemental très sérieux, sont causés principalement par les oxydes de soufre et d'azote émis notamment lors de l'utilisation des combustibles fossiles et par les fonderies de métaux (Gorham, 1994). En général, la proportion des gaz acides d'origine naturelle et anthropique est à peu près la même. Cependant, dans l'hémisphère Nord plus industrialisé, les émissions anthropiques comptent pour environ 90 %, voir plus, du total des émissions de soufre. Cette remarque s'applique aussi pour les composés azotés,  $NO_x$  et  $NH_3$  dont la participation anthropique a augmenté (Howells, 1990).

### I.2.1.1.1. Emission des polluants précurseurs

#### Les oxydes de soufre, SO<sub>x</sub>

En l'absence d'activités humaines, la concentration en dioxyde de soufre dans l'atmosphère est comprise entre 1 et 3 µg.m<sup>-3</sup>. Cette teneur est le résultat de processus naturels tels que la désulfuration puis l'oxydation par l'ozone, l'activité volcanique et les sources sulfureuses (Ravera, 1987). La pollution anthropique en SO<sub>2</sub> est essentiellement issue de la combustion des combustibles fossiles, de la fabrication de la pâte à papier (Pinkerton, 1993), du procédé kraft dans les manufactures et des fonderies de minerai de fer. Ces dernières, par exemple, ont émis des gaz sulfureux excédant 500 000 tonnes par an dans la région du Kola dans le Nord de la Russie (Moiseenko, 1994). Le tableau V donne un aperçu des quantités de soufre émises dans différents pays d'Europe en 1965 (Oden, 1976).

Tableau V : Quantité de soufre émise dans différents pays d'Europe en 1965 (Oden, 1976).

Pays	Quantité de S en Kg de.S.Ha <sup>-1</sup> .an <sup>-1</sup>
Norvège	2.5
Suède	6.7
Danemark	30
Allemagne de l'Ouest	65
France	20
Angleterre	131
Pays-Bas	152

#### Les oxydes d'azote, NO<sub>x</sub>

Les plus importantes sources naturelles d'azote sont la fixation microbiologique et les orages (éclairs). L'intervention significative humaine dans le cycle de l'azote a commencé avec l'utilisation de combustibles fossiles et s'accélère dramatiquement avec l'augmentation de la consommation de ces derniers et l'application des fertilisants azotés. Ainsi, par exemple, 140 tonnes d'azote réactif (N<sub>réactif</sub> = NH<sub>x</sub>, N<sub>x</sub>O<sub>y</sub> et N<sub>organique</sub>) sont mobilisés chaque année. Les activités de la République Populaire de Chine et des Etats Unis y contribuent pour 30% (Galloway *et al.*, 1996).

#### Les autres composés

Alors que les composés cités ci-dessus sont des précurseurs d'acidité, HCl est émis directement dans l'atmosphère comme un polluant primaire. Il provient, par exemple de l'eau de mer et ne dépend pas de réactions chimiques pour sa formation (Harrison, 1987). Sa participation, du point de vue quantitatif est plus faible, mais, qualitativement, il est plus dangereux puisque immédiatement disponible dans le processus d'acidification.

L'ammonium est le constituant atmosphérique responsable principalement de la neutralisation des acides forts. Il est surtout issu de la décomposition animale et du relargage des fertilisants agricoles. Le procédé de neutralisation a seulement une influence temporaire car lorsqu'ils sont déposés, les sels d'ammonium sont lentement oxydés et relarguent les acides forts. Le tableau VI renseigne sur les émissions totales d'acides en Grande Bretagne (Harrison, 1987).

Tableau VI : Quantité émise des principaux précurseurs d'acidité en Grande-Bretagne et leur contribution à l'acidité potentielle (Harrison, 1987).

Espèce	Emission (Kt a <sup>-1</sup> )	Potentiel H <sup>+</sup> équivalent (Kt a <sup>-1</sup> )	Pourcentage total de l'acidité potentielle
SO <sub>2</sub>	3690	115.3	70.9
NO <sub>x</sub>	1856	40.4	24.8
NH <sub>3</sub>	250	7.0	4.3

Evers *et al.* (1995) a établi la contribution des différents groupes émettant des substances acidifiantes au Pays-Bas en 1992 (Tableau VII).

Tableau VII : Secteurs émettant des composés précurseurs d'acidité (en équivalents d'acidification selon le service environnemental néerlandais) et leurs contributions respectives (Evers *et al.*, 1995).

	SO <sub>2</sub>	NO <sub>x</sub>	NH <sub>3</sub>	Total Aeq*	Pourcentage
Raffineries	1860	391	0.412	2250	8.0
Secteur de l'énergie	904	1480	-	2390	8.5
Décharges	131	91.4	-	222	0.8
Industries chimiques	484	672	187	1340	4.8
Autres industries	912	1400	131	2440	8.7
Agriculture	28.7	423	8580	9030	32.2
Transport et trafic	938	7380	30.7	8350	29.8
Consommation résidentielle	39.7	460	623	1120	4.0
Nature	-	354	553	907	3.2
Total 1992	5300	12700	10100	28100	100
1990	6290	12500	12000	30800	109
1988	7400	12600	13700	33700	120
1985	7940	12300	14600	34900	124

### I.2.1.1.2. Transport des polluants et formation des "pluies acides"

L'oxydation des précurseurs dans l'atmosphère n'est pas instantanée, influençant ainsi leur distance de dispersion (Oden, 1976). Selon le type de dépôt qui suit cette phase, la distance parcourue est plus ou moins importante. Ainsi, les dépôts secs peuvent être transportés sur des centaines de kilomètres à partir de la source tandis que les dépôts humides sont dispersés sur des milliers de kilomètres. Ce phénomène explique pourquoi des précipitations acides peuvent se produire dans des zones à faible densité de population avec peu de sources potentielles d'acidité.

Les polluants émis par les systèmes de chauffage et le trafic le sont sur quelques mètres de hauteur créant localement des situations dangereuses dans les zones urbaines si les conditions météorologiques sont défavorables. Les centrales électriques et les industries distribuent leurs émissions à une grande hauteur, réduisant ainsi la pollution locale au minimum, mais augmentant les zones contaminées. Il est impossible d'établir une corrélation entre la zone source de polluants et un site récepteur spécifique parce que des facteurs tels que les conditions météorologiques, la chimie atmosphérique et les procédés physiques déterminent le transport du polluant (Zeng et Hopke, 1994). De plus, certains produits se déplacent en "looping", c'est à dire se forment, se déposent, puis sont à nouveau transportés avant de se redéposer (Figure 8) (Oden, 1976).

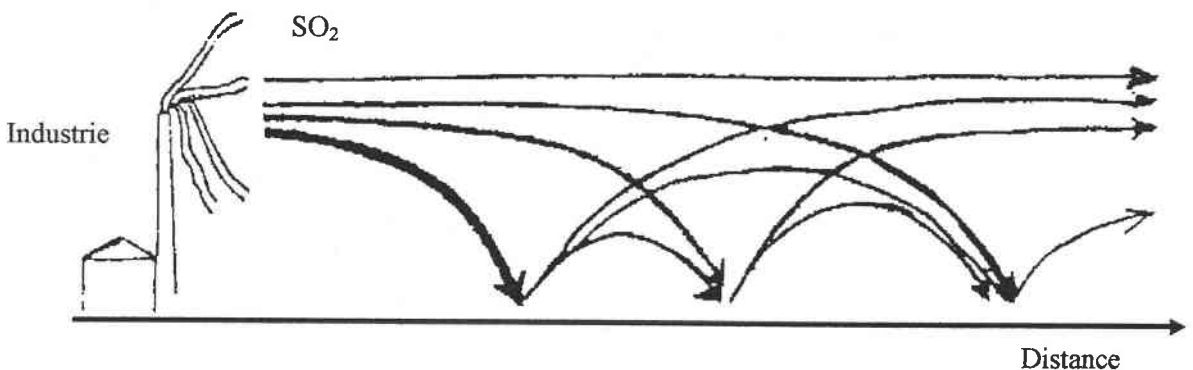


Figure 8 : Déplacement dit en "looping" sous la trajectoire du vent (Oden, 1976).

Pendant la phase de transport des composés azotés et soufrés, des oxydations chimiques se produisent conduisant à la formation d'acides forts tels  $\text{H}_2\text{SO}_4$  et  $\text{HNO}_3$  qui sont facilement incorporés dans la vapeur d'eau condensée. Ils retournent donc ainsi à la terre sous formes humides entre autres (Bricker et Rice, 1993). La connaissance de la chimie atmosphérique des composés soufrés et azotés est loin d'être complète, mais quelques mécanismes commencent à émerger (Figure 9).

Le cycle de réaction de transformation des gaz en acide prend place dans la troposphère, au minimum à 10-12 km de l'atmosphère. Cela commence par un photon qui frappe une molécule d'ozone (Figure 9). Le résultat est une molécule d'oxygène et un atome d'O seul très réactif, qui se combine avec une molécule d'eau pour donner deux radicaux hydroxyles (Mohnen, 1988). Ces derniers sont les plus importants oxydants intervenant dans ce cycle de transformation. D'une part, ils transforment  $\text{NO}_2$  en  $\text{NO}_3$  et, d'autre part, ils initient la réaction qui transforme  $\text{SO}_2$  en  $\text{H}_2\text{SO}_4$ .  $\text{NO}_x$  est généralement plus vite oxydé que  $\text{SO}_2$ . L'acide nitrique gazeux se dissout facilement dans les gouttelettes nuageuses existantes. L'acide sulfurique formé à travers les réactions en phase gazeuse se condense pour former des gouttelettes microscopiques (0.1 à 2  $\mu\text{m}$  de diamètre). Certaines de ces particules reviennent au sol par dépôt sec. La plupart cependant, sont incorporées aux nuages.

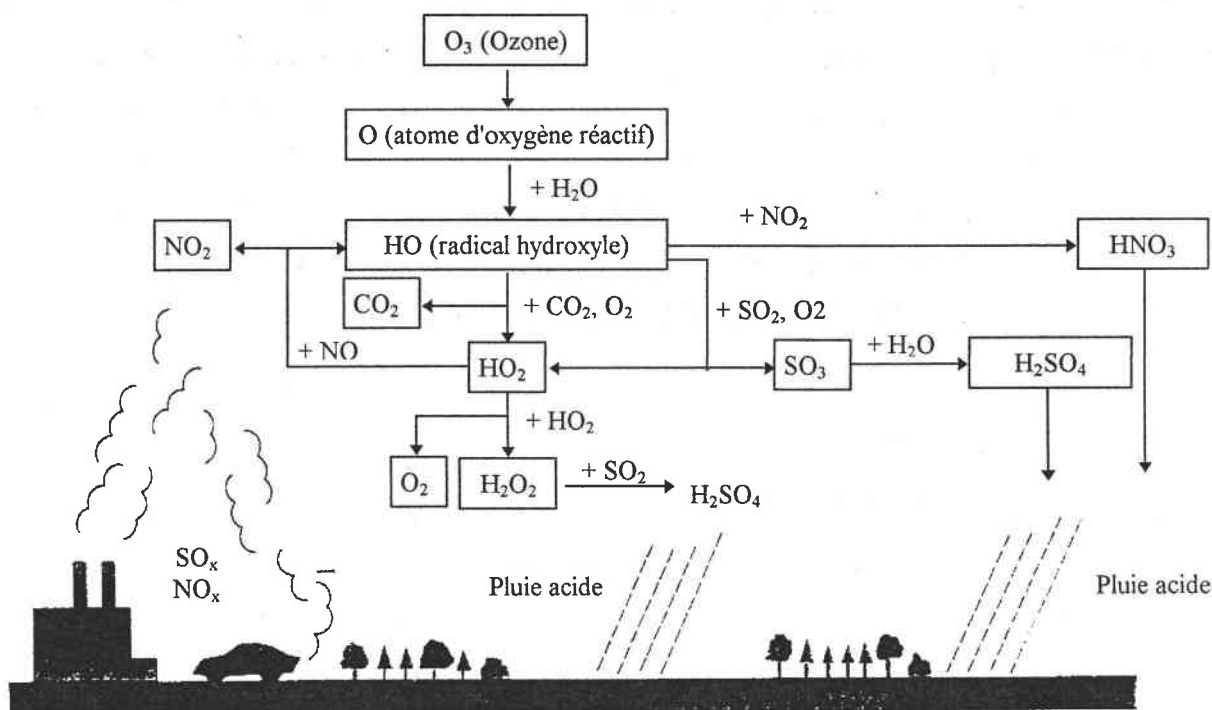


Figure 9 : Cycle de la réaction transformant les gaz en acides (Mohnen, 1988).

Le peroxyde d'hydrogène et l'ozone sont les oxydants majeurs de  $\text{SO}_2$  dans l'atmosphère. L'oxydation par les peroxydes est rapide, mais sa faible concentration la limite. Avec l'ozone, la réaction chimique est plus lente, mais, sa solubilité inversement reliée à l'acidité, la limite. Le fer et le pH catalysent également l'oxydation de  $\text{SO}_2$  dans les mêmes proportions que l'ozone dans les précipitations (Clarke et Radojevic, 1987; Radojevic *et al.*, 1995).

Le terme de "pluies acides" est un terme global relié aux polluants acides et potentiellement acides contenus dans la neige, pluies et autres formes humides, qu'ils soient d'origine naturelle ou anthropique.

### I.2.1.1.3. Les différents types de dépôt

Les dépôts humides représentent le flux de tous les composants ramenés à la surface de la végétation, des sols et de l'eau par la pluie ou les chutes de neige. Cela inclut les gaz dissous et les substances particulières en suspension.

Les dépôts occultes sont formés des aérosols contenus dans les gouttelettes des brouillards, givre, rosée et des nuages, qui le plus souvent ont des concentrations bien plus élevées en polluants que les eaux de pluie elles-mêmes (Figure 10).

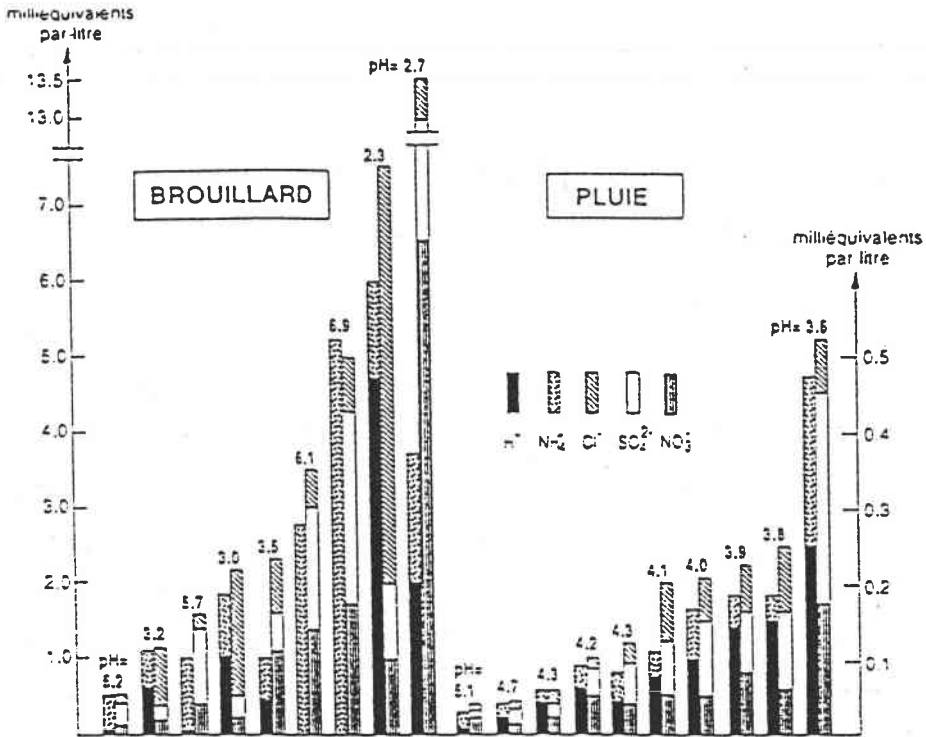


Figure 10 : Comparaison entre des analyses de pluie et de brouillard (1984) dans les environs de Zurich (Stumm *et al.*, 1987).

Les dépôts secs sont composés de toutes les particules et gaz (surtout SO<sub>2</sub>, HNO<sub>3</sub>, HCl) qui se déposent sur les surfaces réceptrices en l'absence de pluie ou de neige. Il a été évalué que environ la moitié des dépôts de sulfates, nitrates et protons a lieu sous forme de dépôts secs dans les forêts (Sigg, 1992). Ces composés s'accumulent à la surface des feuilles entre deux événements pluvieux et sont mobilisés quand celle-ci est mouillée.

La proportion dépôt humide / sec dépend du temps, de la distance à la source, des conditions atmosphériques et des chutes de pluie précédentes. Ainsi, le flux d'acide dans le dépôt sec à partir de

l'air avec une concentration d'environ  $5 \mu\text{g SO}_2.\text{m}^{-3}$  est estimé équivalent à celui de 1000 mm de pluie de pH 4.36 - 4.6 (Howells, 1990).

### **I.2.1.2. Effets sur les écosystèmes aquatiques**

Les substances acides ou acidifiantes peuvent altérer directement la chimie de l'eau si elles sont déposées sur les surfaces des lacs et des ruisseaux ou indirectement acidifier la chimie de l'eau des lacs à partir de l'altération de la qualité des eaux de ruisseaux drainant le bassin versant terrestre recevant les dépôts acides.

#### **I.2.1.2.1. Influence du sol**

La minéralogie du substrat du bassin versant est un bon indicateur de la sensibilité des eaux. Ainsi, les eaux de surface drainant un bassin versant ayant un sol de type carbonaté (calcaire, dolomie) ne sont pas supposées s'acidifier car les minéraux du sol neutralisent rapidement les protons. A l'inverse, les eaux de bassins versants dépourvus ou très pauvres en composés carbonatés (granit, gneiss, schistes) ont un risque d'acidification car la capacité tampon de ces roches est très faible (Bricker et Rice, 1993). Le sol lui-même s'acidifie. En l'absence de carbonates, l'un des mécanismes majeurs de neutralisation des protons des sols met en jeu l'échange des protons contre des cations alcalins et alcalino-terreux (appelés «bases») attachés aux particules de ce sol (capacité d'échange cationique) (figure 11). Ces derniers sont drainés hors du sol, en association avec des anions tels que les sulfates, vers les eaux souterraines ou superficielles (Ravera, 1987). En plus des cations de base, des métaux toxiques tels que l'aluminium, le cadmium, le plomb et/ou le zinc sont mobilisés à partir des sols et lessivés par les eaux interstitielles.

Les réponses des eaux de surface à l'acidification sont variées. Pour un même apport d'acide, certains ruisseaux ou lacs ne montrent aucun changement, tandis que d'autres deviennent acidifiés. Les eaux faiblement tamponnées et de faibles concentrations ioniques sont les plus vulnérables aux entrées d'acides (Henriksen, 1985). De plus, la chimie des ruisseaux est fortement corrélée au sol qu'ils drainent (Herlihy *et al.*, 1993).

Une eau de surface peut être acidifiée selon deux modes (Bricker et Rice, 1993) :

- une acidification chronique causée par des dépôts acides sur une relativement longue période de temps
- une acidification épisodique causée par une réduction temporaire de la capacité de neutralisation des acides dans des lacs ou ruisseaux en réponse au dépôts acides humides (pluies ou fonte des neiges) qui se produisent dans une relativement courte période de temps.

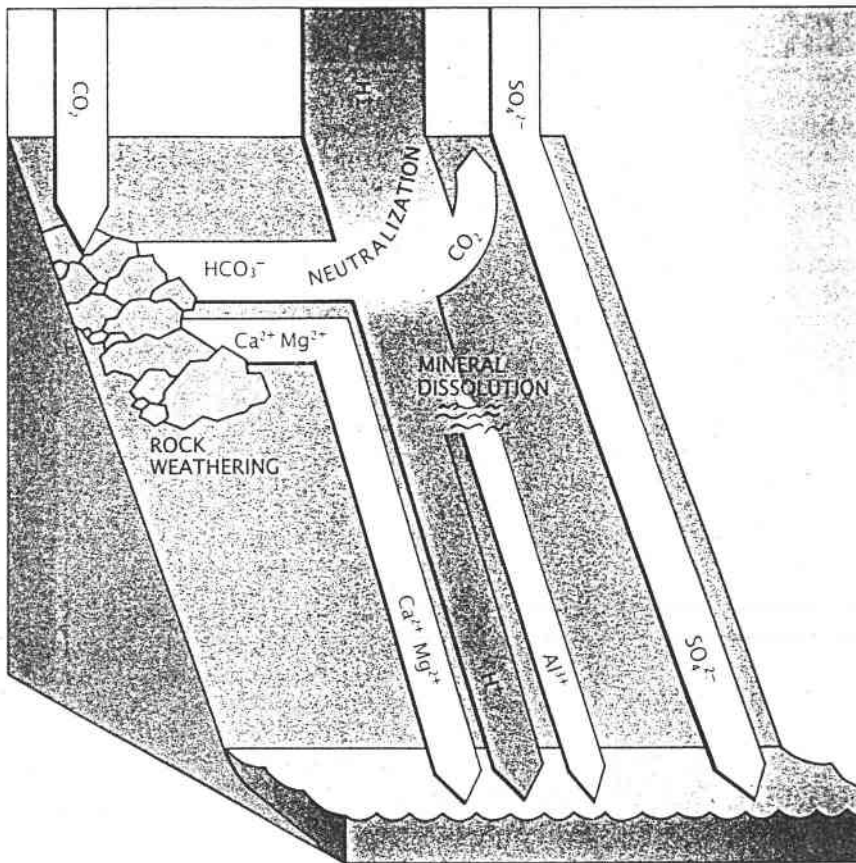


Figure 11 : Réactions se produisant lors des entrées d'acide sulfurique dans les sols (Mohnen, 1988).

#### I.2.1.2.2. Caractéristiques des eaux acidifiées

Les grands changements observés dans la physico-chimie des eaux concernent le pH, l'alcalinité, les concentrations en sulfates, nitrates et aluminium (Figure 12).

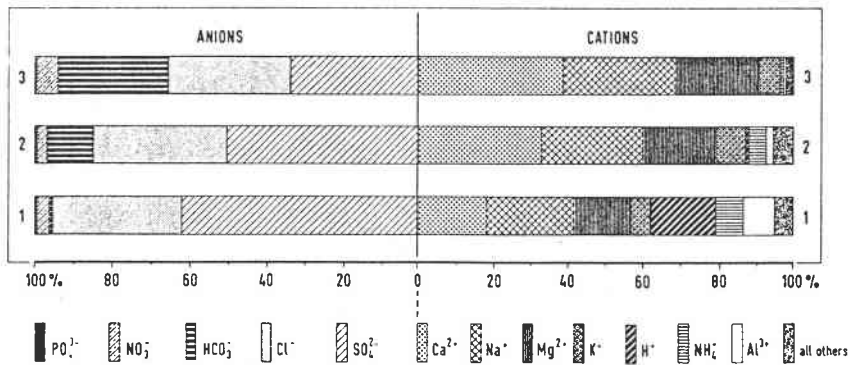


Figure 12 : Composition relative moyenne de trois groupes d'eau à faible force ionique avec différents pH (1 : pH ≤ 4.5 ; 2 : 4.5 < pH < 7.0 ; 3 : pH ≥ 7.0) (Leuven *et al.*, 1992).



## Le pH

En général, l'effet direct de l'acidification des écosystèmes aquatiques (ruisseaux ou lacs) est une baisse significative de pH (Ryan, 1989; Seip *et al.*, 1995). Cette augmentation est variable selon la région et le type d'écosystème et peut être plus ou moins marquée. Ainsi, le tableau VIII montre que certains cours d'eau peuvent atteindre des pH acides tels que 3.3. De nombreux auteurs s'accordent à dire qu'un cours d'eau est considéré comme acidifié dès que le pH atteint des limites inférieures aux valeurs qu'il aurait dans des conditions naturelles et inférieures à celles données par l'équilibre chimique.

Quoiqu'il en soit, le pH atteint n'est pas constant. Des variations saisonnières et épisodiques se produisent notamment dans des ruisseaux faiblement tamponnés. Ainsi, Gee et Stoner (1988) ont montré que la rivière Llyn Brianne (Grande-Bretagne) passe de 3.9 en hiver à 6.2 en été. De plus, des variations sont également observées le long du cours d'eau, la tête de bassin étant généralement plus acide.

## L'alcalinité

L'alcalinité appelée aussi ANC (Acid Neutralizing Capacity = capacité à neutraliser les acides) représente le pouvoir tampon d'une eau. Elle correspond à :

$$\text{Alcalinité (Alc)} (\mu\text{eq.l}^{-1}) = [\text{HCO}_3^-] + 2 [\text{CO}_3^{2-}] + [\text{OH}^-] - [\text{H}^+]$$

Pour la plupart des eaux naturelles,  $\text{HCO}_3^-$  est l'élément principal, et l'alcalinité peut s'exprimer par la relation :

$$\text{Alc} (\mu\text{eq.l}^{-1}) = [\text{HCO}_3^-]$$

Dans les eaux où le pH est inférieur à 6, la concentration en protons doit être prise en compte donnant l'expression de l'alcalinité suivante :

$$\text{Alc} (\mu\text{eq.l}^{-1}) = [\text{HCO}_3^-] - [\text{H}^+]$$

L'alcalinité peut être estimée par une titration directe avec l'addition d'acides forts (titration de Gran). Elle est utilisée comme index d'acidification des eaux de surface (Bricker et Rice, 1989). Elle dépend de plusieurs critères tels que la géologie du lit du cours d'eau, les caractéristiques du bassin versant, les caractéristiques hydrologiques, la climatologie et des caractéristiques chimiques de l'écosystème (concentrations en carbone organique dissous, procédés biologiques comme la dénitrification...etc) (Planas, 1996).

Tableau VIII : Caractéristiques physico-chimiques de divers lacs et ruisseaux situés dans des régions concernées par les problèmes d'acidification.

Auteurs	Pays / région	Milieus	pH	Alcalinité	Conductivité	SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>	NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	Ca <sup>2+</sup>	Aluminium
Unités				µeq.l <sup>-1</sup>	µs.cm <sup>-1</sup>	mg.l <sup>-1</sup>	mg.l <sup>-1</sup>	mg.l <sup>-1</sup>	mg.l <sup>-1</sup>
Canavan/ Siver	1994 Etats-Unis (Connecticut)	60 lacs	4.6-8.8	-30 - 2410	24 - 317	3.4 - 26.4		1.2 - 28.8	
Wojtan/Galas	1994 Pologne (Tatra)	8 lacs	5.5-6.5	60 - 130	18 - 24	4.1 - 5.2	0.4 - 0.9	2.2 - 4.0	
McNicol/Mallory	1994 Canada (Sudbury)	97 lacs	4.01-7.3	-90.6 - 689.5	21.2 - 91.9	3.6 - 15.7	0 - 0.17	1.0 - 10.8	0 - 1
Kopacek/ Stuchlik	1994 Slovaquie (Tatra)	8 lacs	4.8	< 0		5.1	1.9	1.5	
Driscoll/Van Dreason	1993 Etats-Unis (Adirondack)	17 lacs	4.22-6.92	-17 - 209		2.5 - 6.8	0 - 1.7	0.5 - 4.1	0.008 - 0.4
Leuven <i>et al.</i>	1992 Pays-Bas	lacs et ruisseaux	3.3-4.5	0 - 65		0 -	0 -	0 -	0.08 - 4
Mulholland <i>et al.</i>	1992 Etats-Unis (Adirondack)	4 ruisseaux	4.9-5.4	-6 - 11		4.5 - 5.2	0.3 - 0.5	0.8- 1.1	0.2 - 0.5
Stoddard/Murdoch	1990 Etats-Unis (Castkill)	7 ruisseaux	5.1-6.0	10 - 29		5.7 - 6.0	1.4 - 1.9	1.7 - 3.1	0.05 - 0.5
Guerold	1992 Vosges	34 ruisseaux	4.47-7.25		19-69.8	2.9-9.6	0.8-5.7	0.8-7.2	0.01 - 0.4
Meegan/ Perry	1996 Etats-Unis	1 ruisseau	4.2	0	28.5	6.6	0.2	0.7	0.5

En général les ruisseaux présentant une alcalinité inférieure à  $50 \mu\text{eq.l}^{-1}$  sont très sensibles à l'acidification (Herlihy *et al.*, 1993). Plus on se rapproche de 0 et plus l'acidification tend vers la chronicité. En effet, dans les eaux de surface, les dépôts acides réduisent l'alcalinité à zéro, avant de diminuer significativement la valeur du pH. La baisse significative de ce paramètre est donc une des caractéristiques de l'acidification d'un cours d'eau. (Bricker et Rice, 1993 ; McNicol et Mallory, 1994).

### Les concentrations ioniques

Le tableau VIII met en évidence que dans les eaux acidifiées, les sulfates sont les anions dominants. De très nombreuses études rapportent que l'augmentation des concentrations en sulfates caractérise une eau s'acidifiant (Nikolaidis *et al.*, 1989 ; Battoe et Lowe, 1992 ; Hornung et Reynolds, 1995)

Pour les nitrates, de nombreux auteurs n'ont pas observé d'augmentation de concentration significative (Seip *et al.*, 1995 ; Herlihy *et al.*, 1993). Toutefois, il semble que dans certaines régions, les nitrates commencent à devenir un élément non négligeable dans le processus d'acidification des cours d'eau (Murdoch et Stoddard, 1992 ; Gahnström *et al.*, 1993 ; Dewalle et Swistock, 1994). La part des nitrates provenant de l'agriculture est cependant difficile à déterminer.

Pour les cations, les eaux acidifiées oligotrophiques ont une concentration en calcium faible, souvent inférieure à la demande des organismes aquatiques.

### L'aluminium

Les concentrations en aluminium inorganique sont très élevées dans la plupart des ruisseaux acides. Herlihy *et al.* (1993) rapportent que 57 % des ruisseaux qu'ils ont étudié ont des concentrations supérieures à  $100 \mu\text{g.l}^{-1}$ , niveau d'aluminium fréquemment considéré comme toxique pour les poissons. L'interprétation de la toxicité de l'aluminium est difficile à cause de sa spéciation complexe qui est liée au pH, à la température et à la présence de ligands organiques ou inorganiques ( $\text{F}^-$ ,  $\text{OH}^-$ ,  $\text{SO}_4^{2-}$ ,  $\text{PO}_3^{4-}$ ,  $\text{H}_4\text{SiO}_4$ ) (Poléo, 1995). Lydersen (1990) illustre la relation température - pH - % hydroxydes d'aluminium (Figure 13).

L'aluminium total ( $\text{Al}_t$ ) inclut l'aluminium lié organiquement ( $\text{Al}_o$ ), l'aluminium présent dans les matières en suspension (rares dans les eaux acidifiées) et la forme la plus dangereuse écologiquement, l'aluminium dissous inorganique ( $\text{Al}_i$ ). Les concentrations en  $\text{Al}_i$  est la somme de  $\text{Al}^{3+}$  et de l'aluminium lié en complexes inorganiques,  $\text{AlF}_2^+$ ,  $\text{Al}(\text{OH})_2^+$  et  $\text{AlSO}_4^+$ . Les concentrations les plus fortes en  $\text{Al}_i$  sont trouvées dans les eaux acidifiées drainant des bassins versants ayant une faible capacité d'échange cationique (Vezely, 1994). A pH supérieur à 7, les espèces prédominantes sont

$\text{Al(OH)}_4^-$  tandis que dans des zones de pH 4,  $\text{Al}^{3+}$  domine. Entre ces deux zones de pH, la spéciation de l'aluminium est fonction de la composition du milieu (Campbell *et al.*, 1983).

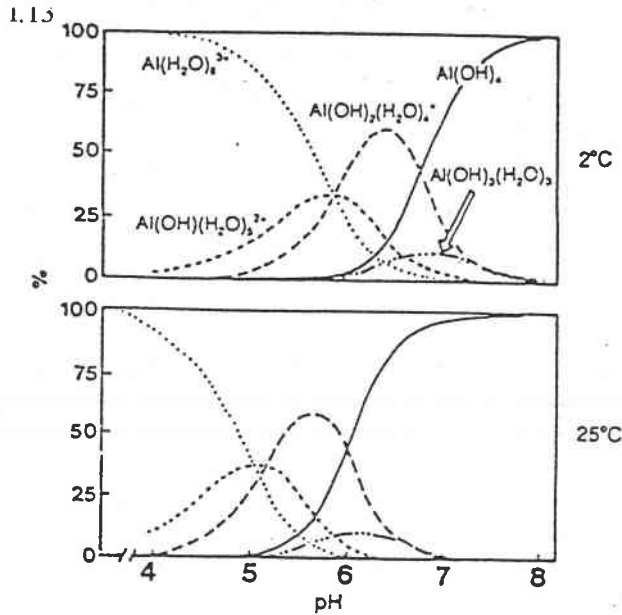


Figure 13 : Les différentes formes d'hydroxydes d'aluminium et leur distribution relative en fonction du pH et de la température (Lydersen, 1990).

Pour les poissons, il est généralement admis que les formes  $\text{Al}^{3+}$  et les complexes hydroxydes sont les plus toxiques. La complexation aux fluorures réduit la toxicité et les complexes organiques sont non toxiques. (Freda et McDonald, 1990).

#### L'acidification épisodique et l'acidification chronique

Un épisode acide est défini comme une réduction à court terme de l'alcalinité, observée dans des ruisseaux, rivières ou lacs pendant un événement hydrologique tel que la fonte des neiges ou un orage. Cette baisse est souvent associée à une réduction de pH et à des concentrations élevées en aluminium, sulfates et nitrates (Galloway *et al.*, 1987 ; Tranter *et al.*, 1994 ; Thies, 1994 ; Soulsby, 1995 ; Stoddard, 1995).

Pendant l'hiver et le printemps, les solutés atmosphériques s'accumulent dans la couverture neigeuse et sont relâchés pendant une relativement courte période de fonte. La phase initiale de cette dernière est caractérisée par un pic de concentrations de certains ions dû à leur élution préférentielle, la séquence étant selon Jeffries (1990)  $\text{SO}_4^{2-} > \text{NO}_3^- > \text{H}^+ > \text{Cl}^-$ .

Tranter *et al.* (1986) expliquent les mécanismes de cette élution préférentielle selon deux modes. D'une part, les cristaux de glace et la distribution non homogène des solutés dans la neige produisent des eaux de fonte de différentes compositions en fonction du temps et, d'autre part, pendant

la percolation de l'eau de fonte dans la couverture neigeuse, des affinités différentes entre la neige et les ions peuvent exister.

La seconde phase de la fonte est caractérisée par la dilution ionique importante des cours d'eau. En effet, comme les premiers effluents de la masse neigeuse sont hautement enrichis en ions, le reste de l'eau de fonte contient peu d'ions pour beaucoup d'eau. Johannessen *et al.* (1980) a montré que au moins 50 % du contenu originel en  $H^+$  et  $SO_4^{2-}$  du tas de neige est élué avec seulement 10% de l'eau le composant. Les concentrations en solutés dans les cours d'eau baissent alors dramatiquement pendant les quelques jours qui suivent la fonte initiale (alcalinité  $< 50 \mu eq.l^{-1}$ ) (Rascher *et al.*, 1987).

Pendant un orage, les phases sont similaires. En effet, les ruisseaux peuvent montrer une diminution de l'alcalinité due à l'addition de solutés tels  $H^+$ ,  $SO_4^{2-}$ ,  $NO_3^-$  et à l'augmentation du volume d'eau pendant cet événement (O'Brien *et al.*, 1993 ; Soulsby, 1993).

#### I.2.1.2.3. Effets sur la biocénose

Dans cette partie, seuls les effets sur les structures des principales communautés aquatiques sont décrits. Les causes ayant entraîné ces changements seront détaillées dans la suite de ce document.

##### Les effets de l'acidification sur le phytoplancton

L'acidification des eaux de surface entraîne un changement dans la structure de la communauté phytoplanctonique caractérisé en général par une diminution du nombre d'espèces présentes (Stokes, 1986). Nicholls *et al.* (1992) observent l'existence de relations bien définies entre l'alcalinité du lac, son pH et le nombre total de taxons phytoplanctoniques. Toutefois, alors que certaines espèces disparaissent, d'autres deviennent relativement abondantes (Dillon *et al.*, 1984).

Les Dinoflagellés tels *Peridinium* et *Gymnodinium*, espèces particulièrement acido-tolérantes, augmentent en nombre dans les eaux acidifiées (Brettum, 1994).

##### Les effets de l'acidification sur le zooplancton

La tendance observée dans la communauté zooplanctonique exposée à des eaux acidifiées est une diminution de la richesse spécifique (Brett, 1989). Marmorek (1984) conclut que des changements significatifs se produisent rapidement dans la structure de la population zooplanctonique dès un pH  $< 5.0$ . Ces différences se caractérisent notamment par une diminution de 40 à 80 % du nombre d'espèces. Toutefois, toutes les espèces ne se comportent pas de façon similaire. Ainsi, l'ordre des Cladocères

apparaît avoir un grand nombre de représentants acido-sensibles, essentiellement dans la famille des Daphniidés (Keller et Pitblado, 1984). A l'opposé, les Copépodes et les Chaoboridés semblent supporter relativement bien ces conditions (Morling et Pejler, 1990 ; Auclair *et al.*, 1993). Pinel-Alloul (1987) et Siegfried *et al.* (1989) signalent un certain nombre d'espèces de Rotifères également acido-tolérantes.

#### Les effets de l'acidification sur le périphyton

La production primaire algale et la biomasse ne diminuent généralement pas avec l'acidification des eaux de surface. Des augmentations dans la biomasse sont même souvent observées dans le littoral des lacs et dans les rivières (Parent *et al.*, 1986 ; Planas *et al.*, 1989). Toutefois, ces augmentations sont généralement accompagnées de changements dans la composition de la communauté et d'une diminution dans la richesse spécifique. Certaines algues tolèrent sans difficulté les conditions acides et prolifèrent. Les blooms d'algues vertes filamenteuses telles *Mougeotia* et *Zygonium* sont fréquemment observés (Vandermeulen *et al.*, 1993 ; Turner *et al.*, 1995). Les Diatomées ont été rapportées comme un groupe acido-tolérant et, cette tendance a été exploitée dans les études paléolimnologiques qui tentent de reconstituer les processus passés d'acidification des lacs (Birks, 1990 ; Dixit *et al.*, 1992). Les Cyanophycées sont parmi les algues benthiques les plus sensibles à l'acidification (Planas, 1996).

#### Les effets de l'acidification sur les macroinvertébrés

Un résultat fréquent observé lors de l'acidification des cours d'eau est une réduction progressive de la richesse taxonomique des invertébrés. Cependant, la perte des espèces acido-sensibles est remplacée par quelques taxons acido-tolérants (Ravera, 1987). L'augmentation en nombre des espèces plus résistantes peut être l'effet combiné de la compétition réduite avec les espèces les plus sensibles et de la prédation réduite (voir abolie) par les poissons, qui souvent, sont moins résistants aux faibles pH que les organismes benthiques.

Kratz *et al.* (1994) ont montré que les réponses observées lors d'une acidification chronique se retrouvent pour une acidification épisodique. De plus, il semblerait que le rapide déclin de pH (avec augmentation concomitante de métaux) associé aux événements épisodiques peut être plus grave qu'une exposition chronique. Une baisse de pH pendant 6 à 24 h a été suffisante à Merrett *et al.* (1991) pour mettre en évidence des réponses significatives dans la communauté d'invertébrés.

Une grande différence de sensibilité est observée dans les espèces d'un même ordre mais aussi, dans une même espèce entre les différents stades de développement.

## Les insectes

Les Ephémères représentent l'ordre des insectes le plus sensible (Raddum et Fjellheim, 1984). Cependant, certaines familles dans cet ordre supportent des eaux avec des pH acides notamment des Leptophlebiidés, des Heptageniidés et des Ephemerellidés (Engblom et Lingbell, 1984).

Chez les Trichoptères, la sensibilité est variable selon les familles considérées. Ainsi, les familles des Limnephilidés, des Polycentropodidés et des Rhyacophilidés sont beaucoup plus acido-tolérantes que les Hydropsychidés et les Philopotamidés qui disparaissent des cours d'eau ayant un pH inférieur à 6 (Sutcliffe et Carrick, 1973 ; Havas et Hutchinson, 1982).

Les Plécoptères semblent relativement acido-tolérants, sauf pour les familles des Perlidés et des Perlodidés.

Chez les Diptères, les effectifs de Chironomidés et de Simulidés restent importants à des pH de l'ordre de 3.0 - 4.0.

Des Hétéroptères prédateurs tels que les Notonectidés et les Corixidés sont communs à des pH inférieurs à 5.0 (Howells, 1990).

## Les crustacés

Les crustacés représentent une classe très sensible aux conditions acides. Toutefois, la sensibilité est variable selon les espèces. Berrill *et al.* (1987) confirment cette différence interspécifique. En effet, dans un lac avec une eau ayant un pH de 5.1, il note que la population d'*Oronectes sp.* est presque totalement éliminée alors que *Cambarus robustus* est encore bien représentée. Parmi le groupe des espèces acido-sensibles se trouve *Astacus astacus* (Appelberg, 1985).

Pour une même espèce d'écrevisse, Malley (1980) montre que les oeufs et les juvéniles sont des stades plus sensibles que celui d'adulte, et que la mue est une étape du développement qui est souvent ratée.

Dans cette classe, la plupart des Amphipodes et autres crustacés Malacostracés sont très sensibles aux eaux douces acides. Ainsi, *Gammarus sp.* n'est plus trouvé dans des eaux ayant un pH inférieur à 5.6. Les isopodes, *Asellus sp.* sont un peu plus tolérantes car elles sont encore relativement abondantes dans les cours d'eau dont le pH est compris entre 4.8 et 5.5, mais beaucoup moins entre 4.3 et 4.8 (Dillon *et al.*, 1984).

## Les mollusques

Le nombre d'espèces dans l'embranchement des mollusques est significativement diminué avec l'acidification des eaux douces ; la classe des Bivalves apparaissant moins sensible que celle des Gastéropodes.

Ainsi, ces derniers ne sont plus signalés dans des lacs avec un pH inférieur à 5.2, alors que pour les Bivalves, cette observation n'est faite que dans des eaux dont le pH descend à 4.7 (Ravera, 1987).

#### Les effets de l'acidification sur les poissons

L'acidification des rivières et des lacs a causé un déclin important dans le stock de poisson présent (Hindar *et al.*, 1994). Toutefois, la réaction des communautés de poisson à l'acidification dépend de plusieurs facteurs tels la complexité de la communauté piscicole, le stade d'acidification du milieu étudié, la vulnérabilité de l'espèce. Cette dernière est fonction de l'âge, de la taille, de l'origine génétique des poissons et de leur degré d'acclimatation. De même, la possibilité d'invasion des niches écologiques par des espèces tolérantes influe sur la réponse de la communauté piscicole face à l'acidification du milieu.

Les études réalisées montrent que les familles de Salmonidés et de Cyprinidés sont les plus sensibles (Mason, 1989 ; Gunn et Keller, 1990). A l'opposé, les perches, *Perca fluviatilis* et *Perca flavescens* sont acido-tolérantes (Kuoppamäki, 1993 ; Ek *et al.*, 1995).

Dans une même espèce, la sensibilité est différente en fonction des stades de développement. Les stades vésiculés et vésicule résorbée présentent un taux de mortalité très important (Sayer *et al.*, 1993).

#### Les effets de l'acidification sur les amphibiens

De nombreuses études ont été réalisées sur les populations d'amphibiens afin d'expliquer les diminutions observées dans les effectifs. Une des causes majeures mise en évidence est que le recrutement de la population adulte est restreint. Des travaux appliqués aux différents stades de développement des amphibiens expliquent ce phénomène.

Au premier niveau, la fécondation est réduite chez de nombreuses espèces d'amphibiens (Beattie et Tyler-Jones, 1992 ; Grant et Licht, 1993). Le stade embryonnaire qui suit est le plus sensible aux eaux acidifiées (Horne et Dunson, 1995). Ainsi, l'exposition à un tel milieu peut entraîner des anomalies sérieuses et souvent fatales du développement pendant cette phase. Les larves apparaissent plus tolérantes que les embryons, mais des études montrent qu'un faible pH réduit leur croissance et leur taux de survie (Clark et Lazerte, 1987 ; Freda et McDonald, 1990 ; Preest, 1993 ; Bradford *et al.*, 1994). Les causes à l'origine de ces troubles ne sont pas clairement déterminées car, si certaines études de terrain démontrent clairement la toxicité de l'aluminium pour les amphibiens (Clark et Lazerte, 1987 ; Freda et McDonald, 1990), d'autres ne montrent aucune corrélation entre l'aluminium et la mortalité embryonnaire ou l'abondance d'amphibiens (Gascon et Planas, 1986).



### I.2.1.3. Situation dans les Vosges

En France, les Vosges sont particulièrement affectées par les problèmes d'acidification. Dès les années 80, suite aux précipitations acides dans cette région, des ruisseaux ont présenté une physico-chimie caractéristique des cours d'eau acidifiés : pH acide, concentrations en sulfates et en aluminium élevées (Massabuau, 1985 ; 1987). Plusieurs facteurs ont contribué à ce déséquilibre. La présence de roches silicatées pauvres, de sols acides, de forêt de résineux, ainsi que des ruisseaux à l'origine faiblement tamponnés, très peu minéralisés n'ont pu neutraliser les apports acides. Probst *et al.* (1995) ont cartographié l'état d'acidification des cours d'eau vosgien (Figure 14 a) ainsi que les changements dans l'alcalinité de ces ruisseaux (Figure 14 b).

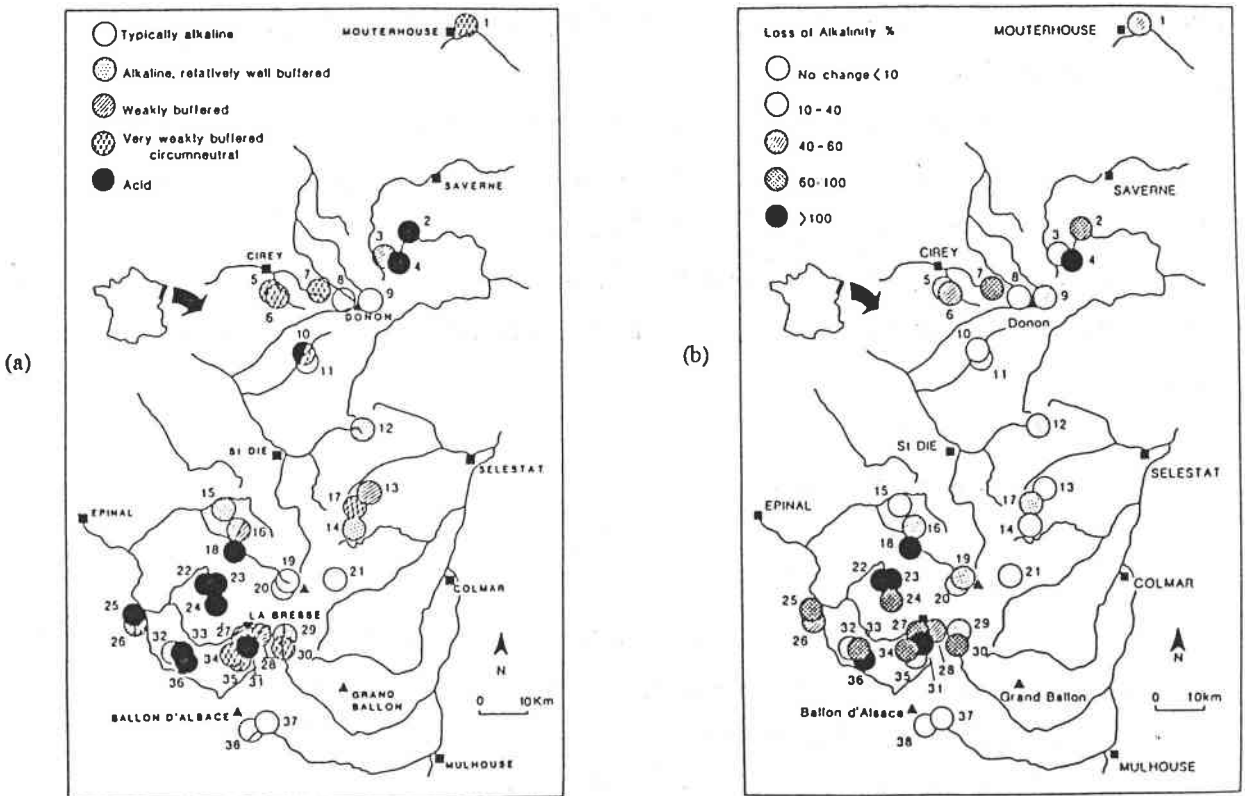


Figure 14 : a : carte de l'état d'acidification des cours d'eau vosgiens

b : carte du changement de l'alcalinité dans les cours d'eau vosgiens (Probst *et al.*, 1995).

De nombreuses études ont été réalisées aux niveaux de différents compartiments :

- les algues dulçaquicoles et les pluies acides (Dehbi-zebboudj, 1989),
- les poissons et le comportement de l'aluminium dans leur organisme (Galle, 1992),
- la géologie du bassin du Rouge-Rupt (Mansuy, 1992),
- les macroinvertébrés et l'impact de l'acidification sur leurs peuplements (Guérol, 1992).

Tous les groupes faunistiques majeurs sont affectés par ces conditions physico-chimiques. Parmi ceux-ci, les Crustacés, les Mollusques et les Ephéméroptères disparaissent complètement ; les Trichoptères, les Diptères, les Coléoptères et les Plécoptères présentent également une diminution de leur richesse (Guérol, 1993).

Actuellement, une étude portant sur l'évaluation de l'état d'acidification des cours d'eau du département des Vosges est en cours (Boudot *et al.*, 1996 ; Guérol *et al.*, 1997).

## **I.2.2. Les stratégies pour le rétablissement des eaux de surface acidifiées**

Deux approches peuvent être envisagées afin de lutter contre les problèmes liés à l'acidification. L'une s'attaque aux causes mêmes de l'acidification et repose sur le contrôle des émissions des polluants précurseurs d'acides avec la notion de charge critique ; l'autre consiste à restaurer ou à protéger des systèmes affectés par les dépôts acides. Ces deux approches peuvent être employées de concert. En effet, dans les régions avec une altération géologique lente, malgré la réduction des apports acides, la qualité de l'eau ne s'améliore pas assez rapidement et, l'apport de substances neutralisantes accélère le processus de rétablissement.

La mise en œuvre de ces deux approches entraîne une amélioration de la qualité de l'eau associée à un rétablissement de la biocénose.

### **I.2.2.1. Lutte contre les causes de l'acidification**

#### **I.2.2.1.1. Réduction des émissions**

Il est maintenant généralement admis que les changements dans la composition chimique des précipitations pendant les dernières décennies sont les causes majeures de l'acidification des eaux douces dans les régions exposées. Le chaulage des sols, lacs et rivières acidifiées n'offrent qu'une solution régionale au problème de l'acidification. Ce ne sont pas les symptômes, mais les causes qu'il faut attaquer. A long terme, les effets de l'acidification peuvent être réduits seulement par la réduction des précurseurs d'acides.

Ainsi, dans les années 80, les scandinaves ont initié des mesures pour obtenir une réduction de 30 % de l'émission nationale de soufre pour 1993. De nombreux pays européens, ainsi que le Canada ont rejoint le "club des 30 %" ainsi appelé (Henriksen, 1985). Le développement du concept de la charge critique et de la cartographie associée a permis d'envisager des réductions supplémentaires dans l'émission des polluants acides basée sur l'aspect non plus uniquement quantitatif, mais aussi qualitatif par rapport à l'écosystème (voir § I.2.2.1.2.). Le nouveau protocole signé à Oslo en juin 1994 vise à obtenir des réductions supplémentaires dans les émissions de soufre (Gough *et al.*, 1994).

Dans de très nombreuses régions du monde, une réduction effective des émissions de  $\text{SO}_x$ , précurseurs d'acides a ainsi été réalisée. Ainsi, par exemple, en Ecosse et Angleterre, Soulsby *et al.* (1995) rapporte une diminution des dépôts acides. De même, Ek *et al.* (1995) observent en Suède en 1993, une diminution de 30 à 40 % des dépôts atmosphériques de sulfates comparés à ceux de 1960. Au Canada, en Ontario, les émissions de  $\text{SO}_2$  ont diminué dans ces dernières années d'une moyenne de  $2.2 \times 10^6$  tonnes par an, pour la période 1950 - 1972, à 0.65 tonnes pour la période 1979 - 1983, soit 70 % de réduction (Figure 15) (Schindler, 1987 ; Locke *et al.*, 1994). De même, au Québec, des réductions significatives dans les dépôts de  $\text{SO}_4^{2-}$  sont mesurées (Bouchard, 1997).

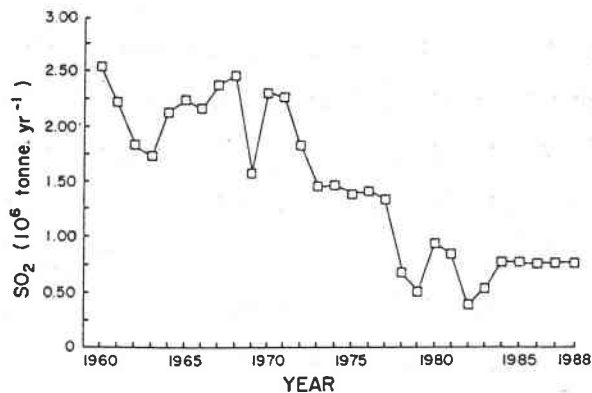


Figure 15 : Emissions de  $\text{SO}_2$  dans la région de Sudbury pendant la période 1960 - 1988 (Keller, 1992b).

Malheureusement, les sulfates diminuant dans les pluies acides ont été remplacés par les nitrates. En effet, les émissions de  $\text{NO}_x$  ont augmenté pendant les dernières décennies (Psenner, 1994, Sullivan *et al.*, 1997) entraînant des concentrations plus importantes dans les lacs et les rivières. Les effets de ces variations sont mitigés. Certains auteurs, tels que Ek *et al.* (1995), signalent que malgré la tendance à l'augmentation des dépôts azotés depuis les dernières décennies, ils ne contribuent pas encore à l'acidification des lacs. D'autres, tels que Newell et Skejvelkvale (1997), concluent que l'augmentation des nitrates dans certains sites pourrait être responsables du fait que ces derniers ne présentent pas l'amélioration physico-chimique attendue suite aux réductions dans les émissions d'oxyde de soufre.

Le suivi de la réponse de la chimie des ruisseaux et de la biologie aquatique suite aux programmes de réduction d'émission est important puisque de telles stratégies sont basées sur l'espérance que des améliorations dans la qualité de l'eau vont en résulter. Cependant, l'évidence pour la réversibilité de l'acidification de l'eau et le rétablissement de la biologie des ruisseaux dans les zones acido-sensibles de l'Europe est ambiguë. Certaines zones montrent une récupération biologique, d'autres montrent la réversibilité mais pas de rétablissement, et d'autres ne montrent rien.

### I.2.2.1.2. Notion de charge critique

La stratégie de lutte contre les causes de l'acidification décrite ci-dessus est donc basée sur des considérations quantitatives, notamment avec le club des 30 %. Cette approche a été par la suite améliorée avec le concept de charge critique. Celui-ci utilise une mesure relative de la sensibilité de l'écosystème pour estimer les effets environnementaux apportés par la réduction des émissions. Ainsi, la charge critique pour un écosystème est définie comme : "le dépôt maximum de composés acidifiants qui ne causera pas de changements chimiques conduisant à long terme à des effets nuisibles sur la structure de l'écosystème et sa fonction". Le calcul de la charge critique est donc un outil important pour estimer les niveaux acceptables de dépôts acides à travers les différentes zones d'une région pouvant être tolérés sans dommages à long terme. Elles sont calculées séparément pour les sols (Kurz *et al.*, 1995), les eaux souterraines ou les eaux de surface (Henriksen *et al.*, 1992) et différent pour une catégorie donnée, d'un site à un autre ; cela dépendant de la sensibilité inhérente de l'écosystème.

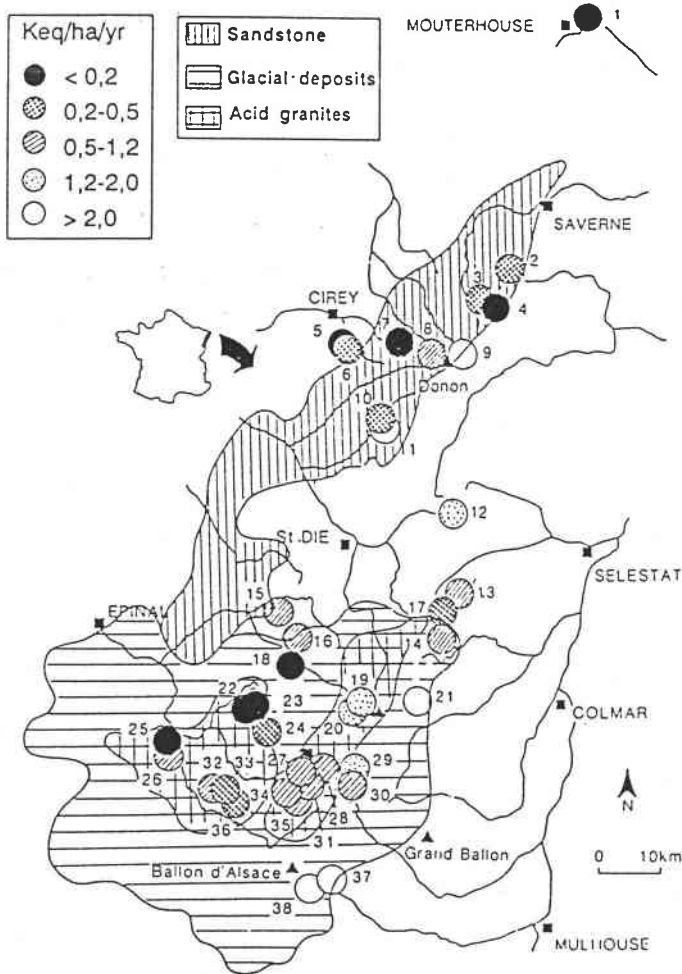


Figure 16 : Carte des charges critiques d'acidité dans les eaux des ruisseaux vosgiens et zone de sensibilité correspondante (Party *et al.*, 1995).

Ainsi, si un écosystème présente une capacité naturelle limitée à neutraliser les polluants, la charge critique est faible. A l'opposé, les zones qui résistent sans problème aux dépôts de polluants présentent une charge critique élevée (Hettelingh *et al.*, 1992). Cette dernière est aussi calculée séparément pour des polluants déterminés tels que les composés soufrés ou azotés (Jeffries et Lam, 1993 ; De Vries, 1993 ; Bobbink et Roelofs, 1995). Toutefois, Posch *et al.* (1997) préconisent de les considérer ensembles car leurs charges critiques sont corrélées, puisque ce sont les dépôts de ces deux éléments qui contribuent à l'acidification des eaux de surface.

Dans de nombreux pays d'Europe, les charges critiques d'acidité ont été calculées et cartographiées ces dernières années (Marchetto *et al.*, 1994 ; Moiseenko, 1994 ; Mill, 1995). En France, Party *et al.* (1995) proposent la carte des charges critiques pour les ruisseaux vosgiens et les zones de sensibilité correspondante (Figure 16).

### **I.2.2.2. Lutte contre les effets de l'acidification**

Le chaulage des eaux de surface est une méthode employée de nos jours dans de nombreux pays ayant des problèmes d'acidification des eaux de surface. Les études réalisées sur ces sites montrent que ce moyen de lutte est efficace dans certaines limites.

Un important travail de synthèse a été réalisé sous la direction de Henrikson et Brodin (1995). Il présente les différentes méthodologies avec leurs avantages et leurs inconvénients, ainsi que les résultats obtenus par les différentes équipes de recherche en Suède.

Les effets attendus d'un amendement sont les suivants :

- neutralisation de l'acidité et reconstitution d'une réserve alcaline normale,
- précipitation des métaux lourds avec une forte diminution conséquente dans la toxicité pour la biocénose présente et pour les potentiels recolonisateurs,
- accroissement de la nitrification de l'ammoniaque résiduelle,
- reconstitution d'une communauté animale plus riche.

#### **I.2.2.2.1. Les différents types d'amendement**

Pour atténuer les effets de l'acidification, différents produits ont été proposés ou utilisés pour la neutralisation de l'eau (Fordham et Driscoll, 1989 ; Dickson, 1987).

Même s'il existe des variations selon le produit ajouté, une tendance générale à l'amélioration de la qualité de l'eau est observée. En effet, la conséquence immédiate d'addition de base est une augmentation de pH. Evidemment, la magnitude de l'augmentation du pH initial est dépendante des caractéristiques et de la concentration de l'agent utilisé, de son mode d'application ainsi que de la

chimie des eaux de surface. De plus, il faut éviter l'emploi de composés telle que la chaux éteinte car sa grande solubilité provoque une très rapide augmentation de pH à des valeurs supérieures à 9, ce qui provoque un choc de pH et augmente la toxicité de certains métaux, tels que l'aluminium, pour la biocénose.

#### Le carbonate de calcium

C'est l'agent neutralisant le plus fréquemment utilisé, surtout sous forme de poudre (Fordham et Driscoll, 1989 ; Fjellheim, 1995). Le pH final obtenu après l'ajout de ce produit dépend de la chimie initiale de l'eau de surface (température, pH, etc.), de la taille des particules de carbonate de calcium, des impuretés (ex: Mg) dans le produit et du temps de contact avec l'eau. De plus, la présence de métaux (Al et Fe) et le carbone organique dissous influencent aussi le résultat (Fordham et Driscoll, 1989). L'avantage de ce produit est sa dissolution lente qui évite une augmentation trop brutale de pH et procure ainsi une source d'alcalinité plus longue (Weatherley, 1988). De plus, il est efficace, facile à manipuler et peu cher (Henriksen *et al.*, 1995).

#### Le carbonate de sodium

Ce produit a été fréquemment utilisé, notamment en Suède. Deux inconvénients le caractérisent. D'une part, il est plus cher que la chaux et d'autre part, ce traitement n'augmente pas la concentration en ions calcium qui peuvent atténuer la toxicité des métaux à pH faible ou élevé.

Par contre, au contraire de la chaux, sa dissolution est totalement indépendante du pH et, il agit plus longtemps par relargage graduels d'ions bases à partir des sédiments dans la colonne d'eau. Il provoque également un relargage de phosphore à partir des sédiments, effet pouvant stimuler la productivité biologique (Lindmark, 1990 ; 1993).

#### I.2.2.2.2. Les différentes stratégies d'application

Pour les lacs, un épandage de produits très finement divisés peut être réalisé à partir de containers suspendus à des hélicoptères (Hindar *et al.*, 1996). Une autre approche est de traiter le sédiment du fond du lac plutôt que l'eau de surface, ce qui met à profit la propriété d'échanges ioniques des sédiments. Le produit peut être injecté dans les sédiments soit sous forme de solution, soit immergé sous forme de briquettes. Ces deux techniques sont équivalentes du point de vue résultat, mais la deuxième est beaucoup plus facile à réaliser (Lindmark, 1990 ; 1993).

Pour les eaux courantes, des tentatives de neutralisation ont été faites en déversant des grandes quantités de calcaire ou de coquilles calcaires sur le lit du cours d'eau. Ces substrats calcaires peuvent être localement efficaces, mais ils apparaissent être rapidement sans action et inadéquates en période de fort courant et de faibles températures. De plus, des précipitations d'hydroxydes d'aluminium et de fer peuvent se produire immédiatement en aval des emplacements (Weatherley, 1988). Hall *et al.* (1994) proposent un doseur automatique à adapter sur le cours d'eau (Figure 17). D'une manière générale, le bassin versant lui même peut être chaulé. Mais, pour des raisons économiques, cela a été peu utilisé.

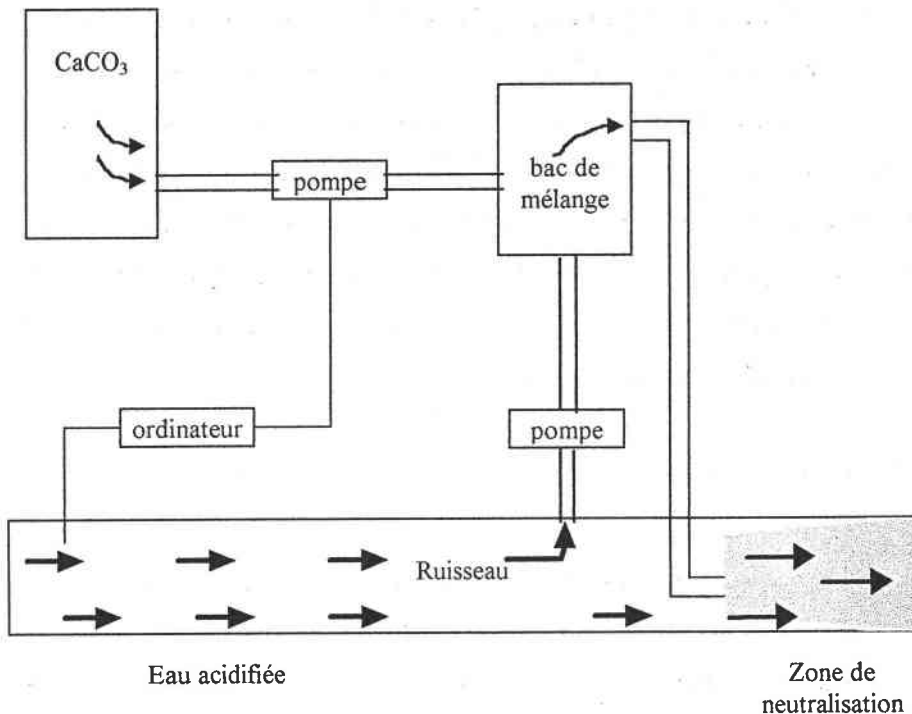


Figure 17 : Schéma d'un doseur de carbonate de calcium en poudre automatique (Hall *et al.*, 1994).

#### I.2.2.2.3. Les limites du traitement : la réacidification

Les apports d'eaux acides, à partir des précipitations, ruisseaux et eaux de source dans les lacs ou autres ruisseaux traités causent une réacidification à ce niveau. Une éventuelle détérioration de la qualité de l'eau peut alors être observée. Le taux de réacidification est donc à prendre en compte pour les différentes stratégies d'application de base, car cela régule la durée et l'efficacité du traitement.

Les eaux de surface devraient être chaulées avant qu'elles n'atteignent les lacs car la réacidification qui se produit au niveau de leur arrivée tue la flore et la faune qui s'était réadaptée après le chaulage du lac, mais provoque aussi, la dissolution à des niveaux toxiques des métaux qui étaient précipités (Dickson *et al.*, 1995).

Le relargage à long terme de calcium à partir du carbonate de calcium déposé dans les sédiments après le traitement apparaît être un procédé important pour retarder le taux de réacidification (Driscoll *et al.*, 1989b).

### I.2.2.3. Effets des différentes stratégies sur la chimie des eaux de surface

Après réduction des émissions :

Des études récentes ont démontré que des lacs et ruisseaux affectés par des précipitations acides peuvent montrer des qualités d'eau améliorées suivant la réduction dans les émissions et les dépôts des polluants acidifiants (McNicol et Mallory, 1994). Dans des régions telles que le Canada, les réductions dans les émissions de SO<sub>2</sub> ont provoqué rapidement (< 10ans) le rétablissement des lacs acidifiés aidées en cela par le haut taux d'altération des roches dans cette zone (Tableau IX). Dans les zones acido-sensibles telles que la Scandinavie et l'Ecosse où les taux d'altération des roches sont plus faibles, la récupération semble être plus lente (Ek *et al.*, 1995).

Tableau IX : Données sur la qualité de l'eau du lac Whitepine (Canada) pendant les années 1980-1988 (Gunn et Keller, 1990). Les moyennes annuelles sont calculées à partir de données mensuelles obtenues par des échantillons collectés dans l'épi- et le méta-limnion.

	SO <sub>2</sub> émis x10 <sup>6</sup> kg*	pH	alcalinité µeq.l <sup>-1</sup>	Conductivité µmho.cm <sup>-3</sup>	Ca µeq.l <sup>-1</sup>	SO <sub>4</sub> µeq.l <sup>-1</sup>	Al total µg.l <sup>-1</sup>
1980	935	5.4 (5.3 - 5.8)	1 ± 5	37 ± 2	156 ± 18	237 ± 20	69 ± 20
1981	837	5.7 (5.6 - 5.8)	4 ± 2	35 ± 1	145 ± 31	235 ± 12	59 ± 21
1982	389	5.8 (5.8 - 5.9)	10 ± 4	36 ± 2	138 ± 17	218 ± 20	44 ± 15
1983	538	5.8 (5.7 - 5.8)	8 ± 3	32 ± 1	123 ± 5	198 ± 22	36 ± 12
1984	767	5.8 (5.7 - 5.8)	8 ± 2	32 ± 2	125 ± 10	198 ± 24	40 ± 15
1985	769	5.8 (5.7 - 5.9)	12 ± 4	31 ± 1	119 ± 13	195 ± 4	50 ± 11
1986	725	5.9 (5.8 - 5.9)	12 ± 4	29 ± 1	120 ± 9	177 ± 17	34 ± 10
1987	730	6.0 (5.9 - 6.1)	15 ± 1	30 ± 4	115 ± 13	196 ± 23	26 ± 11
1988	718	5.9 (5.9 - 6.0)	11 ± 3	30 ± 4	115 ± 6	195 ± 10	40 ± 14

\* Les moyennes annuelles pour les émissions de SO<sub>2</sub> avant l'étude était de 2241.10<sup>6</sup> kg entre 1960 et 1965, de 1867.10<sup>6</sup> kg entre 1970 et 1974 et de 1064.10<sup>6</sup> kg entre 1975 et 1979.

Au niveau de la physico-chimie de l'eau, l'amélioration se traduit par la diminution des concentrations en sulfate (McNicol et Mallory, 1994 ; Johannessen, 1995). Ces réductions vont de 20 % dans certains lacs de Suède à 62 % dans des lacs du Canada situés à proximité de fonderies ayant fermé. De même, une diminution notable dans les concentrations en ions hydrogène a été mesurée et se traduit par une augmentation de pH pouvant aller de 0.4 à 1.7 unités pH (Forsberg *et al.*, 1985 ; Schindler, 1987). L'alcalinité elle-aussi augmente (Soulsby *et al.*, 1995).



Schindler (1987) observe une tendance à la réduction des teneurs dans les métaux traces, aluminium, cuivre, nickel et zinc. Cependant, en ce qui concerne les deux premiers éléments, cela est probablement largement dû au dépôt réduit de métaux plutôt qu'à un procédé chimique dans le lac. Cela est confirmé par Ek *et al.* (1995) qui n'ont pas mesuré de changement dans les concentrations en aluminium.

Après amendement :

Les effets sont considérés comme positifs quand la physico-chimie des lacs chaulés se rapproche de celle de lacs naturels non pollués. Ainsi, après une période déterminée par divers facteurs (produit employé, niveau d'acidification, etc.), il apparaît que, dans la plupart des cas, le pH augmente ainsi que l'alcalinité (Eggleton *et al.*, 1996 ; Hindar *et al.*, 1996 ; Schindler, 1997). Une augmentation des concentrations en calcium (Roelofs *et al.*, 1994 ; Nisbet, 1993) et en sodium (Figure 18) a été observée, mais est bien évidemment corrélée au produit neutralisant utilisé (Lindmark, 1993).

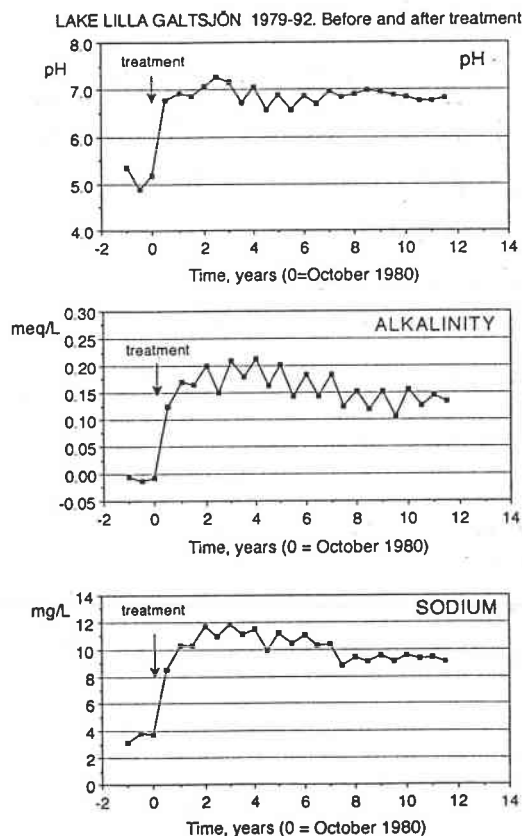


Figure 18 : Valeurs de pH, alcalinité et concentrations en sodium mesurées avant et après traitement avec du carbonate de sodium dans le lac Lilla Galtsjön (Suède) (Lindmark, 1993).

Une diminution de la concentration des métaux traces, aluminium, manganèse et zinc est également observée (Driscoll *et al.*, 1989a). La baisse de la concentration en aluminium peut être due au changement dans la spéciation, résultant dans la précipitation des hydroxydes d'aluminium et/ou dans l'adsorption de l'aluminium aux particules de chaux en suspension. Dans d'autres cas, la forme prédominante de l'aluminium serait non labile et apparemment non toxique (Weatherley *et al.*, 1989). Dickson (1987) note une baisse des niveaux de NO<sub>3</sub> et une augmentation des niveaux de phosphore.

Dans les deux stratégies de traitement, si l'on ne considère pas la notion du temps, il semble que la chimie de l'eau montre une récupération similaire se traduisant pour les principales améliorations par une remontée du pH et de l'alcalinité ainsi que d'une diminution des concentrations en sulfates.

#### **I.2.2.4. Effets de la récupération physico-chimique des eaux de surface sur la biocénose**

##### **I.2.2.4.1. Phytoplancton**

Immédiatement après le traitement, certains auteurs ont signalé une diminution dans la communauté phytoplanctonique. Ainsi, Bukaveckas (1989) observe une réduction des concentrations en chlorophylle d'environ 50 % dans les 3 ou 4 jours suivant le traitement et de 25 % après 10 ou 11 jours. Correspondant à ces changements dans la chlorophylle, une baisse significative dans la densité du phytoplancton est signalée. Cela est probablement dû aux rapides changements se produisant dans la physico-chimie (rapide augmentation de pH, changement dans la spéciation des métaux).

Malgré le fait que la biomasse phytoplanctonique soit initialement réduite par le chaulage, un rétablissement se produit dans les mois suivant, atteignant souvent des niveaux plus élevés. De très nombreuses études ont mis en évidence une augmentation du nombre de taxons qui accompagne l'amélioration de la qualité de l'eau (Schindler, 1987 ; Nicholls *et al.*, 1992). Des espèces qui étaient absentes avant le traitement sont alors présentes, les assemblages d'espèces étant plus typiques des ruisseaux non acidifiés. Ainsi, les communautés comprenant les Dinoflagellés tels *Peridinium* et *Gymnodinium* et les Cryptophytes sont remplacées après le chaulage par des Chrysophytes et dans certains cas, des Chlorophytes (Buckavekas, 1988 ; Weatherley, 1988 ; Keller *et al.*, 1992a).

##### **I.2.2.4.2. Zooplancton**

Après la neutralisation, des changements dans la structure de la communauté zooplanctonique sont observés (Keller *et al.*, 1992b). Les deux grandes caractéristiques de ce changement sont une plus grande abondance de zooplancton par rapport aux lacs acides et la présence d'espèces acido-sensibles (Schindler, 1987 ; Locke *et al.*, 1994). Toutefois, Blomqvist *et al.* (1995) notent que la biomasse

zooplanctonique du lac chaulé qu'ils étudient est fortement dominée par des espèces caractéristiques des lacs acidifiés. Kuoppamäki (1993) conclut que la réponse zooplanctonique, notamment celle des copépodes peut prendre plusieurs années après le chaulage. Cependant, après un délai suffisamment long, la structure des communautés de zooplancton dans les lacs en voie de rétablissement pourrait se rapprocher de celle des lacs presque neutres (Locke *et al.*, 1994). Keller *et al.* (1992a) montrent que dans les lacs neutralisés de Sudbury, le rétablissement du zooplancton n'est pas complet après 4 ans à pH 6.0 et que le temps de recolonisation observé pour les crustacés zooplanctoniques varie de 2 à 12 ans. Ainsi, le rétablissement des communautés zooplanctoniques est plus lent que le rétablissement chimique.

Ces changements dans la communauté zooplanctonique sont influencés par la chimie de l'eau, couplée à l'augmentation d'une part, de la production du phytoplancton et d'autre part, de la diversité. En effet, l'augmentation de la production du phytoplancton peut favoriser les espèces herbivores de zooplancton. A l'inverse, les poissons et les prédateurs invertébrés peuvent causer une diminution de certaines espèces de zooplancton (Schindler, 1987).

#### I.2.2.4.3. Macroinvertébrés

Le zoobenthos montre des taux de recolonisation variable, reflétant la grande variabilité dans la fréquence naturelle de présence et de capacité de dispersion de ces différents taxons. Les insectes capables de dispersion par vol se rétablissent plus vite que les taxons moins mobiles donc, plus lents à recoloniser. Dans des rivières et lacs chaulés, des études montrent de nombreux exemples de recolonisation naturelle qui se manifeste par la réapparition d'espèces acido-sensibles qui avaient disparu (Lingdell et Engblom, 1995 ; Clayton et Menendez, 1996). Les Ephemères sont très souvent citées comme illustration de ce phénomène (Fjellheim et Raddum, 1995 ; Raddum et Fjellheim, 1995).

Le benthos vivant plus profondément, incluant des Chironomidés et des Oligochètes, montrent quelquefois un déclin substantiel après le chaulage. Cela peut être relié à une sédimentation réduite de la matière organique à partir de l'épilimnion ou à l'accumulation de composés de précipités d'aluminium dans cette zone (Weatherley, 1988).

L'intention d'accélérer le rétablissement biologique a impliqué la réintroduction artificielle d'un certain nombre d'espèces. L'introduction de *Asellus aquaticus*, *Ephemera vulgata*, *Limnea peregra* et *Potamobius astacus* a réussi tandis que celle de *Gammarus pulex* et *G. lacustris* a échoué. Dans certains cas, des études de lac ont montré que le chaulage ne produit pas de réponse évidente sur les populations d'écrevisse, probablement à cause des épisodes acides dans la zone littorale qui continuent à causer de la mortalité sur les juvéniles et à perturber le prélèvement de calcium des adultes après la mue (Appelberg, 1987).

#### I.2.2.4.4. Poissons

Les populations de poissons réduites dans les lacs acides peuvent se rétablir si les conditions environnementales sont atténuées (Huckabee, 1989 ; Menendez *et al.*, 1996).

Dans la majorité des cas, le chaulage a augmenté la survie des espèces acido-sensibles telles *Salmo trutta*, *S. gairdneri*, *S. salar*, etc et, cela notamment pour les jeunes stades (Weatherley, 1988).

Dans de nombreux lacs se rétablissant suite à l'ajout d'agents neutralisant ou à la diminution des entrées acides, la population très abondante de perches (acido tolérantes) avant le traitement diminue significativement alors que la population de *Salmo namaycush*, (acido-sensibles) se rétablit (Gunn et Keller, 1990 ; Keller *et al.*, 1992a).

En plus de l'augmentation de la survie, les populations piscicoles augmentent du fait de la reprise de la reproduction. En effet, il apparaît que l'arrêt de cette dernière pour les poissons exposés à des eaux acides est un phénomène réversible (Gunn et Keller, 1990 ; Griffiths et Keller, 1992). Cela permet donc l'augmentation naturelle de ces populations. Toutefois, toutes ne récupèrent pas après l'amélioration de la qualité de l'eau. Ainsi, certaines études montrent que si la population restante est très pauvre, alors elle finit par disparaître malgré l'atténuation de l'acidification. L'importance de la population résiduelle est confirmée par Schindler (1987). De plus, certaines espèces ne réapparaissent pas car leurs niches écologiques ont été envahies quand elles étaient absentes (Keller *et al.*, 1992a).

Des effets négatifs ont été signalés dans certains cas où le chaulage a causé la mortalité de poissons (Nyberg, 1984). L'élévation de pH combinée à des concentrations en métaux toujours élevées a probablement provoqué la précipitation d'hydroxydes métalliques sur les branchies, entraînant un stress d'osmorégulation et de ventilation aboutissant à la mort du poisson (Keller et Pitblado, 1984 ; Weatherley, 1988).

Cette communauté est toutefois très difficile à rétablir. Selon les espèces considérées, les stades de développement, les modes de vie et la sensibilité aux conditions environnementales, les résultats seront mitigés. Ainsi, alors que certaines études, comme celles citées ci-dessus montrent des signes de rétablissement, d'autres sont moins optimistes (Larsen et Hesthagen, 1995 ; Saksgard et Hesthagen, 1995 ; Rask *et al.*, 1995).

Afin de mettre en évidence les effets de l'acidification et des méthodes curatives des eaux sur la physiologie des insectes, une espèce sensible à cette perturbation est utilisée dans ce travail. Elle est présentée dans la partie I.3.

## I.3. PRESENTATION DE *DINOCRAS CEPHALOTES* (Curtis, 1827)

### I.3.1. Systématique

Classe :	Insectes
Ordre :	Plécoptères
Sous ordre :	Setipalpia (= Systellognathes)
Super-Famille :	Perloïdea
Sous-famille :	Perlidés
Genre :	<i>Dinocras</i>
Espèce :	<i>cephalotes</i>

Autres noms de *Dinocras cephalotes*, Curtis 1827 :

*Perla baetica*, Rambur 1842

*Perla cephalotes*, Neeracher 1910

### I.3.2. Morphologie

Les larves et les adultes de Plécoptères peuvent être aisément identifiés au moyen de la clef donnée par Aubert (1959) et Sivec *et al.* (1988).

Les larves (Figure 19)

*Dinocras cephalotes* au stade larvaire mesure de quelques millimètres à l'éclosion jusqu'à 35 mm au maximum. De couleur foncée, les larves présentent des dessins dorsaux caractéristiques sous forme de deux petites taches claires sur chaque tergite abdominal. Les bords du pronotum sont aussi foncés que le reste du dos. Toutefois, les larves venant de muer sont à peu près dépourvues de pigmentation, mais, quelques heures après la mue, la coloration prend son aspect définitif (Aubert, 1959).

Leur abdomen cylindrique est plus ou moins aplati, avec une extrémité à peu près identique chez les deux sexes. Les cerques sont longs et formés de nombreux articles. Cette espèce est caractérisée par des branchies pleurales, formées de nombreuses houppes ramifiées blanchâtres et par des branchies anales consistant en deux houppes blanchâtres visibles entre les cerques (Hoffmann, 1960).

En général, les fourreaux alaires divergents de la larve apparaissent lorsqu'elle atteint la moitié ou le tiers de sa longueur définitive, puis, ils achèvent leur développement en surface au dernier stade larvaire précédant la mue imaginale. Les nervures bien visibles présentent alors à peu près le même aspect que chez l'adulte. Les fourreaux alaires des larves mâles sont atrophiés.

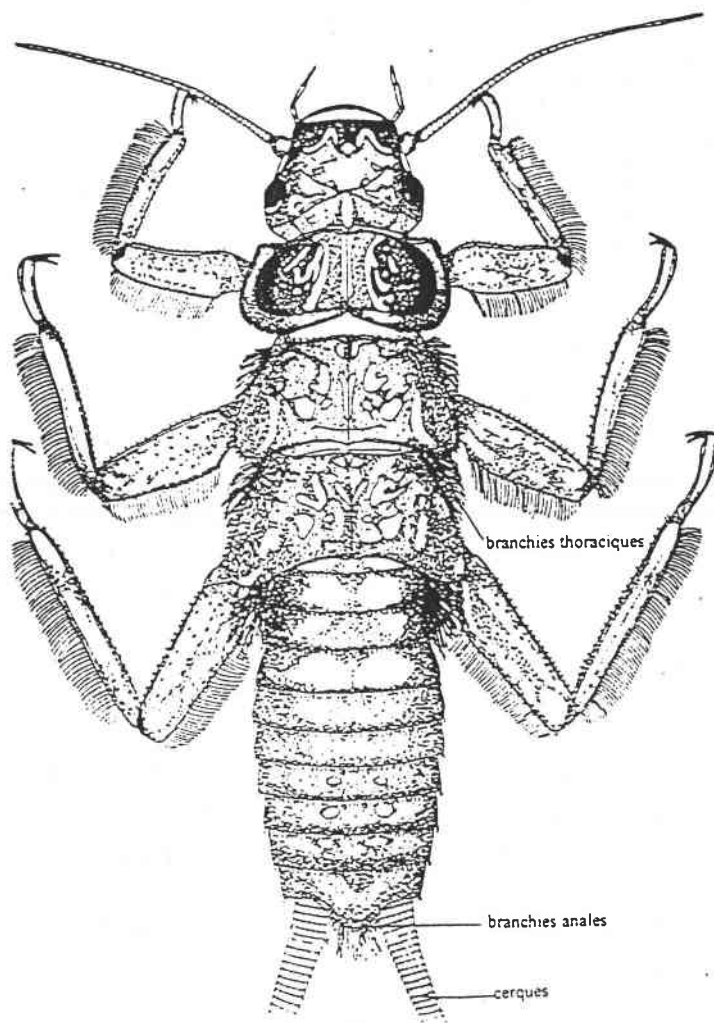


Figure 19 : Larve de *Dinocras cephalotes* (grossissement x 4) (Puig, 1984).

### Les adultes

Les *Dinocras cephalotes* adultes sont des Plécoptères de grande taille, le mâle mesurant 11 à 16 mm et la femelle 19 à 22 mm (Hoffmann, 1960). Leur corps est mou et de couleur foncée, sauf l'abdomen qui est quelquefois plus clair. La tête brun noire, plus large que le pronotum, porte des antennes longues et multiarticulées. Les articles distaux des palpes sont plus minces que les proximaux. Les deux paires d'ailes membraneuses à nervation assez primitive, disposées à plat sur le dos de l'insecte au repos sont généralement plus longues que l'abdomen (Beaumont, 1973).

L'abdomen formé de 11 segments porte deux longs cerques multiarticulés. Chez le mâle, le 10<sup>ème</sup> tergite abdominal est fendu au milieu. Les deux côtés réalisent des procès recourbés vers l'avant. Chez la femelle, le 8<sup>ème</sup> sternite se différencie vers l'arrière en plaque sous génitale ou en une paire d'apophyses submédianes. Le mâle est brachyptère, les ailes laissent à découvert les derniers segments.

### **I.3.3. Biologie**

#### **I.3.3.1. Répartition géographique**

Le long cycle de vie et la préférence pour la température de l'eau indiquent que la niche écologique de *D. cephalotes* est limitée. De plus, la température nécessaire pour initier le développement de l'oeuf limite sa présence dans les latitudes du Nord. Cette espèce de Plécoptères est très répandue dans le centre et l'Ouest de l'Europe (Figure 20) (Illies, 1978). Elle a été localisée de l'extrême Sud (37°N ; Sanchez-Ortega et Alba-Tercedor, 1991) à l'extrême Nord (70°N ; Huru, 1987) de l'Europe. Dans beaucoup de ces pays, tels que l'Italie et l'Angleterre, *D. cephalotes* est le seul représentant du genre *Dinocras* (Frutiger, 1987). En Norvège et Suède (Nord de Stockholm), c'est le seul Perlidé trouvé (Illies, 1978). En Suisse, Aubert (1954) a localisé cette espèce au niveau du Jura, du Plateau, des Pré-alpes et sur le versant Sud des Alpes et à basse altitude. En Irlande, cette espèce de Perlidés est peu répandue et seulement connue dans deux parties de l'Irlande à savoir le Kerry et le Donegal (Lucy *et al.*, 1990). En France, elle est située notamment dans les Vosges et le Jura (Verneaux, 1973 ; Guérol *et al.*, 1997).

#### **I.3.3.2. Biotope et biocénose**

L'éclosion de l'oeuf dans l'eau libère une larvule qui passe les premiers temps de sa vie à l'intérieur des végétaux et feuilles mortes du fond (Hoffmann, 1960). Après des mois, les larves se répartissent sur les graviers et les pierres, où elles se cantonnent en principe dessous. Dans la plupart des rivières de basse montagne de taille moyenne, des larves de *D. cephalotes* peuvent être trouvées sous la plupart des grosses pierres à des densités allant de 20 à 100 individus par m<sup>2</sup> (Frutiger, 1987). Les imagos qui sont aériens s'éloignent souvent assez peu du secteur où ils ont émergés et vivent cachés entre les pierrailles et les herbes de rive (Hoffmann, 1960). Ils sont le plus souvent nocturnes et lucifuges (Beaumont, 1973) avec une durée de vie restreinte (Aubert, 1959).

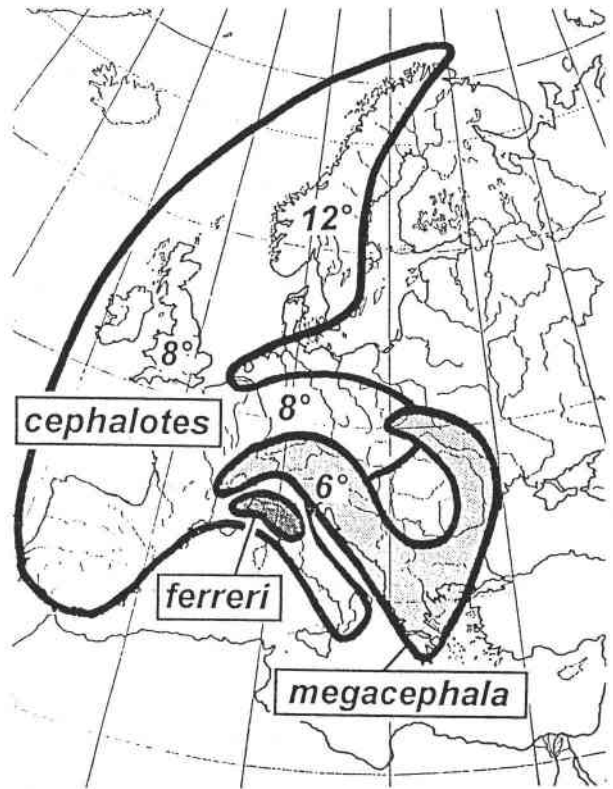
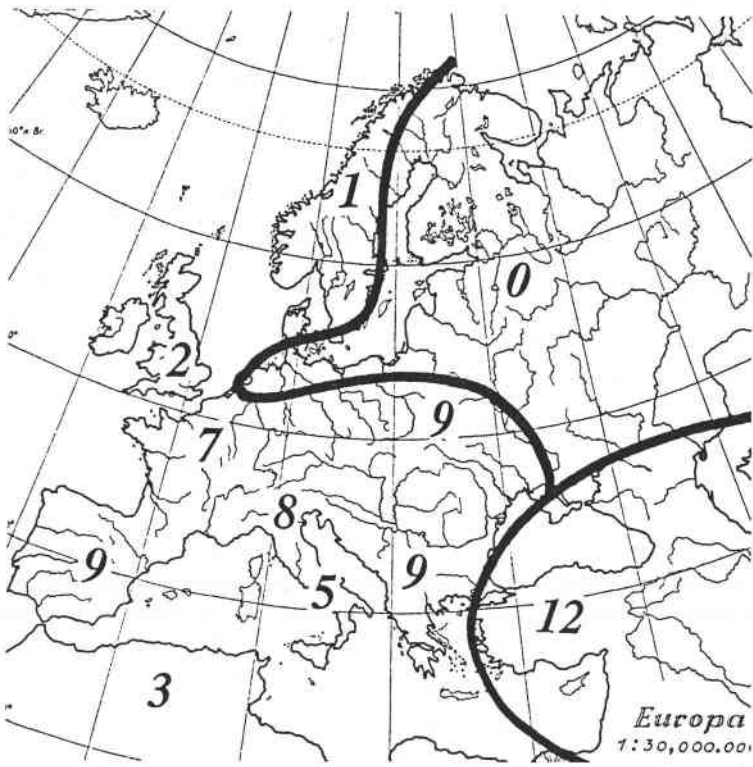


Figure 20 : a : diversité spécifique des Perlidés d'Europe ; b : distribution de *Dinocras spp.* et les températures qui déterminent le déclenchement du développement des oeufs (Zwick, 1996b).



Les larves sont extrêmement sensibles vis à vis des changements physiques et chimiques de l'eau dus aux pollutions variées (Hoffmann, 1960). Les facteurs tels que la constitution physico-chimique du cours d'eau, et plus particulièrement la nature du fond, l'agitation, le courant, la température, la teneur en oxygène, ainsi que la teneur en matières alimentaires sont extrêmement importants.

#### La nature du fond

Les larves sont pétricoles et vivent sur le fond (Hoffman, 1960). Hynes (1976) et Huru (1987) ont remarqué que *D. cephalotes* était fréquent sur les substrats couverts de mousses.

#### L'agitation de l'eau et le courant

La plupart des Plécoptères vivent dans les rivières dont le courant est plus ou moins rapide. Toutefois, les larves deviennent rares lorsque le courant est trop tumultueux dans les gorges ou dans les rapides (Aubert, 1959).

#### La température

Les Plécoptères sont, en général, des sténothermes d'eau froide (espèce hivernale ou de montagne) (Aubert, 1959). La plupart des espèces prélevées par Puig (1984) ont été trouvées dans des eaux de température inférieure à 15 °C. Cependant, cinq espèces (dont *Dinocras cephalotes*) ont été récoltées en été dans des eaux de température allant de 22 à 25 °C. Elles montrent toutefois une nette préférence pour les secteurs très ombragés (Hoffmann, 1960).

#### La teneur en oxygène

Les Plécoptères sont polyoxybiontes, c'est à dire qu'ils vivent de préférence dans des eaux avec une concentration en oxygène voisine de la saturation. D'après Brink (1949), ils disparaissent d'une rivière dont la teneur en cet élément tombe en dessous de 40 %. Ces organismes sont donc trouvés dans les eaux courantes non polluées (Aubert, 1959). Ce sont des organismes oligosaprobies.

#### L'acidification

Les Perlidés sont une famille de Plécoptères très sensibles à l'acidification. En effet, dans les Vosges, *Perla marginata* et *Dinocras cephalotes* n'ont pas été échantillonnées dans des cours d'eau de pH < 6.3 (Guéroid *et al.*, 1997). Probst *et al.* (1990) signalent la présence de *Dinocras cephalotes* dans des ruisseaux vosgiens qui sont "alcalins typiques et bien tamponnés". Raddum *et al.* (1988) ont établi une classification des organismes aquatiques en fonction de leur sensibilité par rapport à l'acidification des cours d'eau. *Dinocras* appartient à la catégorie des organismes ne tolérant pas un pH inférieur à 5.0. Cette différence de pH peut s'expliquer par le fait que ce facteur n'est pas la seule caractéristique de l'acidification intervenant sur la présence de ce Plécoptère.

### I.3.3.3. Cycle de développement

Les femelles ont un accouplement en général dans les deux jours suivant l'émergence (Elliot, 1989). Après l'accouplement, elles émettent leurs oeufs qui restent agglutinés sous l'abdomen en une masse ovigère. Zwick (1996a) a dénombré de 114 à 2212 oeufs dans ces masses. Ils sont de petite taille (0.2 à 0.6 mm), jaune-marron, durs, ovoïdes à surface granuleuse et pourvus d'une ventouse adhésive. Cette coquille est bien adaptée à l'habitat des Plécoptères. La couleur assure un certain camouflage et la dureté les protège de dommages dus aux chocs mécaniques rencontrés dans les ruisseaux. La ventouse leur permet de se coller à la surface de nombreux substrats leur évitant ainsi les mouvements d'eau (Roszczewska, 1991). Cette masse d'oeufs éclate quand elle atteint l'eau et les oeufs individuels coulent, puis s'accrochent à un substrat (Hynes, 1976). La durée d'incubation est liée à la température, celle-ci devant être comprise entre 4-6 et 22-24 °C (Lillehammer, 1987 ; Zwick, 1996a). Cette phase est généralement lente et dure 70-80 jours à 12 °C pour se réduire à 30 jours à 16-20 °C. Le maximum d'éclosion est observé à 16-20 °C (Lillehammer, 1987 ; Elliot, 1989). Pour assurer le développement de l'oeuf, la demande thermique est de 600 ° Jour à partir de 4.5 °C (Zwick, 1996a). Cependant, des oeufs ne se développant pas à cause d'une température trop faible peuvent rester dans un état de quiescence et reprendre leur activité dès que la température s'élève. Zwick (1996b) a observé en laboratoire que des oeufs pouvaient subir jusqu'à 6 interruptions du développement sans que cela n'ait une incidence sur le succès de l'éclosion. Cette capacité a probablement contribué à la propagation de l'espèce dans des ruisseaux et rivières froids du Nord de l'Europe et dans des régions de montagne en Europe (Elliot, 1989). Toutefois, les succès d'éclosion restent incertains après 220 jours de quiescence (Zwick, 1996a).

Le développement larvaire dure en moyenne 3 ans, mais, Ulfstrand (1968) et Huru (1987) ont montré que les conditions environnementales peuvent augmenter la durée du cycle de vie. Ainsi, dans des rivières de Norvège, Huru (1987) a observé des cycles larvaires de 4 à 5 ans. A l'opposé, Frutiger (1987) suggère que le développement peut être raccourci à 2 ans dans des eaux très chaudes (température moyenne annuelle de 10.5 °C). Néanmoins, Sanchez-Ortega et Alba-Tercedor (1991) ont constaté que, en Sierra Nevada, malgré la situation méridionale, *Dinocras cephalotes* en conditions naturelles a besoin de trois ans pour compléter son développement. Quoiqu'il en soit, les périodes les plus intensives de croissance se déroulent pendant l'été et l'automne des deux premières années.

Les mues sont nombreuses. Vers la deuxième moitié de la vie larvaire apparaissent les fourreaux alaires. Du fait de la longue durée du cycle de développement, des larves de trois générations successives peuvent être trouvées sur un même site. En mai par exemple, des nymphes de 25 à 35 mm aux fourreaux alaires noirs et gonflés peuvent côtoyer des larves de la deuxième génération de 12 à 25 mm aux fourreaux alaires à peine formés et des jeunes larves de la troisième génération qui n'ont que 8 à 12 mm et pas encore de fourreaux alaires (Aubert, 1959).

Peu avant la mue imaginale, la larve cesse de s'alimenter et quitte l'eau pour se fixer solidement à un support. Le dessus de la tête et du thorax se fendent pour libérer l'imago blanchâtre qui prend sa teinte définitive en une demi heure (Hoffmann, 1960). En général, l'émergence se déroule la nuit ou tôt le matin. En principe, les mâles apparaissent les premiers. La température a un effet marqué pour le contrôle de l'émergence. En effet, cette dernière se produit plus tôt les années plus chaudes (Hynes, 1976). Des adultes peuvent être trouvés de avril à juillet, avec une dominance de mai à juin (Elliot, 1989).

Pour le taux de survie des larves, Frutiger (1987) a observé sur le site du Necker (Suisse) que la densité de la population de *D. cephalotes* qui était de environ 100 individus par m<sup>2</sup> à la moitié de son développement, et diminuait constamment pour atteindre à la fin du développement larvaire 20 individus par m<sup>2</sup> représentant un taux de survie de à peu près 85 à 90 % par stade.

### I.3.3.4. Grandes fonctions

#### I.3.3.4.1. Nutrition

Les larves de la famille des Perlidés sont parmi les plus gros macroinvertébrés prédateurs dans les eaux lotiques. Ils se nourrissent d'une grande variété de proies d'invertébrés et contribuent de façon significative à l'écologie de la biocénose benthique de ces rivières (Lucy *et al.*, 1990). Bien que le régime alimentaire soit à prédominance carnivore, *D. cephalotes* peut se nourrir aussi de matières végétales telles que des algues et des détritits (Hynes, 1976).

Les proies majeures de *D. cephalotes* sont des larves d'Ephémères, de Trichoptères et de Diptères (Chironomidés) (Lucy *et al.*, 1990). Ainsi, la microdistribution de cette espèce est positivement corrélée aux hautes densités de proies (Chironomidés) et à la présence de mousses. Le cannibalisme de *D. cephalotes*, commun aux Perlidés semble augmenter avec l'âge (Lucy *et al.*, 1990).

Les adultes dont les maxilles sont généralement molles et atrophiées ne prennent pas de nourriture mais souvent, ils aspirent une goutte d'eau (Hoffmann, 1960).

#### I.3.3.4.2. Respiration

Les branchies sont les organes principaux impliqués dans la respiration des Plécoptères. Kapoor (1972 ; 1974) a mis en évidence leur rôle chez *Paragnetina media*. Lorsqu'une paire de branchies est prélevée chez une larve, la consommation en oxygène mesurée diminue. La paire postérieure des branchies thoraciques est plus efficace que les deux paires antérieures.

#### I.3.3.4.3. Excrétion

Une soixantaine de tubes de Malpighi est dénombrée chez les Plécoptères (Beaumont, 1973). Ils participent au maintien de l'homéostasie. Kapoor (1979) a montré que les larves de *Paragnetina media* maintiennent l'hyperosmolarité de leur hémolymphe en excréant une urine très diluée et en conservant des ions en les réabsorbant au niveau de zones spécifiques tels que les tubes de Malpighi. Ainsi, elles excrètent une urine légèrement hypoosmotique (270 mosmoles.l<sup>-1</sup>) lorsqu'elles sont exposées à de l'eau douce, et une grande quantité d'urine très diluée (100 mosmoles.l<sup>-1</sup>) lorsque le milieu d'exposition est de l'eau déminéralisée.

#### I.3.3.4.4. Osmorégulation

Les larves de Plécoptères possèdent des cellules spécialisées, les cellules à chlorures sur leur branchies et sur les membranes inter-segmentaires (Kapoor et Zacchariah, 1973a, b).

Elles sont capables d'effectuer une régulation hyperosmotique et ionique de leur hémolymphe lorsqu'elles sont exposées à un milieu hypotonique (Colby, 1972).

Les larves de *Paragnetina media* sont capables de tolérer une grande gamme de salinité allant de l'eau distillée à un milieu extérieur isotonique. Lorsque le milieu extérieur devient hypertonique, les larves perdent leur capacité pour la régulation hyperosmotique et les concentrations de l'urine deviennent proches de celles de l'hémolymphe (Kapoor, 1979).

## CHAPITRE II. : MATERIEL ET METHODES

### II.1. LES INSECTES

#### II.1.1. Choix de l'espèce

Le choix de l'espèce est imposé par plusieurs contraintes :

- l'espèce doit être sensible aux conditions physico-chimiques caractéristiques des cours d'eau acidifiés,
- sa taille doit être suffisamment grande pour permettre le prélèvement de l'hémolymphe sous une loupe binoculaire au moyen d'un tube capillaire (1 mm de diamètre) inséré dans l'abdomen,
- le volume d'hémolymphe prélevé doit être suffisant après dilution pour permettre le dosage de plusieurs ions.

D'autres caractéristiques telles que l'abondance, le lieu et le mode de prélèvement restreignent encore le choix.

Toutes ces contraintes ont orienté le choix de l'espèce vers un Plécoptère acido-sensible de la famille des Perlidés, *Dinocras cephalotes* qui présente tous ces critères.

#### II.1.2. Collecte et sélection des larves

Les larves de *Dinocras cephalotes* sont prélevées dans le ruisseau "La plaine" situé dans le massif vosgien, dont la situation géographique et les caractéristiques physico-chimiques sont décrits dans le paragraphe II.2.1.1. Les Plécoptères de cette espèce sont abondants sur ce site non soumis au processus d'acidification. Les larves sont prélevées avec la méthode du Surber (maille du filet : 350 $\mu$ m) et sont triées *in situ* afin d'éliminer :

- les plus jeunes stades dont la taille est trop petite pour permettre le prélèvement de l'hémolymphe
- les larves dont la taille et l'aspect du fourreau alaire traduisent les derniers stades de développement.

Deux raisons expliquent ce rejet. D'une part, des émergences sont susceptibles de se produire pendant l'expérience et, d'autre part, les ovaires des femelles sont très développés et remplis d'ovocytes qui obstruent le capillaire lors du prélèvement d'hémolymphe.

Suite à cette sélection, seules les larves de *Dinocras cephalotes* dont la taille est comprise entre 16 et 22 mm sont retenues ; cette classe de taille correspond en majorité à des larves de 2 ans. Pour

certaines expériences nécessitant d'avoir des individus dont les stades de développement sont les plus proches possible, ces limites sont restreintes à la classe 18-20 mm avec comme hypothèse que pour une station donnée, une taille correspond à un âge déterminé.

Les larves sélectionnées sont transportées dans des récipients isothermes contenant des cailloux servant de substrat et de l'eau du site aérées à l'aide d'un bulleur à piles.

## **II.2. DISPOSITIFS EXPERIMENTAUX**

Pour ce travail, deux types d'expérience sont réalisés : le premier se déroule sur le terrain afin de mettre en évidence l'effet d'un milieu acidifié, le deuxième est réalisé en laboratoire avec des milieux reconstitués.

### **II.2.1. Expérimentation *in situ***

L'expérience réalisée sur le terrain consiste à transférer des larves prélevées dans un milieu non acidifié vers un milieu acidifié afin d'étudier les effets d'un tel environnement sur cet insecte. Un lot témoin laissé sur le site d'origine et dans les mêmes conditions de rétention permet de comparer les réponses entre les deux sites. La figure 22 (cf. chapitre III) schématise le protocole expérimental suivi pour cette expérience.

#### **II.2.1.1. Choix des sites**

Deux ruisseaux du massif vosgien sont retenus comme sites pour le déroulement de l'expérience. Ils sont localisés sur la carte représentée par la figure 21.

Le site témoin est le ruisseau où les Plécoptères sont prélevés, la Plaine. L'expérience est réalisée à 3 km de la source. Dans ce secteur, le cours d'eau est situé sur le massif du Donon. Les roches qui constituent ce massif sont d'origine volcanique (rhyolites, diorites) et le plus souvent basiques. De ce fait, les sols qui en résultent ont une tendance peu affirmée à l'acidification. La végétation correspond à une hêtraie - sapinière dont les conditions d'acidification sont modérées (Party *et al.*, 1993). Les dépôts atmosphériques acides mesurés au Donon sont assez faibles et parmi les moins importants du massif vosgien (Aschan *et al.*, 1991 dans Party *et al.*, 1993). L'ensemble de ces facteurs est favorable au maintien de la qualité des eaux qui s'écoulent sur ce site.

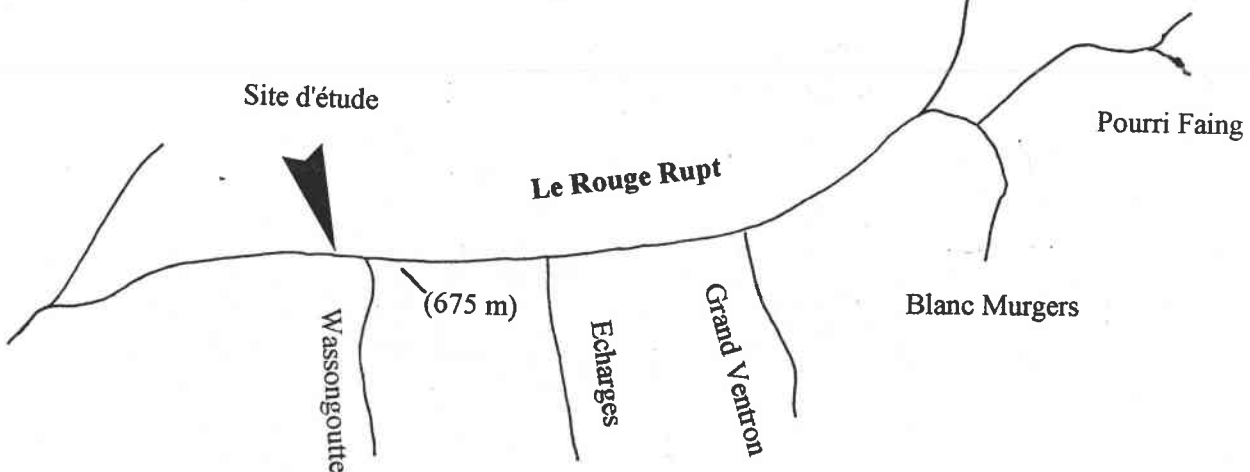
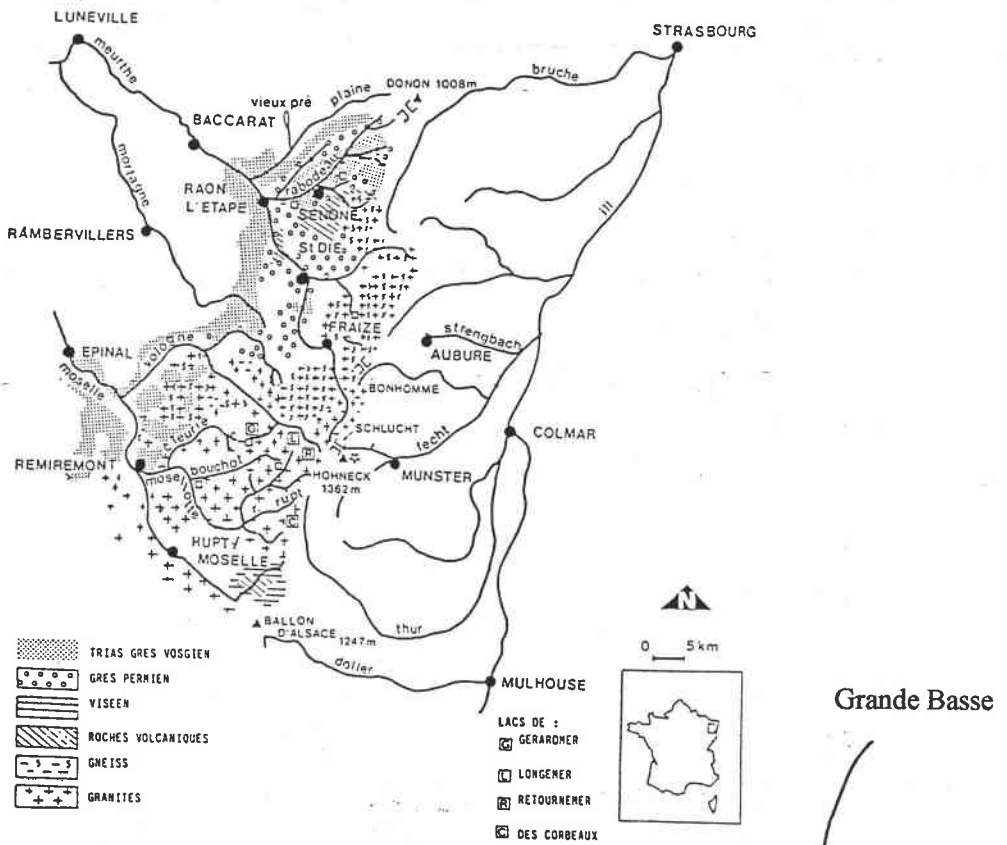
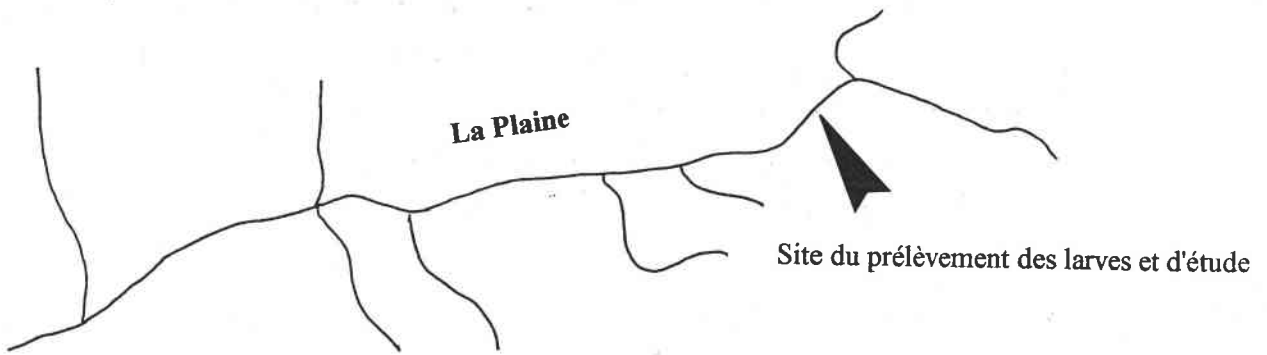


Figure 21 : Localisation des œux sites d'expérimentation dans le massif vosgien.

Probst *et al.* (1990) ont cartographié l'étendue de l'acidification pour les ruisseaux s'écoulant dans les Vosges en 1988-1989 (cf. figure 14a). Ils n'ont pas échantillonné directement la rivière Plaine. Toutefois, deux cours d'eau, la Sarre-Blanche et le Marteau, situés sur la massif du Donon à proximité de la Plaine sont intégrés à leur étude. Tous deux s'écoulent sur du grès à l'instar de la Plaine. Ils sont classés comme cours d'eau alcalins typiques.

Le site de transfert des larves est le ruisseau du Rouge-Rupt soumis au processus de l'acidification (Massabuau, 1987 ; Guérold, 1992). Les sols du bassin versant du Rouge-Rupt ont fait l'objet d'une étude géologique et pédologique détaillée (Mansuy, 1992). Le bassin principal du Rouge-Rupt est sur des granites acides du Ventron et du Bramont et sur des sols ocres podzoliques et stagnoley podzoliques. Les granites du Ventron et du Bramont montrent un important pourcentage en  $\text{SiO}_2$ . Ils sont également extrêmement pauvres en cations basiques, calcium, sodium, potassium et magnésium. Ce sont des granites acides. Les cours d'eaux s'écoulant à ce niveau sont en général faiblement tamponnés, voir acides.

### II.2.1.2. Unités expérimentales

Sur les deux sites, les larves de *Dinocras cephalotes* sont exposées dans des unités expérimentales constituées de deux cages emboîtées (photo 1).

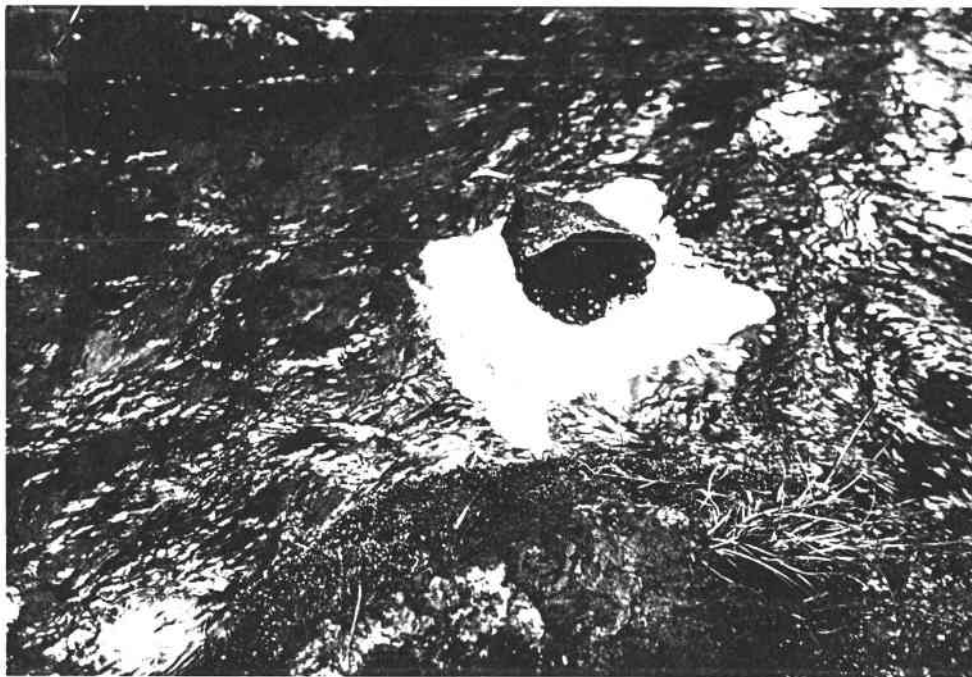


Photo 1 : Dispositif expérimental *in situ*



La cage contenant les larves (volume 6 litres) est faite avec du plastique souple de maille fine (2 mm de vide de maille) afin d'empêcher la fuite des Plécoptères, mais d'assurer le passage de l'eau. Le couvercle est attaché au reste de la cage par une bande de type "velcro" qui rend la jointure parfaitement close. La seconde cage est fabriquée en PVC et contient la première. Elle permet de la maintenir dans le cours d'eau et la protège des pierres et autres débris. Chaque côté de cette seconde cage est constitué de deux barres de PVC se croisant en X. La circulation de l'eau peut s'y faire librement. Des "bras" en PVC, perforés à leurs extrémités permettent de fixer l'ensemble dans le lit du cours d'eau à l'aide de tiges métalliques.

## **II.2.2. Expérimentation au laboratoire**

Les expériences réalisées en laboratoire ont nécessité la reconstitution de milieux selon un protocole bien défini. Dans cette partie, seules les généralités applicables à toutes les expériences sont présentées. Chaque méthode spécifique à une expérience est décrite dans la partie résultat.

### **II.2.2.1. Acclimatation des larves**

Les larves sont laissées dans les containers avec l'eau du site d'origine pendant les deux jours précédant l'expérience et sont ainsi acclimatées à la température et à la photopériode de la salle d'expérimentation.

### **II.2.2.2. La salle**

Les expériences se déroulent dans une salle climatisée (14 °C) avec un cycle lumineux journalier de 14 h jour et 10 h nuit. Cette température correspond à celle mesurée généralement sur le terrain avant et après l'été.

### **II.2.2.3. Les unités expérimentales**

Un nombre variable d'unités expérimentales est utilisé selon les expériences : de 2 à 8 en fonction du nombre de milieux testés.

Chaque unité est constituée par un bac de PVC d'un volume de 10 litres auquel est associée une pompe centrifuge (Eheim, type 1026) d'un débit de 6 l.min<sup>-1</sup> qui assure la circulation et l'homogénéisation du milieu (Photo 2).

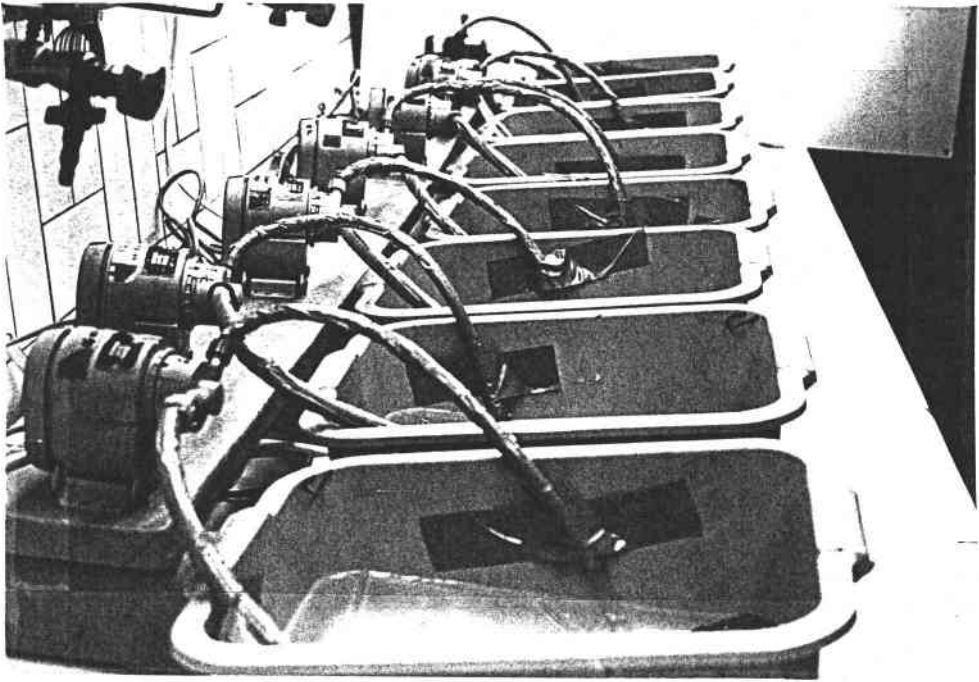


Photo 2 : Dispositif expérimental en laboratoire.

Avant chaque série d'expériences, la pompe est nettoyée avec une solution acidifiée, puis rincée avec de l'eau déminéralisée. Des tuyaux neufs, nettoyés à l'eau acidifiée et rincés à l'eau déminéralisée, sont rattachés à la pompe. Ils sont recouverts de scotch opaque sur toute leur longueur afin d'éviter un développement algal à l'intérieur du tube. Les extrémités plongées dans l'eau sont enveloppées de tulle, puis emballées par une protection en grillage plastique de 2 mm de vide de maille. Cette précaution évite que des larves ne soient aspirées dans la pompe. Chaque bac est équipé de substrats en grillage plastique qui constituent des supports pour les insectes.

#### II.2.2.4. Entretien des larves pendant l'expérience

Pendant toute l'expérience, les larves sont nourries deux fois par semaine avec des larves de Chironomes vivantes du commerce. Deux raisons justifient cet apport de nourriture :

- si l'on considère la situation *in situ*, les larves se nourrissent selon les conditions environnementales avec un comportement de chasseur,
- un jeûne suivi pendant 21 jours ou plus (durée de certaines expériences décrites ultérieurement) entraînerait un affaiblissement général de l'insecte qui biaiserait les résultats dus au traitement lui-même.

Toutefois, pour chaque expérience, une période de trois jours entre le dernier repas et le jour du prélèvement est toujours respectée, afin de se soustraire de l'incidence de l'absorption au niveau de l'intestin moyen.

## II.3. PHYSICO - CHIMIE DES MILIEUX EN LABORATOIRE

Les expériences de laboratoire sont réalisées en laboratoire avec des milieux reconstitués. Trois grands paramètres les caractérisent : leur pH, leur minéralisation et leur concentration en aluminium.

Au cours de ce travail sur les milieux acidifiés, deux objectifs sont fixés :

- le premier est de reconstituer, un milieu acidifié et un milieu contrôle les plus proches possible de ceux du massif vosgien (le Rouge-Rupt et la Plaine) afin de déterminer les effets sur la physiologie de *Dinocras cephalotes* et d'expliquer les résultats obtenus pendant l'expérience réalisée *in situ*,
- le second est de mettre évidence les effets respectifs et/ou conjugués des paramètres caractéristiques des cours d'eau acidifiés vosgiens c'est à dire un pH acide, une faible minéralisation et une concentration en aluminium total élevée.

Les valeurs citées ci dessous sont celles fixées en fonction des objectifs. Les valeurs réellement mesurées pendant le déroulement de chaque expérience sont données dans la partie résultats correspondante.

### II.3.1. pH

Etant donné que l'objectif est de se rapprocher des conditions d'un cours d'eau acidifié et non acidifié, deux niveaux de pH sont testés .

- un pH de 4.6 pour représenter le pH des milieux acidifiés. En effet, bien que des ruisseaux puissent présenter une valeur inférieure, un pH de 4.6 est suffisant pour provoquer un stress chez *Dinocras cephalotes* qui commence à disparaître des cours d'eau dès un pH de 5.0 (Raddum *et al.*, 1988).
- un pH de 6.6 pour représenter le pH des milieux non acidifié. Cette valeur est déterminée par différentes mesures réalisées préalablement dans la Plaine, le cours d'eau d'origine des Plécoptères.

L'ajustement au pH souhaité dans les différents milieux est obtenu soit par l'ajout d'acide sulfurique ( $H_2SO_4$ ) 0.02 M, soit par ajout d'hydroxyde de potassium (KOH) 0.015 M.

### II.3.2. Minéralisation

Les deux niveaux de minéralisation testés, sont principalement déterminés par l'expérience réalisée *in situ* : le premier est de 25 mg.l<sup>-1</sup>, le second, plus élevé de 82 mg.l<sup>-1</sup>, est du même ordre de grandeur que celui du ruisseau d'origine des larves utilisées dans l'expérimentation (la Plaine).

Les différents ions sont ajoutés sous forme d'une solution mère conservée dans des flacons en polyéthylène préalablement nettoyés à l'eau acidifiée et rincés à l'eau déminéralisée.

De nombreuses expériences ayant abordé les effets de la minéralisation dans les eaux acidifiées se sont seulement attachées aux concentrations en calcium, comme cation principal. Les autres ions, hormis les protons et l'aluminium, composant leur milieu d'expérience sont rarement détaillés. Dans la présente étude, les concentrations en cations sont fixées par rapport aux valeurs mesurées dans le Rouge-Rupt pour le milieu acidifié et peu minéralisé et dans la Plaine pour le milieu minéralisé. En général, un facteur d'environ 6 apparaît entre les concentrations en cations de la solution, peu minéralisée et celles de la solution minéralisée (Tableau X).

Tableau X : Concentrations en cations des deux types de solutions finales.

	Solution peu minéralisée		Solution minéralisée	
	mg.l <sup>-1</sup>	μmol.l <sup>-1</sup>	mg.l <sup>-1</sup>	μmol.l <sup>-1</sup>
Na <sup>+</sup>	1.3	55	7.6	330
Ca <sup>++</sup>	0.9	22.5	6.0	150
K <sup>+</sup>	0.3	8	1.9	50
Mg <sup>++</sup>	0.2	10	2.4	100

Les concentrations en anions dans les milieux ne sont pas fixées préalablement. Elles découlent de la quantité des différents sels utilisés pour obtenir les concentrations en cations. Toutefois, des estimations ont été réalisées pour s'assurer qu'elles étaient réalistes par rapport aux données de terrain.

Avant chaque expérience, deux solutions mères, une pour le milieu minéralisé et une pour le milieu peu minéralisé sont préparées. Elles sont obtenues en mélangeant les divers sels à de l'eau nanopure pour obtenir un litre de la solution souhaitée (Tableau XI).

Afin de se rapprocher au mieux de la minéralisation fixée, la dilution de la solution mère à réaliser quotidiennement est déterminée avant chaque expérience. Ainsi, pour certains milieux, la dilution de la solution mère est de 10 ml dans 1 litre, alors que dans d'autres, en raison de l'ajout d'aluminium et de l'ajustement au pH avec l'acide ou la base, la dilution est de 8 ml de solution mère par litre d'eau déminéralisée.

Tableau XI : Liste des différents sels utilisés pour composer les solutions mères et quantité à ajouter à l'eau nanopure (pour un litre de solution).

	Solution peu minéralisée	Solution minéralisée
	g	g
Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> , 10H <sub>2</sub> O	0.569	3.54
NaCl	0.107	0.64
Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> , 4H <sub>2</sub> O	0.177	1.18
CaCl <sub>2</sub> , 2H <sub>2</sub> O	0.110	0.74
CaSO <sub>4</sub> , 2H <sub>2</sub> O	0.129	0.86
KNO <sub>3</sub>	0.04	0.25
KCl	0.029	0.19
MgSO <sub>4</sub> , 7H <sub>2</sub> O	0.123	1.23
MgCl <sub>2</sub> , 4.5H <sub>2</sub> O	0.088	0.88

### II.3.3. Concentration en aluminium total

Deux niveaux de concentration en aluminium total sont fixés :

- une concentration en aluminium total inférieure à 10 µg.l<sup>-1</sup> pour les milieux sans aluminium,
- une concentration de 540 µg.l<sup>-1</sup> pour ceux enrichis en aluminium.

Pour obtenir les concentrations en aluminium souhaitées dans les différents milieux, quatre produits peuvent être ajoutés aux solutions :

- l'aluminium en poudre [Al ; M=26.9 g.mol<sup>-1</sup>],
- le chlorure d'aluminium [AlCl<sub>3</sub> ; M= 133.5 g.mol<sup>-1</sup>],
- le sulfate d'aluminium [Al<sub>2</sub>(SO<sub>4</sub>)<sub>3</sub>-14H<sub>2</sub>O ; M=342.14 g.mol<sup>-1</sup>],
- le nitrate d'aluminium [Al(NO<sub>3</sub>)<sub>3</sub>-9H<sub>2</sub>O ; M= 375.13 g.mol<sup>-1</sup>].

Cependant, pour diverses raisons, seul le nitrate d'aluminium a été retenu dans cette étude. En effet, l'aluminium en poudre n'a pas été utilisé au cours de ce travail car, c'est un produit à manipuler avec précaution. De même, les chlorures étant dosés dans l'hémolymphe, le chlorure d'aluminium n'est pas retenu.

Le nitrate d'aluminium et le sulfate d'aluminium provoquent tous deux une augmentation de la conductivité du milieu auquel ils sont ajoutés. Néanmoins, cette augmentation est plus restreinte dans le

cas du nitrate d'aluminium. De plus, des sulfates sont déjà apportés par l'acide sulfurique lors de l'ajustement au pH acide. Par ailleurs, les nitrates font partie des facteurs influencés par l'acidification *in situ*.

Afin d'apporter la quantité d'aluminium total souhaitée dans chaque milieu, une solution mère concentrée à  $0.75 \text{ g.l}^{-1}$  en nitrate d'aluminium,  $[\text{Al}(\text{NO}_3)_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}]$ , et acidifiée à 1 % ( $\text{HNO}_3$ ), est préparée.

Pour les milieux dont la concentration en aluminium est de  $10 \text{ } \mu\text{g.l}^{-1}$ , il suffit d'ajouter  $185 \text{ } \mu\text{l}$  de solution mère dans 4 litres.

Pour ceux dont la concentration totale en aluminium est de  $540 \text{ } \mu\text{g.l}^{-1}$  la quantité de solution mère à ajouter à 4 litres de solution est de 10 ml. Or, la solution étant acidifiée, son ajout dans le milieu provoque une importante diminution de pH ( $< 4.6$ ). Un ajout important de KOH est alors nécessaire pour relever le pH, notamment pour les milieux à pH 6.6, ce qui conduit à une conductivité beaucoup plus élevée que celle attendue. Afin de pallier à ce problème, des capsules de  $30 \text{ } \mu\text{g}$  de nitrate d'aluminium en poudre sont préparées extemporanément et ajoutées lors de la préparation des milieux. Pour les solutions ayant  $10 \text{ } \mu\text{g.l}^{-1}$  d'aluminium total, l'ajout sous forme de solution est maintenu car la masse de composé nécessaire pour obtenir cette concentration est impossible à peser précisément et d'autre part, le volume de solution mère d'aluminium à ajouter n'a pas de répercussion importante sur le pH des milieux. Malgré ces précautions, il est certain que la reconstitution de milieux en laboratoire ne peut que se rapprocher grossièrement des conditions *in situ*. C'est la complémentarité des études *in situ* et en laboratoire qui est enrichissante.

### II.3.4. Codification des différents milieux

Afin de simplifier l'appellation des milieux, un code est attribué à chacun d'entre eux. Il est créé de la façon suivante :

- un premier chiffre correspond au pH du milieu considéré (4.6 ou 6.6),
- il est suivi d'une ou deux lettres selon le type de minéralisation (PM pour peu minéralisé ou M pour minéralisé),
- si rien n'est mentionné ensuite, cela signifie que le milieu ne contient pas d'aluminium. Dans le cas contraire, Al vient s'ajouter aux éléments précédents.

A titre d'exemple :

- le milieu contrôle est noté **6.6M**. Il est caractérisé par un **pH de 6.6**, une **minéralisation élevée** et ne contient pas d'aluminium.
- le milieu reconstitué comme milieu acidifié est donc noté **4.6PMAI**. Il a un **pH de 4.6**, une **faible minéralisation** et une **concentration en aluminium élevée**.

## **II.4. SUIVI DE LA PHYSICO-CHIMIE**

### **II.4.1. *In situ***

#### **II.4.1.1. Echantillonnage**

L'échantillonnage de l'eau sur la station de la Plaine est réalisé de façon automatique. En effet, en raison de la facilité d'accès à ce site, un échantillonneur en continu (ISCO 1680) peut être installé. Celui-ci permet grâce à une programmation et à une autonomie suffisante d'obtenir la fréquence de prélèvement souhaitée. Une crépine fixée à un piquet planté dans le lit du ruisseau prélève l'eau selon la séquence programmée. L'échantillon est récolté dans un flacon préalablement lavé à l'eau acidifiée et rincé à l'eau déminéralisée. La fréquence de prélèvement choisie est un flacon de 500 ml par 24 heures rempli par 4 pompages successifs de 125 ml espacés de 6 heures. Ce mode de prélèvement ne pouvant être installé sur le deuxième site du fait de sa difficulté d'accès, des prélèvements journaliers sont réalisés.

#### **II.4.1.2. Mesures réalisées *in situ***

Le pH, la température et la conductivité de l'eau sont mesurés ponctuellement, mais aux mêmes dates sur les deux sites (appareillage WTW). Les mesures de pH sont réalisées au moyen d'une électrode KCl 0.01M spécifique aux eaux peu minéralisées.

### **II.4.2. En laboratoire**

#### **II.4.2.1. Préparation des différents milieux**

Tous les milieux sont réalisés à partir de la combinaison des paramètres généraux fixés : pH, minéralisation et concentration en aluminium.

Avant l'expérience, tous les bacs sont nettoyés avec de l'eau acidifiée, puis rincés trois fois avec de l'eau déminéralisée. Chaque milieu est préparé directement dans le bac à partir de 4 litres d'eau déminéralisée. Cette quantité est nécessaire pour le fonctionnement des pompes et surtout, permet aux larves d'accéder à l'air libre lorsqu'elles grimpent sur les supports, pouvant ainsi muer sans se noyer.

La solution mère est ajoutée aux 4 litres d'eau déminéralisée. Le bac, posé sur un agitateur magnétique, est mélangé en continu. Une électrode pH (KCL 0.01 M), reliée à un pH-mètre étalonné quotidiennement, plonge dans le récipient. L'aluminium est ajouté sous forme de solution ou de poudre

et le milieu est agité jusqu'à stabilisation du pH. Ensuite, en fonction du pH souhaité pour le milieu final, de l'acide sulfurique ou de l'hydroxyde de potassium est versé de façon progressive en petite quantité dans la solution. Entre chaque ajout, le pH doit se stabiliser.

#### **II.4.2.2. Renouvellement des milieux**

Les pompes installées au niveau de chaque unité expérimentale fonctionnent 24 heures sur 24. Au bout d'un certain temps, les blocs moteur s'échauffent provoquant une augmentation de la température du flux d'eau qui les traverse. Afin de limiter les variations de température, et donc les changements de pH inhérents à ce problème, ainsi que les variations physico-chimiques du milieu liées à la présence des insectes, les milieux sont entièrement renouvelés toutes les 12 heures.

Lorsque l'expérience est commencée, à chaque changement d'eau, les bacs sont rincés uniquement à l'eau déminéralisée. Chaque milieu est toujours préparé dans le même bac. De même, chaque pompe est toujours attribuée au même milieu.

#### **II.4.2.3. Suivi de la physico-chimie**

Le pH, la conductivité et la température sont mesurés quatre fois par jour au moment des renouvellements de chaque milieu. Cela correspond au changement d'eau et 12 heures après, cela deux fois par jour.

Des prélèvements d'eau réguliers sont effectués dans chaque milieu juste après son renouvellement et 12 heures plus tard. Ils sont utilisés pour le dosage des cations (sodium, potassium, calcium et magnésium), des anions (chlorures, sulfates et nitrates) et de l'aluminium total.

### **II.5. TECHNIQUES ANALYTIQUES POUR LA PHYSICO-CHIMIE DES MILIEUX *IN SITU* ET EN LABORATOIRE**

#### **II.5.1. pH**

Les mesures de pH en laboratoire (pH-mètre Knick 646) sont réalisées au moyen d'une électrode KCl 0.01 M spécifique aux eaux peu minéralisées.



## II.5.2. Conductivité

Elle est mesurée sur un conductimètre de type Metrohm E 518 équipé d'un correcteur de température. Elle est exprimée en  $\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$  à 20 °C.

## II.5.3. Minéralisation globale

La minéralisation est estimée selon la formule donnée dans le tableau XII. Ce mode d'expression permet d'apprécier un niveau de minéralisation globale pour chaque milieu et de le quantifier.

Tableau XII : Facteur permettant d'estimer la minéralisation d'un milieu à partir des mesures de conductivité (Rodier *et al.*, 1996).

Conductivité en $\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$ à 20 °C	Minéralisation en $\text{mg}\cdot\text{l}^{-1}$
Conductivité inférieure à 50 $\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$	1.365079 x conductivité
Conductivité comprise entre 50 et 166 $\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$	0.947658 x conductivité

## II.5.4. Dosage des cations et des anions

Les cations (sodium, potassium, calcium et magnésium) et anions (chlorures, sulfates et nitrates) des milieux d'exposition sont analysés à partir des prélèvements.

Sodium ( $\text{Na}^+$ ), potassium ( $\text{K}^+$ ), calcium ( $\text{Ca}^{2+}$ ), et magnésium ( $\text{Mg}^{2+}$ ) sont dosés par spectrophotométrie d'absorption atomique en flamme (SAA, Perkin Elmer modèle 2380), les chlorures ( $\text{Cl}^-$ ), sulfates ( $\text{SO}_4^{2-}$ ) et nitrates ( $\text{NO}_3^-$ ) par chromatographie ionique (Dionex 4500I).

## II.5.5. Dosage de l'aluminium total

Dès le prélèvement, les échantillons sont acidifiés à un pH inférieur à 3 pour leur conservation. Les dosages sont effectués dans la semaine suivant le prélèvement par spectrophotométrie d'absorption atomique électrothermique (Varian SPECTRAA300 ; GTA 96).

## II.5.6. Alcalinité

L'alcalinité est estimée par la titration de Gran, spécifique des eaux peu minéralisées. Un volume initial de 100 ml de milieu est prélevé dans un bêcher préalablement nettoyé à l'eau acidifiée et

rincé à l'eau déminéralisée. Quatre volumes d'acide sulfurique (0.001 N) sont ajoutés à cette quantité de départ jusqu'à atteindre un pH final inférieur à 3.8. Quatre couples de données "pH - volume d'acide ajouté pour obtenir ce pH" sont relevées pendant cette phase. Trois le sont pendant que le pH du milieu dans le bêcher est compris entre 4.2 et 3.8, la dernière lorsque le pH est inférieur à 3.8.

## **II.6. TECHNIQUES ET ANALYSES REALISEES SUR LES LARVES DE *DINOCRAS CEPHALOTES***

### **II.6.1. Evaluation de la mortalité**

Les larves mortes sont comptabilisées à chaque renouvellement de milieu .Le dénombrement intègre :

- les larves mortes dont le cadavre est visible,
- celles mortes en muant (comptées également dans les mues)
- et les restes de larves mangées par les autres. En effet, *Dinocras cephalotes* est une espèce cannibale. N'ayant pu déterminer selon nos observations si les larves étaient déjà mortes, moribondes ou non avant d'être mangées, les restes présents dans le milieu sont estimés dans la mortalité.

### **II.6.2. Pourcentage de poids sec par rapport au poids frais**

Pour déterminer le pourcentage d'eau contenu dans l'organisme, une mesure de poids frais et de poids sec est réalisé pour chaque individu. La larve est rincée avec de l'eau nanopure et soigneusement essuyée, puis, elle est pesée pour déterminer son poids frais. Après l'avoir ensuite laissée dans une étuve à 105 °C jusqu'à obtention d'un poids constant, le poids sec est déterminé.

### **II.6.3. Prélèvement de l'hémolymphe**

Différentes méthodes d'anesthésie des insectes existent :

- les méthodes physiques telle que la congélation mais, qui entraînent rapidement la mort de *Dinocras*,
- les méthodes chimiques, mais qui pourraient introduire des éléments étrangers dans l'hémolymphe.

Pour ces raisons, elles ne peuvent être employées au cours de ce travail. Ainsi, la manipulation est effectuée sur l'insecte non anesthésié. Le prélèvement se déroule sous une loupe binoculaire équipée d'un objectif micrométrique. La larve de *D. cephalotes* est rincée avec de l'eau déminéralisée ultrapure (eau nanopure), puis essuyée précautionneusement à l'aide de papier absorbant. Elle est ensuite fixée ventralement sur un support en paraffine au moyen de trois épingle, dont deux maintiennent une des

paires de pattes et la troisième l'extrémité abdominale. Ces positions sont précisées, car, d'importantes pertes d'hémolymphe se produisent si l'épingle est insérée au niveau de la tête ou du thorax de la larve, réduisant le volume d'hémolymphe et entraînant une baisse de la pression interne rendant le prélèvement impossible.

Une incision est pratiquée au niveau des premiers segments abdominaux dorsaux (en général, du 2<sup>ème</sup> au 5<sup>ème</sup> segment). L'extrémité d'un microtube capillaire est insérée dans cette ouverture et l'hémolymphe est aspirée par capillarité (Photo 3). Des pressions légères avec des pinces fines sur le thorax de l'insecte favorisent l'ascension du liquide dans le tube. Chaque microtube a une contenance maximale de 5  $\mu$ l, mais souvent, l'hémolymphe n'est plus aspirée au delà d'un volume de 3  $\mu$ l. Dans ces cas, pour un même insecte, l'hémolymphe est prélevée en plusieurs fois. Après cette manipulation, l'insecte est tué.

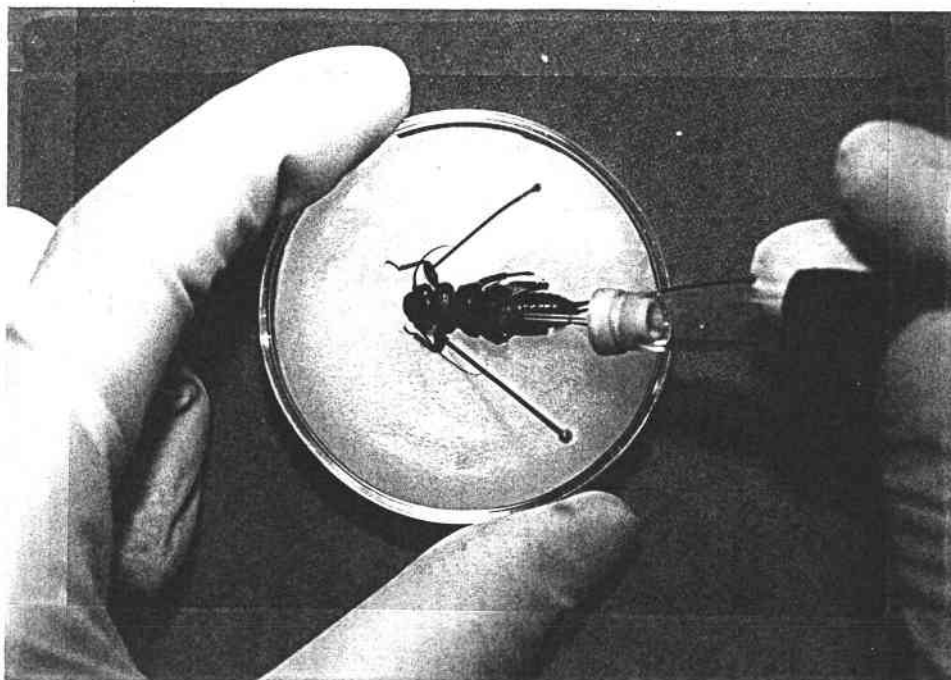


Photo 3 : Prélèvement de l'hémolymphe d'une larve de *Dinocras cephalotes*

#### II.6.4. Dosage des cations et des chlorures de l'hémolymphe

L'hémolymphe prélevée est diluée dans 5 ml d'eau nanopure avant d'être analysée. Chaque série de prélèvement contient :

- un tube contenant de l'eau nanopure avant la série de prélèvement d'hémolymphe (blanc avant)
- autant de tubes d'échantillons d'hémolymphe diluée que de Plécoptères prélevés
- un tube rempli d'eau nanopure (blanc après) pour vérifier qu'elle n'a pas été contaminée pendant la manipulation.

Le sodium et les autres cations, potassium, calcium et magnésium dans l'échantillon d'hémolymphe diluée sont dosés par spectrophotométrie d'absorption atomique, selon le même procédé que pour l'eau.

Les dosages de chlorures dans l'hémolymphe demandent une manipulation plus complexe. Ils doivent être effectués immédiatement après le prélèvement. Entre chaque dosage d'hémolymphe, la seringue et l'embout où se fait l'injection sur l'appareil sont rincés à l'eau nanopure. Tous les trois échantillons d'hémolymphe, un échantillon d'eau nanopure est analysé afin de vérifier qu'il n'y a pas de rétention d'ions dans la colonne et qu'aucune dérive de l'appareil ne se produit.

#### **Détermination du facteur de dilution (Fd)**

L'hémolymphe prélevée est diluée systématiquement dans un volume d'eau nanopure de 5 ml. Afin de déterminer le facteur de dilution (Fd), la formule suivante est appliquée :

$$Fd = (V_h + V_e)/V_e$$

avec :  $V_h$  = volume d'hémolymphe prélevé déterminé avec l'objectif micrométrique ( $\mu$ l)

$V_e$  = volume d'eau nanopure diluant l'échantillon d'hémolymphe (5000  $\mu$ l)

#### **Détermination des concentrations ioniques dans l'hémolymphe**

Afin de déterminer les concentrations de chaque ion dosé dans l'hémolymphe de l'insecte, la formule appliquée est la suivante :

$$[\text{ion}]_h (\text{mg.l}^{-1}) = [\text{ion}]_e \times Fd$$

avec :  $[\text{ion}]_h$  : concentration de l'ion considéré dans l'hémolymphe ( $\text{mg.l}^{-1}$ )

$[\text{ion}]_e$  : concentration de l'ion considéré dosée dans l'échantillon ( $\text{mg.l}^{-1}$ ).

### **II.6.5. Dosage des cations de l'organisme entier après minéralisation**

Chaque larve est préalablement rincée à l'eau nanopure, puis séchée à l'aide de papier absorbant. Le poids frais, puis sec est déterminé selon le protocole décrit précédemment. Les larves sont ensuite réduites en cendres pendant une heure et demie dans un four à 550 °C. Les cendres sont pesées, puis transférées individuellement dans un tube à essai avec 1.5 ml d'acide nitrique (2/3). Après agitation, les tubes sont mis dans des portoirs spéciaux et placés à l'étuve pendant 24 h. L'ensemble est ensuite dilué à 10 ml avec de l'eau nanopure, centrifugé et dosé en spectrophotométrie d'absorption atomique.

## Détermination des concentrations ioniques dans l'organisme entier

Après avoir déterminé, pour chaque ion, sa concentration dans l'échantillon, la formule suivante permet de ramener la quantité dosée à la concentration de l'ion considéré dans l'organisme entier :

$$\begin{aligned} [\text{ion}]_o \text{ (mg}^{-1} \text{ poids sec)} &= [\text{ion}]_e / 100 \times \text{PS} \\ [\text{ion}]_o \text{ (mg}^{-1} \text{ poids frais)} &= [\text{ion}]_e / 100 \times \text{PF} \end{aligned}$$

avec :  $[\text{ion}]_o$  (mg poids sec) : concentration en cet ion dans l'organisme *in toto* par mg de poids sec  
 $[\text{ion}]_o$  (mg poids frais) : concentration en cet ion dans l'organisme *in toto* par mg de poids frais  
 $[\text{ion}]_e$  : concentration en cet ion dosé dans l'échantillon minéralisé ( $\text{mg.l}^{-1}$ )  
PS : poids sec de l'organisme (mg)  
PF : poids frais de l'organisme (mg)

## II.6.6. Dosage des protéines totales de l'hémolymphe

### II.6.6.1. Principe

La méthode employée est celle de Lowry. Cette méthode utilise la fixation aux protéines de deux composés, le réactif de Biuret contenant du  $\text{CuSO}_4$  et le réactif de Folin-Ciocalteu, qui forment un complexe quasi instantanément, en particulier avec les acides aromatiques et les résidus cystéine des protéines. Une coloration bleue apparaît après fixation aux protéines. L'intensité de cette coloration bleue est mesurée à 600 nm. Une gamme étalon est réalisée en parallèle avec une solution d'albumine sérique bovine (ASB).

### II.6.6.2. Expression des résultats

Les mesures réalisées à partir de la gamme étalon permettent de déterminer les concentrations en protéines totales dans l'échantillon. Ces dernières ramenées au volume de ce dernier donnent les concentrations en protéines totales dans l'organisme exprimées en microgramme par microlitre.

## II.6.7. Respirométrie

La méthode utilisée est dérivée de celle décrite par Lenfant (1961) et Harichaux *et al.* (1972).

### II.6.7.1. Principe

Les mesures se font en confinement aquatique (Boussard, 1980). Les larves d'insectes sont placées dans une cuve respirométrique fermée hermétiquement contenant de l'eau du milieu testé. Les variations de la consommation d'oxygène de *D. cephalotes* sont enregistrées en continu.

### II.6.7.2. Dispositif expérimental

La sonde de l'oxymètre (OXI 537) plonge dans la cuve respirométrique en Plexiglas d'une contenance de 125 ml. A sa sortie, un enregistreur (radiometer REA 112) note en continu les variations en oxygène du milieu. L'homogénéité de ce dernier, condition nécessaire pour la validité de la mesure en milieu fermé, est assurée avec un agitateur magnétique (Quentin et Michel, 1983). L'étalonnage de l'électrode de mesure est effectué au moyen d'eau dépourvue d'oxygène par addition de sulfite de sodium et d'eau saturée par bullage d'air (Boussard et Pihan, 1980).

### II.6.7.3. Protocole

Deux larves sont placées dans la cuve contenant l'eau du milieu. La sonde fermant hermétiquement le milieu est placée délicatement pour éviter la surpression sur la membrane. Le milieu est homogénéisé avec l'agitateur magnétique. La vitesse de défilement de l'enregistreur est de 10 cm.h<sup>-1</sup>. A la fin de l'expérience, les insectes sont rincés à l'eau nanopure, séchés, pesés, et mis à sécher en étuve à 105 °C pour déterminer le poids sec. Pour chaque milieu, l'expérience est réalisée avec cinq lots de larves.

### II.6.7.4. Expression des résultats

L'enregistrement fournit les données nécessaires au calcul de la quantité d'oxygène (VO<sub>2</sub>) consommée par unité de poids et de temps :

$$VO_2 \text{ (mg.O}_2\text{.h}^{-1}\text{.mg}^{-1}\text{)} = (DO_2 \times V) / (T \times PS)$$

avec : DO<sub>2</sub> : variation de la concentration en oxygène dans le milieu (mg.O<sub>2</sub>.l<sup>-1</sup>)

T : temps de mesure (h)

PS : poids sec de l'organisme (mg)

V : volume de la cuve respirométrique (l)

La consommation propre de la sonde est mesurée, puis soustraite à la VO<sub>2</sub> calculée.

## **II.6.8. Histologie**

Afin de vérifier si l'exposition de *Dinocras cephalotes* dans un milieu acidifié peut entraîner des pathologies au niveau des différents organes et tissus de l'insecte, des observations sont réalisées en microscopie optique et électronique.

### **II.6.8.1. Microscopie optique**

Quatre étapes sont nécessaires pour préparer les lames de coupe de l'insecte :

#### **La fixation**

Afin de permettre une meilleure pénétration du produit, les larves sont décapitées avant d'être immergées dans le fixateur. Deux fixateurs sont utilisés:

- le Carnoy : il est composé d'alcool absolu (1/3), de chloroforme (1/3) et d'acide acétique (1/3). Il conserve très bien les structures nucléaires, mais dissout les lipides. Du fait de sa haute teneur en alcool, il a un effet durcissant marqué, donc, l'insecte à fixer ne doit pas être exposé pendant plus de 24 heures à ce mélange.
- le Zenker : C'est un mélange de chlorure mercurique, bichromate de potassium et de sulfate de sodium. Grâce à ces composants, ce fixateur conserve les affinités tinctoriales et les lipides. De l'acide acétique est ajouté juste avant l'utilisation pour la conservation. Le temps d'exposition est de 24 à 48 heures, et en aucun cas, ne doit être dépassé

#### **Le liquide d'attente**

Après avoir soigneusement déshydraté les larves dans quatre bains successifs de une demi heure chacun dans de l'alcool absolu, les larves sont plongées dans une solution de benzoate de méthyl additionné à 1 % de celloïdine (procelloïdine Fluka). Ce produit assure un ramollissement de la cuticule permettant ainsi la coupe tout en assurant un maintien des structures grâce à la celloïdine. Les larves d'insectes sont exposées à ce ramollisseur pendant 5 jours minimum. Les bains sont renouvelés régulièrement du fait du relargage d'alcool, le premier après une heure, puis tous les jours.

#### **L'inclusion et la coupe**

Afin d'éliminer toute trace du liquide d'attente, les larves sont ensuite exposées à trois bains de toluène successifs, liquide intermédiaire miscible à la paraffine. Après avoir subi ces étapes, les larves sont plongées dans un pilulier rempli de paraffine fondue, et laissées ainsi pendant 12 heures dans l'étuve à 60 °C. Les blocs de paraffine pour la coupe sont ensuite moulés. Quand ils sont refroidis, des coupes de 7 µm d'épaisseur sont réalisées. La coloration n'est faite que 24 h après le séchage.

#### **La coloration**

Pour cette étude, deux colorants ont été utilisés:

- le bleu de toluidine (1 %) : c'est un colorant nucléaire très actif. Les noyaux sont colorés en bleu et les mucopolysaccharides en rouge.
- le trichrome en un temps : Il permet d'obtenir différentes couleurs en exposant les individus une seule fois à la solution en 10 min. C'est un colorant topographique qui colore les noyaux et le cytoplasme en rouge, les fibres conjonctives en vert.

### L'observation

Tous les organes et tissus des larves sont examinés au microscope optique. Cela s'applique au lot de larves témoins, et ceux exposés au milieu contrôle et acidifié.

### II.6.8.2. Microscopie électronique

Afin de compléter les observations réalisées en microscopie optique, des coupes sont réalisées pour pouvoir être examinées en microscopie électronique.

Les différentes phases et produits sont donnés dans le tableau XIII.

Tableau XIII : Liste des différentes phases et des produits employés pour réaliser les coupes à observer en microscopie électronique.

Fixation	Glutaraldéhyde dans du tampon phosphate
Lavages	Tampon phosphate
Post-fixation	Tetroxyde d'osmium
Déshydratation	alcool à 30 - 50 - 70 - 95 - 100°, oxyde de propylène
Imprégnation	résine + oxyde de propylène (plusieurs bains), puis résine pure
Inclusion	Résine pure
Polymérisation	Etuve à 38 °C, puis à 60 °C

Les coupes semi-fines (1  $\mu\text{m}$  d'épaisseur) sont colorées au bleu de toluidine. Les coupes ultrafines (60 - 90 nm d'épaisseur) sont colorées pour renforcer le contraste avec de l'acétate d'uranyle, puis du citrate de plomb. L'observation est réalisée sur microscope électronique à transmission.

## II.7. TRAITEMENTS STATISTIQUES

Les comparaisons de moyennes sont faites par un test t de Student ou par une analyse de variance. Lorsque l'analyse de variance met en évidence des variations significatives, un test complémentaire de Tuckey HSD est réalisé pour déterminer les éléments qui diffèrent.



# CHAPITRE III. : MISE EN EVIDENCE DES CONSEQUENCES DE L'ACIDIFICATION D'UN COURS D'EAU SUR UN INSECTE SENSIBLE, *DINOCRAS CEPHALOTES* : ETUDE *IN SITU*

## III.1. INTRODUCTION

Les macroinvertébrés aquatiques représentent un compartiment particulièrement affecté dans tous les cours d'eau soumis au processus de l'acidification. Une baisse dans leur diversité et dans leur abondance est observée et apparaît corrélée avec l'acidité augmentante de l'eau (Sutcliffe et Hildrew, 1989, Guérol, 1992).

Cependant, cette mortalité ne présentant pas d'effets "catastrophe" tels que la vision de poissons morts flottant à la surface de l'eau, ni d'enjeu économique particulier, la plupart des études réalisées afin d'expliquer la mortalité induite sur les organismes aquatiques exposés à un environnement acidifié portent sur les poissons téléostéens, notamment les Salmonidés.

Ces travaux mettent principalement en évidence une perturbation de l'homéostasie, due au dérèglement du système osmorégulateur suite à la perte des ions chlorures et sodium plasmatiques.

Les insectes sont concernés par un nombre restreint d'études. Ces travaux montrent que, suite à une exposition en milieu acidifié, certaines espèces d'insectes présentent une baisse de leurs concentrations en chlorures et en sodium. Toutefois, les conditions expérimentales, notamment les milieux utilisés, ne sont pas toujours bien détaillées. Lorsqu'elles le sont, les paramètres physico-chimiques testés ne sont pas toujours très pertinents par rapport à ceux pouvant être mesurés sur le terrain, ce qui peut entraîner un biais quant aux réponses mesurées. De plus, souvent, un insecte est choisi comme organisme d'étude dans une expérience et un seul paramètre de sa physiologie est suivi. Pour un autre paramètre, une autre espèce est concernée, ce qui rend difficile une synthèse compte tenu de la grande variabilité interspécifique.

Dans ce travail, le premier intérêt est de réaliser le plus grand nombre de suivis physiologiques dans les mêmes conditions et sur le même insecte. L'objectif de recherche de l'expérience réalisée *in situ* est de déterminer si *Dinocras cephalotes* (Plécoptère ; Perlidé) présente les qualités requises pour le reste de ce travail à savoir :

- la sensibilité face à un environnement acidifié,
- une taille suffisamment grande pour faciliter les prélèvements,
- une bonne résistance de l'insecte à supporter les manipulations.

Elle permet ainsi d'appréhender si cette espèce peut être employée ensuite au laboratoire dans des conditions contrôlées. Deux critères sont choisis afin d'évaluer le stress des animaux exposés :

- la mortalité,
- les concentrations en chlorures et en sodium dans l'hémolymphe car des variations significatives de ces dernières traduisent une perturbation de la régulation ionique.

### III.2. PROTOCOLE EXPERIMENTAL

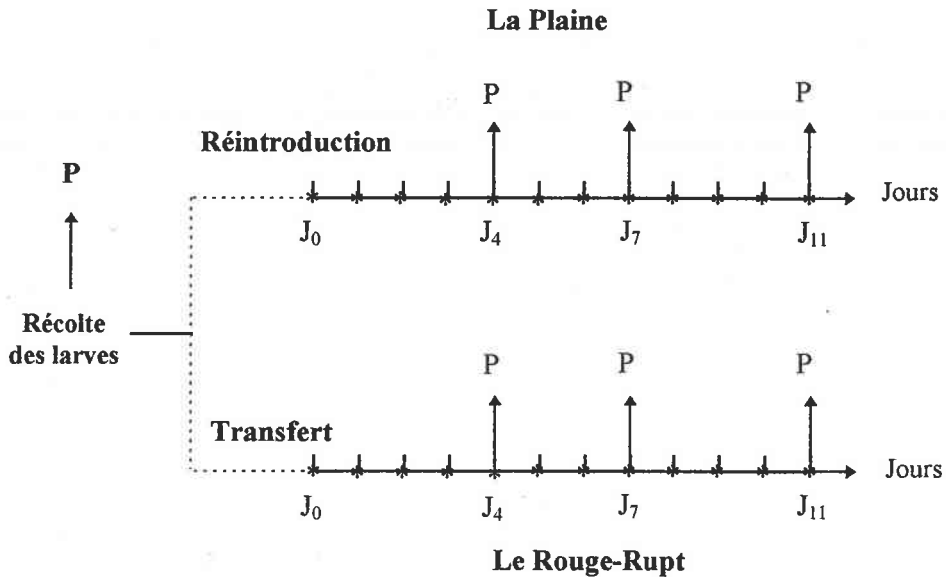


Figure 22 : Protocole de prélèvement des échantillons d'eau et des larves sur les deux cours d'eau pendant les 11 jours d'expérience. (\* : prélèvement d'eau ; P : prélèvement d'hémolymphe).

Le dispositif, les sites choisis et le protocole de l'expérience étant décrits dans la partie matériel et méthodes (cf. § II.2.1.), seul le déroulement général de l'expérience est présenté (Figure 22).

Les larves de *Dinocras cephalotes* (45) sont récoltées dans le cours d'eau "la Plaine" fin juin. Cinq individus sont prélevés afin de déterminer les concentrations initiales en chlorures et en sodium dans l'hémolymphe. Les 40 individus restant sont divisés en deux lots homogènes de 20 larves. Un lot est laissé sur le site d'origine tandis que l'autre est transféré dans le Rouge-Rupt, cours d'eau acidifié.

Pendant les onze jours de l'expérience, les 4<sup>ème</sup>, 7<sup>ème</sup> et 11<sup>ème</sup> jour, cinq larves sont prises aléatoirement dans chaque cage d'exposition afin de prélever leur hémolymphe selon le protocole décrit dans le paragraphe II.6.3. La mortalité est comptée à ces mêmes dates.

Afin de suivre la physico-chimie des cours d'eau, des prélèvements journaliers d'eau sont effectués.

Les résultats des concentrations ioniques moyennes mesurées dans l'hémolymphe des larves des différents lots sont comparés par un test t de Student.

### III.3. RESULTATS - DISCUSSION

#### III.3.1. Caractéristiques physico-chimiques de l'eau de la Plaine et du Rouge-Rupt

Les mesures physico-chimiques réalisées sur la Plaine mettent en évidence que ce cours d'eau n'est pas soumis au processus d'acidification (Tableau XIV). Le pH est proche de la neutralité, et la minéralisation est normale pour un cours d'eau s'écoulant dans le massif vosgien. L'alcalinité mesurée démontre un pouvoir tampon élevé.

Tableau XIV : Physico-chimie des deux cours d'eau vosgiens analysés entre le 23 juin et le 3 juillet 1994 (moyenne  $\pm$  écart-type ; n = nombre de mesures effectuées).

	Unités	Plaine		Rouge-Rupt		test t <sup>b</sup>
pH		6.90 $\pm$ 0.04	n = 4	5.80 $\pm$ 0.02	n = 4	*
Conductivité	$\mu\text{S.cm}^{-1}$	77.7 $\pm$ 1.7	n = 11	14.1 $\pm$ 0.5	n = 11	*
Minéralisation <sup>a</sup>	$\text{mg.l}^{-1}$	73.1 $\pm$ 1.6	n = 11	19.3 $\pm$ 0.7	n = 11	*
Température	$^{\circ}\text{C}$	15.0 $\pm$ 0.1	n = 4	14.9 $\pm$ 0.2	n = 4	n.s.
Na <sup>+</sup>	$\text{mg.l}^{-1}$	4.4 $\pm$ 0.1	n = 11	1.4 $\pm$ 0.1	n = 11	*
Ca <sup>2+</sup>	$\text{mg.l}^{-1}$	5.6 $\pm$ 0.2	n = 11	0.7 $\pm$ 0.1	n = 11	*
K <sup>+</sup>	$\text{mg.l}^{-1}$	1.6 $\pm$ 0.1	n = 11	0.1 $\pm$ 0.03	n = 11	*
Mg <sup>2+</sup>	$\text{mg.l}^{-1}$	2.6 $\pm$ 0.1	n = 11	0.2 $\pm$ 0.02	n = 11	*
Cl <sup>-</sup>	$\text{mg.l}^{-1}$	6.4 $\pm$ 0.6	n = 11	0.8 $\pm$ 0.1	n = 11	*
NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	$\text{mg.l}^{-1}$	4.6 $\pm$ 0.8	n = 11	0.3 $\pm$ 0.1	n = 11	*
SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>	$\text{mg.l}^{-1}$	7.1 $\pm$ 0.6	n = 11	3.0 $\pm$ 0.1	n = 11	*
Aluminium	$\text{mg.l}^{-1}$	0.13 $\pm$ 0.01	n = 11	0.44 $\pm$ 0.08	n = 11	*
Alcalinité	$\text{meq.l}^{-1}$	0.32 $\pm$ 0.02	n = 4	0.01 $\pm$ 0.02	n = 4	*

a : la minéralisation est calculée à partir des résultats de conductivité selon les formules de Rodier (1996) données dans la partie II.5.3.

b : les résultats de physico-chimie obtenus pour les deux cours d'eau sont comparés à l'aide d'un test t (n.s. : différence non significative ; \* : différence significative à  $p < 0.05$ ).

La faible alcalinité et la concentration élevée en aluminium mesurées dans le Rouge-Rupt sont caractéristiques d'un cours d'eau acidifié. Toutefois, le pH mesuré pendant cette expérience est supérieur aux données de Guérold (1992) (Tableau XV). Plusieurs facteurs expliquent ce phénomène - l'expérience est réalisée en période d'étiage (fin du printemps, début de l'été), période de l'année pendant laquelle les pH sont les plus élevés dans les cours d'eau,

- la cage n'est pas positionnée directement dans le lit du cours d'eau. En effet, pour faciliter son mode de fixation et son accès, elle est placée dans une dérivation du Rouge-Rupt. La figure 21 (cf. § II.2.1.) situe son niveau par rapport à celui du cours d'eau principal. Le débit plus faible dans la dérivation peut indirectement contribuer à l'élévation du pH,
- les pH mesurés dans les affluents du Rouge-Rupt (tableau XV) sont toujours plus élevés que ceux du cours d'eau principal.

Tableau XV : pH minimum, moyen et maximum mesurés dans le Rouge-Rupt et ses affluents de fin mai 91 à début 92 (Guérol, 1992).

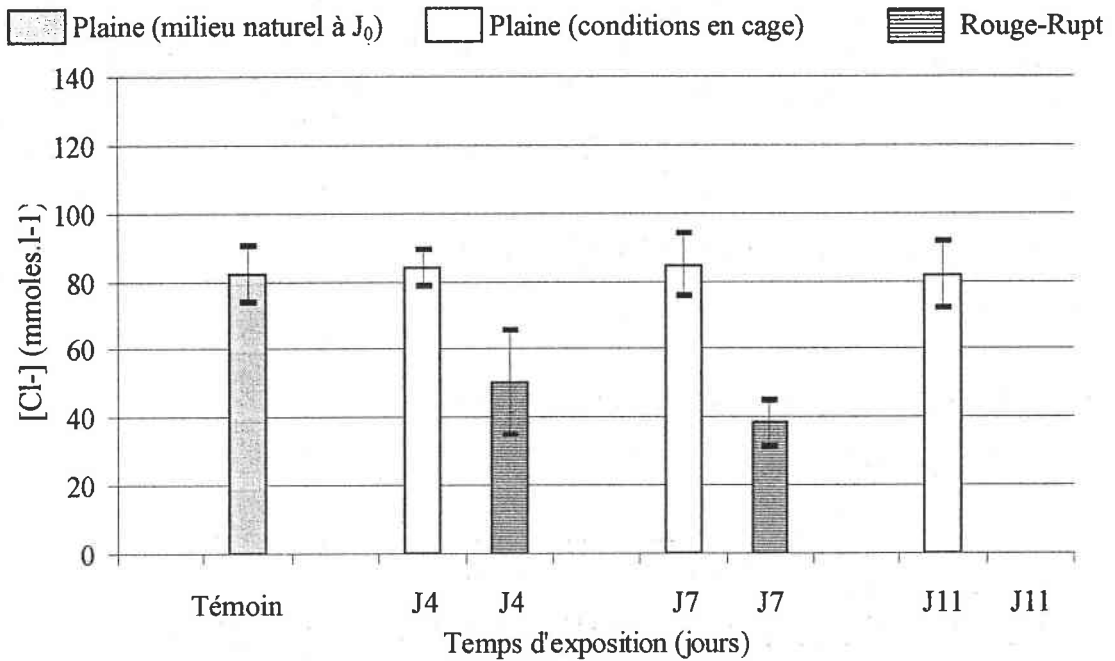
Cours d'eau	Altitude m	pH mesuré sur le terrain		
		minimum	moyenne	maximum
Rouge-Rupt	1020	4.24	4.54	4.80
Rouge-Rupt	845	4.64	4.89	5.17
Rouge-Rupt	675	4.69	5.02	5.45
Affluents du Rouge-Rupt				
Pourri Faing	1000	4.24	4.57	4.84
Blancs Murgers	960	4.48	4.96	5.55
Grande Basse	840	4.47	4.73	5.02
Grand Ventron	820	4.65	5.12	5.63
Echarges	730	5.03	5.62	6.16
Wassongoutte	700	4.63	4.85	5.1

La minéralisation mesurée dans le Rouge-Rupt pendant l'expérience est très faible et les concentrations en différents ions, notamment celles en calcium sont peu élevées. Les anions les plus représentés sont les sulfates.

### III.3.2. Effets des différents milieux sur les larves

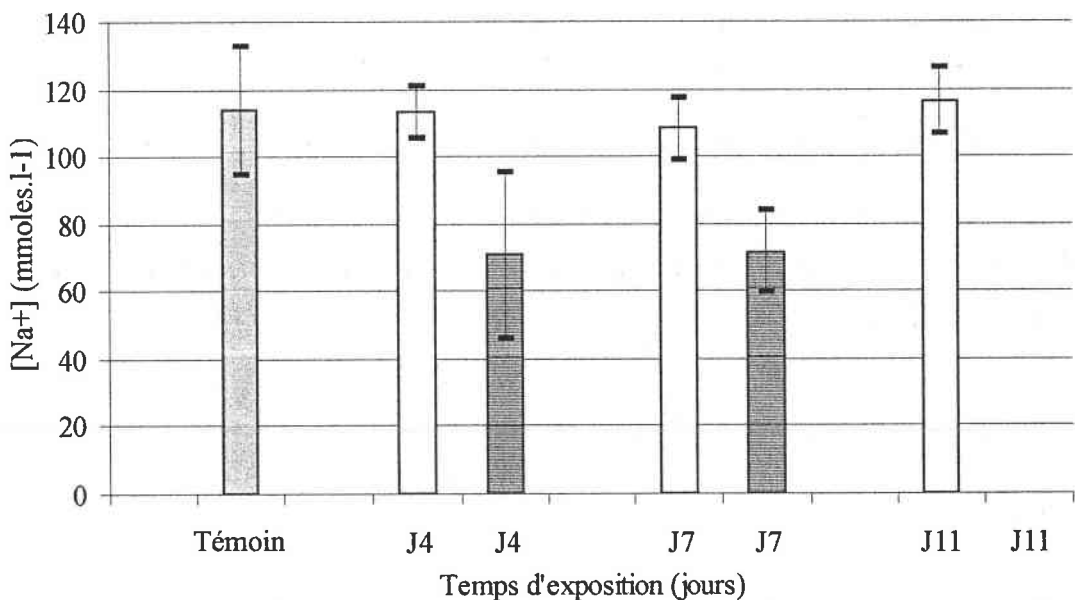
#### III.3.2.1. Mortalité

Pendant tout le déroulement de l'expérience, aucune larve morte, ni disparue (par cannibalisme par exemple) n'est recensée dans le lot resté sur le site d'origine, la Plaine. Par conséquent, les conditions de captivité sont bonnes. A l'inverse, une forte mortalité est constatée dans le lot de larves transférées dans le Rouge-Rupt. Après 4 jours de transfert, 30 % des larves exposées sont mortes, et après 7 jours, plus de 50 % du lot.



\* : aucune mesure n'est réalisée en raison de la forte mortalité survenue dans ce lot

Figure 23 : Concentrations moyennes en chlorures mesurées dans l'hémolymph des larves exposées à une eau acidifiée (Rouge-Rupt) et non acidifiée (Plaine) pendant 11 jours. Les barres verticales représentent l'écart-type sur la valeur de la moyenne (o / + : les moyennes ayant le même signe ne sont pas significativement différentes, tandis que celles annotées de signes différents le sont hautement au seuil de 0.01).



\* : aucune mesure n'est réalisée en raison de la forte mortalité survenue dans ce lot

Figure 24 : Concentrations moyennes en sodium mesurées dans l'hémolymph des larves exposées à une eau acidifiée (Rouge-Rupt) et non acidifiée (Plaine) pendant 11 jours. Les barres verticales représentent l'écart-type sur la valeur de la moyenne (o / + : les moyennes ayant le même signe ne sont pas significativement différentes, tandis que celles annotées de signes différents le sont hautement au seuil de 0.01).

### III.3.2.2. Concentrations en chlorures et en sodium dans l'hémolymphe des larves des deux sites

L'analyse de l'hémolymphe prélevée sur les larves du lot initial permet d'établir les concentrations moyennes initiales en chlorures et en sodium, respectivement de 82 et 114 mmol.l<sup>-1</sup> (Figures 23 et 24). Pendant toute la durée de l'expérience, les concentrations de ces deux ions mesurées dans l'hémolymphe des larves du lot laissé sur la Plaine ne présentent aucune différence significative par rapport à celles déterminées pour le lot initial. Ainsi, dans le milieu d'origine, malgré la séquestration, les concentrations ioniques se maintiennent à leur niveau initial.

A l'opposé, une diminution hautement significative ( $p < 0.01$ ) des teneurs en chlorures et en sodium est mesurée dans l'hémolymphe des larves prises dans le lot exposé au milieu acidifié.

Après 4 jours d'exposition, la concentration en chlorures atteint 50 mmol.l<sup>-1</sup>, ce qui représente une perte de 40 % par rapport aux données initiales. Pour le sodium, la perte est du même ordre de grandeur avec une concentration qui chute de 113 à 71 mmol.l<sup>-1</sup>.

Trois jours après, les prélèvements ne sont réalisés que pour quatre larves en raison de la forte mortalité survenue dans ce lot. Trois seulement sont réussis car il a été impossible de prélever l'hémolymphe de la quatrième. Alors que les concentrations moyennes en sodium se sont maintenues au niveau mesuré précédemment, celles en chlorures ont continué à diminuer. Elles ont atteint 38 mmol.l<sup>-1</sup> ce qui représente une perte de 66 % par rapport aux concentrations initiales.

Aucune mesure n'a pu être réalisée le 11<sup>ème</sup> jour de l'expérience par manque d'individus survivants dans le lot transféré.

## III.4. CONCLUSION

Pendant cette expérience réalisée sur le terrain, les larves de *Dinocras cephalotes* ont montré une grande capacité à supporter diverses manipulations telles que le prélèvement au Surber, le confinement dans une cage et le transport sur d'autres sites (terrain, laboratoire). En effet, malgré toutes ces perturbations, aucune mortalité n'est observée dans le lot de larves resté sur le site d'origine.

A l'opposé, l'exposition à une eau acidifiée provoque une mortalité élevée chez les larves soumises à cet environnement confirmant l'acido-sensibilité de l'espèce *Dinocras cephalotes*. De même, la baisse significative des concentrations en chlorures et sodium mise en évidence dès le quatrième jour de l'expérience traduit une perturbation de la régulation ionique de cet insecte et confirme également l'acido-sensibilité de l'espèce.

*Dinocras cephalotes* apparaît être un insecte approprié pour les différentes expériences prévues au laboratoire, et qui sont rapportées l'objet des chapitres IV, V et VI

# CHAPITRE IV. : PERTURBATIONS PHYSIOLOGIQUES ET HISTOPATHOLOGIE DES LARVES DE *DINOCRAS CEPHALOTES* EXPOSEES A UN MILIEU ACIDIFIE EN LABORATOIRE.

## IV.1. INTRODUCTION

L'expérience précédente réalisée dans les Vosges a confirmé que *Dinocras cephalotes* est une espèce sensible à l'acidification. En effet, dès le quatrième jour d'exposition *in situ* à une eau acidifiée, une perturbation de la régulation ionique, accompagnée d'une forte mortalité, est observée. Il est probable que d'autres fonctions de l'organisme soient dérégées, car la perturbation de la régulation ionique traduit un dérèglement général de l'homéostasie de l'individu. De ce fait, il a paru intéressant de réaliser une expérience exposant des larves à des milieux acidifiés afin de contrôler plusieurs paramètres physiologiques pour déterminer s'ils étaient perturbés. Afin de limiter les contraintes expérimentales rencontrées sur le terrain, telles que l'éloignement des sites entre eux et par rapport au laboratoire, l'expérience est réalisée au laboratoire. Différents milieux sont constitués tels que leurs caractéristiques physico-chimiques soient les plus proches possibles de celles rencontrées *in situ*. Comme quatre jours d'exposition en milieu acidifié suffisent pour initier des effets néfastes, la durée de l'exposition est fixée à huit jours afin que ces éventuels effets soient suffisamment prononcés.

Différentes observations et fonctions physiologiques sont suivies à la fin de ce laps de temps afin de déterminer les éventuelles perturbations :

- comptabilisation des morts et des mues,
- observation comportementale des larves,
- évaluation des concentrations en protéines totales et en cations (sodium, potassium, calcium, magnésium) dans l'hémolymphe, ainsi que des concentrations en ces mêmes cations dans l'organisme entier,
- détermination du poids sec par rapport au poids frais,
- mesure du taux de consommation d'oxygène,
- étude histopathologique (microscopie optique et électronique) des différents tissus et organes.

Cette étude a pour objectif d'appréhender certains mécanismes physiologiques fondamentaux susceptibles d'être perturbés suite à une exposition en milieu acidifié, et ainsi d'expliquer la mortalité provoquée par un tel environnement. De plus, à partir de ces données, les critères les plus aisés à mesurer et les plus reproductibles pourront être retenus et utilisés ultérieurement comme indicateurs de stress.

## IV.2. PROTOCOLE EXPERIMENTAL

### IV.2.1. Milieux expérimentaux

Les milieux sont réalisés et leur physico-chimie suivie selon le protocole décrit précédemment (cf. § II.4.2.). Leurs caractéristiques principales sont rappelées dans le tableau XVI ; la composition détaillée se trouve dans le chapitre II (cf. II.3.).

Deux unités expérimentales sont constituées (description dans la partie II.2.2.3.) :

- la première (6.6M) contient le milieu contrôle qui est un milieu sans aluminium, dont le pH et la minéralisation sont proches de ceux de la Plaine,
- la seconde (4.6PMAI) représente un milieu acidifié caractérisé par un pH acide, une faible minéralisation et une forte concentration en aluminium.

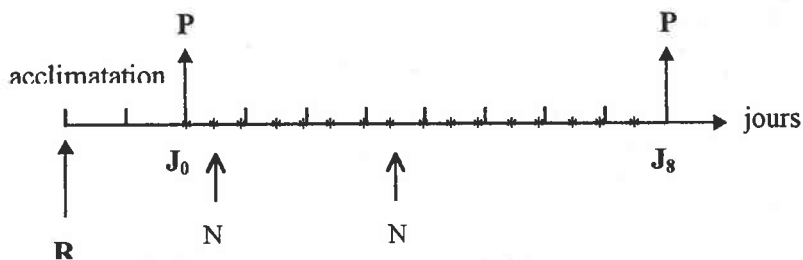
Tableau XVI : Caractéristiques nominales pour les deux milieux expérimentaux : milieu contrôle (6.6M) et milieu acidifié (4.6PMAI).

Paramètres	Unités	Milieu contrôle	Milieu acidifié
		6.6M	4.6PMAI
pH		6.6	4.6
Minéralisation	mg.l <sup>-1</sup>	82	25
Aluminium total	mg.l <sup>-1</sup>	0.01	0.54

### IV.2.2. Protocole de prélèvement

Les larves (220 individus) sont prélevées avec un Surber dans la rivière Plaine et ramenées au laboratoire dans des glacières contenant de l'eau et des cailloux du site. Elles sont maintenues dans ces conditions pendant deux jours afin, d'une part d'éliminer le stress provoqué par le prélèvement au Surber et le voyage, et d'autre part, de les acclimater aux conditions de température et de lumière de la salle d'expérience (Figure 25). Après deux jours d'acclimatation, les larves mortes (5) sont retirées (2 % du total).





**R** : Récolte des larves sur le terrain

**P** : Prélèvements d'hémolymphe

\* : Renouvellement des milieux avec mesures des paramètres pH, conductivité et température avant et après le renouvellement

**N** : Nutrition des Plécoptères par des larves de Chironomes vivants. Les larves ne sont pas nourries à J<sub>7</sub> car, pour toutes les expériences, la dernière alimentation est réalisée au minimum trois jours avant le prélèvement d'hémolymphe.

Figure 25 : Déroulement de l'expérience au laboratoire.

Parmi les survivantes, 150 larves sont alors transférées dans les bacs expérimentaux (60 dans le milieu contrôle et 90 dans le milieu acidifié en raison de la mortalité attendue) et exposées aux différents milieux. Les 65 larves restantes (tableau XVII), sont prises aléatoirement à J<sub>0</sub>, afin de déterminer les niveaux initiaux de chacun des paramètres suivis. Après huit jours d'exposition (J<sub>8</sub>), une mesure identique est effectuée sur les larves exposées au différents milieux.

Les protocoles suivis pour la réalisation des différentes mesures et leurs analyses sont décrits dans le chapitre II (cf. § II.6.).

Tableau XVII : Nombre de larves utilisées pour chaque mesure de paramètres physiologiques.

Paramètres	J <sub>0</sub>	Nombre de larves	
		J <sub>8</sub> 6.6M Milieu contrôle	J <sub>8</sub> 4.6PMAl Milieu acidifié
Consommation en oxygène	12	10	8
Concentration en cations dans l'hémolymphe	7	7	7
Concentrations en protéines dans l'hémolymphe	6	6	6
Concentrations en cations dans l'organisme	11	11	8
Poids frais - Poids sec	25	14	14
Histologie	4	4	4
<b>Total</b>	<b>65</b>	<b>52</b>	<b>47</b>

## IV.3. RESULTATS

### IV.3.1. Caractéristiques des milieux d'exposition

Dans le milieu contrôle, les paramètres physico-chimiques de l'eau varient peu pendant la durée de l'expérience (Tableau XVIII), avec un coefficient de variation inférieur à 14 %, sauf pour l'alcalinité et la concentration en aluminium dont les fluctuations sont plus importantes. Les valeurs mesurées lors des différentes analyses correspondent aux valeurs fixées par le protocole (cf. § II.3.), à l'exception du potassium dans le milieu contrôle. En effet, ces dernières (4.9 mg.l<sup>-1</sup>) sont supérieures à celles attendues (1.9 mg.l<sup>-1</sup>). Cela s'explique par le fait que les valeurs fixées par le protocole concernent les valeurs obtenues après la dilution de la solution mère ; ainsi, elles ne prennent pas en compte les éléments ajoutés comme par exemple, le potassium lors de l'ajustement au pH 6.6 avec l'hydroxyde de potassium. Pour cette même raison (ajout de base ou d'acide pour ajuster les pH), la conductivité, et donc la minéralisation, est légèrement supérieure aux valeurs fixées (87 mg.l<sup>-1</sup> au lieu de 82 mg.l<sup>-1</sup>). Il convient de préciser que les concentrations en sulfates du milieu acidifié testé en laboratoire sont peu élevées alors que de fortes concentrations en cet élément sont une des caractéristiques des cours d'eau acidifiés *in situ*.

Tableau XVIII : Caractéristiques physico-chimiques des milieux (moyenne ± écart type ; coefficient de variation de chaque paramètre (%); n = nombre de mesures). Test t de Student (n.s. : différence non significative ; \* : différence significative à p < 0.05).

Paramètres	Unités	n	Milieu contrôle // 6.6M		Milieu acidifié // 4.6PMAI		Test t
pH		n = 32	6.64 ± 0.04	0.6	4.64 ± 0.09	1.9	*
Température	°C	n = 32	15.2 ± 2.1	13.8	15.0 ± 1.9	12.7	n.s.
Conductivité	µs.cm <sup>-1</sup>	n = 32	87.1 ± 2.1	2.4	22.0 ± 1.3	5.9	*
Minéralisation	mg.l <sup>-1</sup>	n = 32	82.6 ± 2.0	2.4	30.2 ± 1.8	5.9	*
Alcalinité	meq.l <sup>-1</sup>	n = 5	0.07 ± 0.02	28.6	-0.09 ± 0.02	22.0	*
Sodium	mg.l <sup>-1</sup>	n = 12	7.3 ± 0.5	6.8	0.9 ± 0.2	22.2	*
Calcium	mg.l <sup>-1</sup>	n = 12	5.3 ± 0.3	5.7	0.8 ± 0.08	10	*
Potassium	mg.l <sup>-1</sup>	n = 12	4.9 ± 0.3	6.1	0.7 ± 0.03	4.3	*
Magnésium	mg.l <sup>-1</sup>	n = 12	2.1 ± 0.1	4.8	0.2 ± 0.03	15	*
Chlorures	mg.l <sup>-1</sup>	n = 12	10.1 ± 0.6	5.9	1.4 ± 0.3	21.4	*
Sulfates	mg.l <sup>-1</sup>	n = 12	17.9 ± 0.8	4.5	4.2 ± 0.4	9.5	*
Nitrates	mg.l <sup>-1</sup>	n = 12	6.7 ± 0.4	6.0	4.6 ± 0.2	4.35	*
Aluminium	mg.l <sup>-1</sup>	n = 12	0.09 ± 0.02	22.2	0.50 ± 0.04	8	*

Toutefois, étant donné que l'un des facteurs principaux testé dans ce travail est la faible minéralisation, il était impossible de créer un milieu avec de fortes concentrations en sulfates sans augmenter celles des cations associés dans le sel utilisé à cet effet.

Pour le milieu acidifié, les variations des différents paramètres physico-chimiques sont un peu plus importantes que celles du milieu contrôle, avec toutefois des coefficients de variation inférieurs à 23 %. La minéralisation est plus élevée que celle attendue (30.2 mg.l<sup>-1</sup> contre 25 mg.l<sup>-1</sup>) suite à l'ajout d'acide pour ajuster le pH. Statistiquement (test t ; p < 0.05), les deux milieux sont significativement différents pour tous les paramètres à l'exception de la température.

### IV.3.2. Mortalité et mues observées pendant les huit jours d'expérience

Dans le milieu contrôle, la mortalité est restée faible avec un taux de 6.6 %, soient quatre individus morts pendant la durée de l'expérience (figure 26).

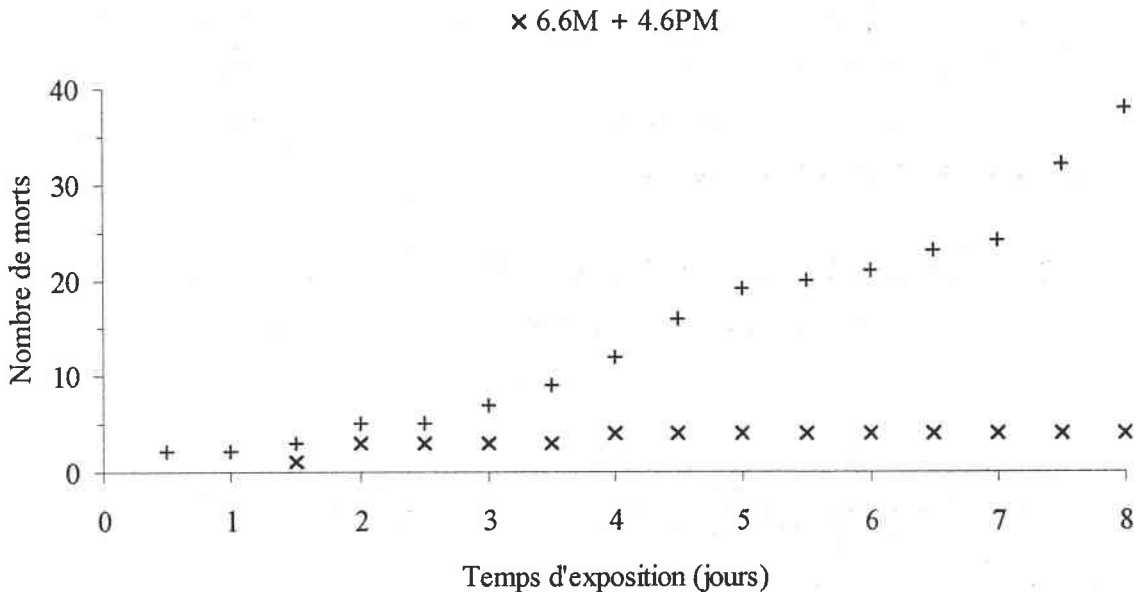


Figure 26 : Mortalité cumulée relevée pendant les huit jours d'expérience.

La combinaison "pH acide - forte concentration en aluminium - faible minéralisation" qui compose le milieu acidifié entraîne une mortalité plus importante dans le lot de larves soumis à cet environnement, avec 42.2 % de morts. La mortalité s'est produite tout au long de l'expérience, atteignant un maximum le 7<sup>ème</sup> jour avec 14 larves mortes (8 pendant les 12 premières heures, 6 pendant les 12 autres heures de la journée).

Le nombre de mues est à peu près le même dans les deux milieux, soit 3 et 4 mues respectivement dans le milieu contrôle et acidifié. Cependant, dans le milieu acidifié, trois mues ont échoué, les larves n'ayant pas réussi à s'extraire de l'exuvie.

### **IV.3.3. Observation comportementale des larves de *Dinocras cephalotes* durant l'expérience**

L'observation des larves exposées aux deux milieux montre des différences dans leur comportement. N'ayant pu quantifier ces dernières, elles sont toutefois décrites dans cette partie, car elles montrent que les larves mises dans le milieu acidifié sont affectées et que ce stress se manifeste à de nombreux niveaux.

*Dinocras cephalotes* est une espèce d'insecte dynamique s'enfuyant très rapidement dès le moindre mouvement. En laboratoire, ce comportement est net. En début d'expérience, quelque soit le milieu considéré, les larves s'agitent sur le fond du bac dès que celui-ci est manipulé. Ainsi, par exemple, elles grimpent sur les portoirs entre deux changements d'eau. Lors du changement de milieu, toutes les larves s'enfuient des supports et il faut alors les prélever une par une pour pouvoir vider le bac. A la fin de l'expérience, ce comportement de fuite est légèrement moins marqué dans le milieu contrôle 6.6M ; quelques larves restent accrochées aux portoirs lors des manipulations, tandis que la majorité s'enfuit. A l'opposé, dans le milieu acidifié 4.6PMAI, un plus grand nombre reste accroché aux supports malgré les manipulations. Cette diminution évidente de vitalité chez les larves exposées au milieu acidifié se répercute à d'autres niveaux, notamment par une diminution de la prise alimentaire.

Le manque de réaction s'observe également pendant le prélèvement d'hémolymphe. Ainsi, lors des prélèvements à  $J_0$  et à  $J_8$ , les larves exposées au milieu contrôle essayent toujours de s'échapper et s'agitent tant qu'elles ne sont pas fixées sur le support en paraffine avec les épingles. Par contre, pour celles soumises au milieu acidifié, certaines manquent totalement de réaction, au point que le prélèvement d'hémolymphe pourrait être fait sans les attacher.

Ces observations se sont confirmées pour tous les lots de larves exposés au milieu acidifié dans les autres expériences décrites aux chapitres V et VI ; ce comportement étant d'autant plus marqué que les expériences étaient plus longues.

### **IV.3.4. Régulation ionique des larves soumises aux milieux contrôle et acidifié**

Le protocole analytique suivi pour chaque mesure est décrit dans le chapitre II (cf. II.6.).

#### **IV.3.4.1. Régulation ionique au niveau de l'hémolymphe**

##### **IV.3.4.1.1. Concentrations en protéines totales**

Les concentrations individuelles en protéines totales des larves de chaque lot sont données dans le tableau XIX.

Tableau XIX : Résultats des concentrations ( $\mu\text{g}.\mu\text{l}^{-1}$ ) en protéines totales mesurées par individu avant et après exposition aux milieux contrôle (6.6M) et acidifié (4.6PMAI) pendant huit jours (C.v. : *coefficient de variation* ; ■/\* : les lots ayant le même signe mentionné vers la valeur des moyennes ne sont pas significativement différents, tandis que celles annotées de signes différents le sont hautement au seuil de 0.01).

Larve	Témoin ( $J_0$ )	6.6 M ( $J_8$ )	4.6PMAI ( $J_8$ )
1	58.8	37.2	54.0
2	70.3	70.7	90.0
3	34.9	31.5	72.5
4	36.8	50.9	90.4
5	37.4	37.5	120.2
6	39.3	69.8	108.7
Moyenne du lot	46.3 ■	49.6 ■	89.3 *
Ecart-type	14.7	17.2	23.9
C.v.	31.7	34.7	26.7

Au sein d'un même groupe, les différences interindividuelles sont marquées. Elles induisent un coefficient de variation de 32 % pour les témoins, 35 % pour les contrôles et 27 % pour les individus exposés au milieu acidifié. Malgré cette différence entre les larves d'un même lot, la comparaison des moyennes (test t de Student) entre les différents groupes montre que les concentrations moyennes en protéines totales ne sont pas significativement différentes entre le lot témoin ( $J_0$ ) et le lot contrôle (6.6M). A l'opposé, la concentration en protéines totales hémolympatiques est significativement plus élevée pour les larves du lot exposé au milieu acidifié que pour celles des autres lots ( $p < 0.01$ ).

#### IV.3.4.1.2. Concentrations en électrolytes

En ce qui concerne les électrolytes de l'hémolymphe, seuls les principaux cations, sodium, potassium, calcium et magnésium sont dosés (Figure 27 ; Tableau XX). Les anions ne le sont pas car la quantité d'hémolymphe disponible après le prélèvement et la dilution ne le permet pas.

##### \* Concentrations en sodium

Le sodium est le cation le plus représenté quantitativement dans l'hémolymphe des larves de *Dinocras cephalotes*. La concentration moyenne initiale mesurée chez les larves du lot témoin ( $J_0$ ) est de 97  $\text{mmoles.l}^{-1}$ .

Après huit jours d'exposition dans le milieu contrôle 6.6M, une légère augmentation de la concentration en sodium est observée, mais, elle n'est pas significative.

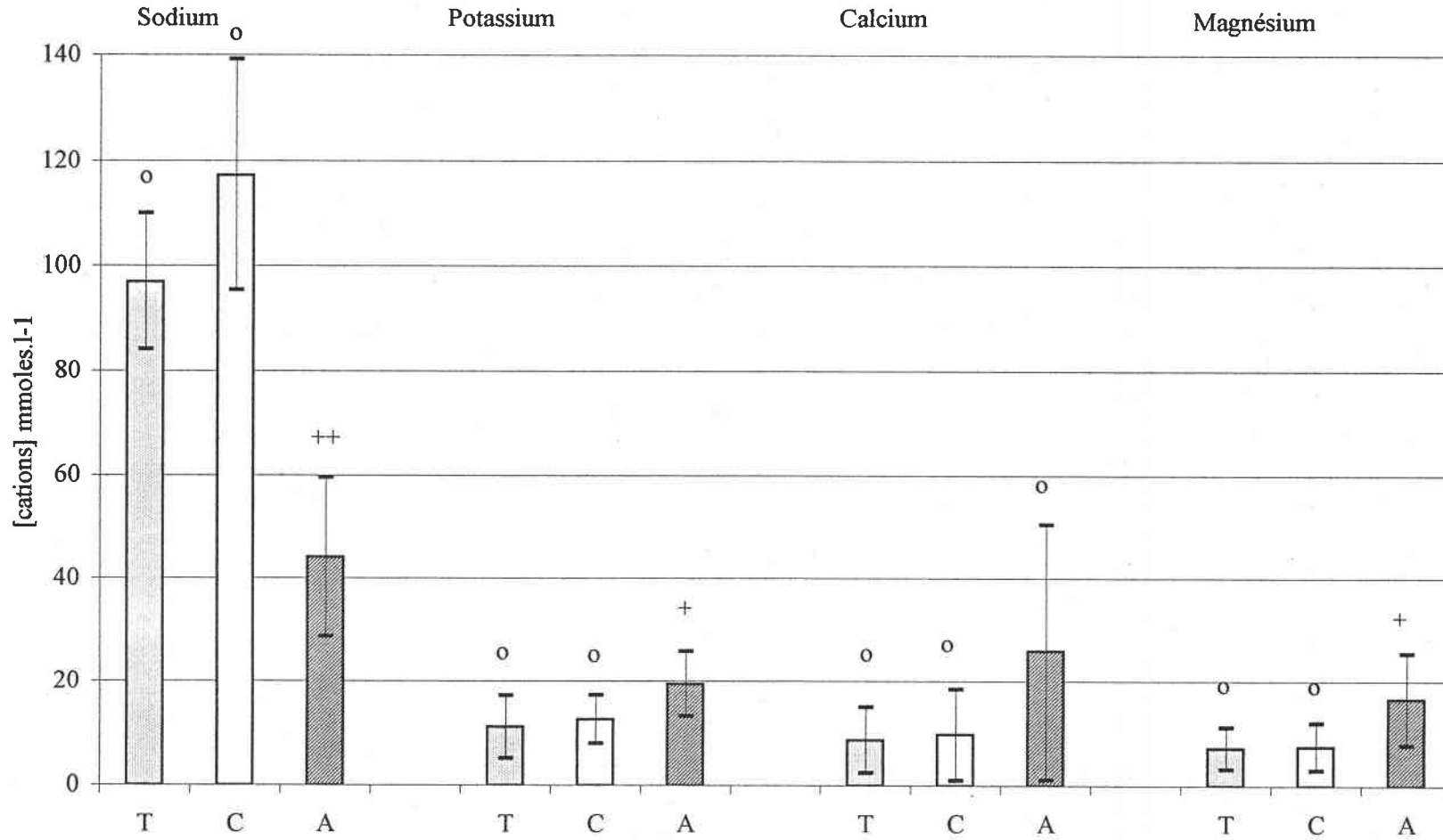


Figure 27 : Concentrations moyennes (mmoles.l-1) en cations dans l'hémolymphe de *D. cephalotes* avant (lot témoin T) et après exposition aux milieux contrôle (C) et acidifié (A) pendant huit jours. Les barres verticales représentent l'écart-type sur la moyenne (n = 7). (o / + : pour chaque cation, les moyennes ayant le même signe ne sont pas significativement différentes, tandis que celles annotées de signes différents le sont, avec ++ : p < 0.01 et + : p < 0.05).

A l'inverse, la concentration en sodium diminue très significativement ( $p < 0.01$ ) dans l'hémolymphe des larves exposées au milieu acidifié. Elle atteint, après huit jours, la valeur moyenne de 44 mmol.L<sup>-1</sup>, correspondant à une diminution de 55 % par rapport à la valeur initiale.

\* Concentrations en potassium

Le potassium est présent en quantité 10 fois moins importante que le sodium dans l'hémolymphe. En effet, la concentration moyenne de cet ion mesurée dans le lot témoin est de 11 mmol.L<sup>-1</sup>. Cependant, à la différence du sodium, montrant une variation interindividuelle inférieure à 20 % pour les lots témoin et contrôle, la concentration en potassium fluctue plus (Coefficient de variation > 30 %) entre les différentes larves.

Huit jours d'exposition dans le milieu contrôle n'apportent aucune variation significative dans les teneurs en potassium par rapport à celles déterminées à J<sub>0</sub>.

Des changements significatifs ( $p < 0.05$ ) apparaissent dans la concentration en potassium hémolympatique des individus exposés pendant huit jours à un milieu acidifié. Une augmentation d'un facteur de 1.75 par rapport aux concentrations initiales est mesurée ; la concentration moyenne étant de 19 mmol.L<sup>-1</sup>.

Tableau XX : Coefficients de variation et rapports des concentrations moyennes en cations mesurées dans l'hémolymphe des larves témoins (T) et des larves exposées pendant huit jours aux milieux contrôle (C) et acidifié (A). Test t de Student ; ns : non significatif ; \* :  $p < 0.05$ , \*\* :  $p < 0.01$

Cations dans l'hémolymphe	Milieu d'exposition	Coefficient de variation %	Test statistique (test t)			Rapport des concentrations A/T
			T - C	T - A	C - A	
Sodium	Témoin	13	ns	**	**	x 0.45
	Contrôle	19				
	Acidifié	35				
Potassium	Témoin	54	ns	*	*	x 1.76
	Contrôle	37				
	Acidifié	32				
Calcium	Témoin	72	ns	ns	ns	x 2.96
	Contrôle	90				
	Acidifié	96				
Magnésium	Témoin	56	ns	*	*	x 2.33
	Contrôle	61				
	Acidifié	53				

#### \* Concentrations en calcium

La concentration en calcium initialement présente dans l'hémolymphe de *Dinocras cephalotes* est inférieure à 10 mmol.l<sup>-1</sup>. Le coefficient de variation de 72 % calculé pour le lot de larves témoin traduit une grande fluctuation de la teneur en calcium entre les individus.

Huit jours d'exposition dans le milieu contrôle n'entraînent pas de variations significatives dans la concentration de cet élément par rapport à celle mesurée à J<sub>0</sub>. Par contre, les variations interindividuelles mesurées pour ce lot atteignent 90 %.

Lorsque les larves sont exposées pendant huit jours au milieu acidifié, la concentration moyenne en calcium augmente d'un facteur 3. Toutefois, la forte variation interindividuelle rend cette différence non significative par rapport aux lots témoin et contrôle.

#### \* Concentrations en magnésium

De tous les cations analysés, le magnésium est celui présent en plus faible quantité dans l'hémolymphe. Sa concentration moyenne initiale est de 7 mmol.l<sup>-1</sup>. Les variations moyennes pour cet élément entre les larves d'un même lot sont importantes, dépassant 50 %.

Aucune différence significative n'est observée entre les individus témoins et contrôles, tandis que la concentration en magnésium des larves exposées au milieu acidifié augmente significativement ( $p < 0.05$ ). Proportionnellement, le magnésium montre un fort facteur d'augmentation, puisque les concentrations mesurées dans l'hémolymphe des larves exposées pendant huit jours au milieu acidifié sont en moyenne plus de 2 fois supérieures à celles du lot témoin.

### **IV.3.4.2. Régulation ionique au niveau des concentrations en électrolytes dans l'organisme entier**

Les résultats des dosages des cations, sodium, potassium, calcium et magnésium peuvent être exprimés par rapport au poids frais (PF, Figure 28) ou au poids sec (PS, Figure 29) de l'organisme. Selon l'unité utilisée ( $\mu\text{moles.g}^{-1}$  PF ou  $\mu\text{moles.g}^{-1}$  PS), les résultats statistiques peuvent varier (Tableau XXI et XXII). Toutefois, les rapports entre les concentrations des 4 cations mesurés dans l'organisme entier sont du même ordre.

#### \* Concentrations en sodium

La comparaison des concentrations en sodium dans l'organisme exprimées par rapport au poids frais ou sec ne met pas en évidence de différence significative entre les larves du lot témoin (J<sub>0</sub>) et celles du lot contrôle après 8 jours (6.6M). Les larves exposées au milieu acidifié pendant huit jours



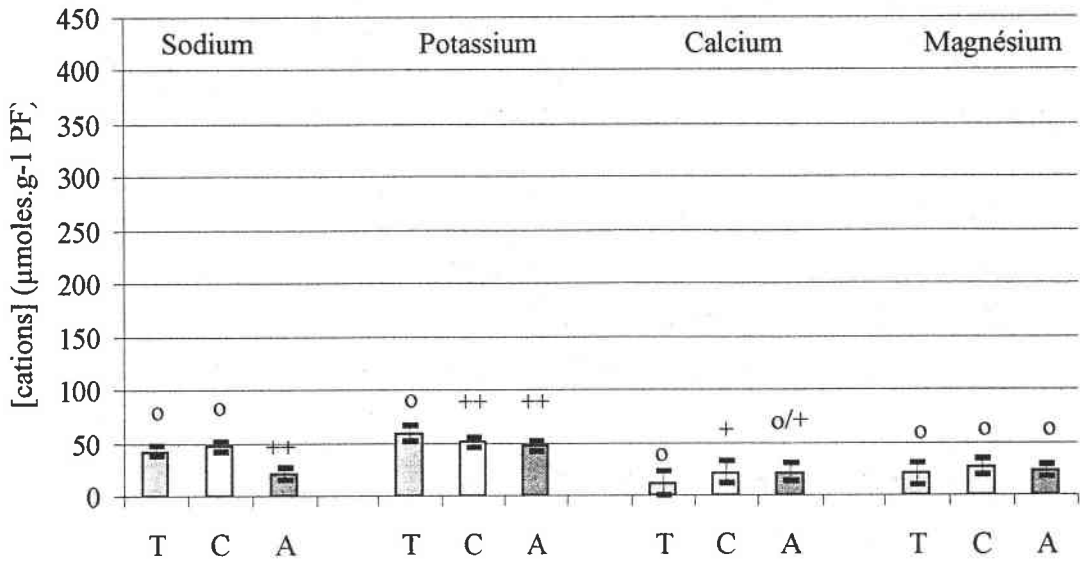


Figure 28 : Concentrations moyennes en cations ( $\mu\text{moles.g}^{-1}$  PF (poids frais)) dans l'organisme des larves témoins (T) et des larves exposées aux milieux contrôle (C) et acidifié (A) pendant huit jours. Les barres verticales représentent l'écart-type sur la moyenne des mesures (pour chaque élément o/+ : les moyennes ayant le même signe ne sont pas significativement différentes ; celles annotées de signes différents le sont avec : ++ :  $p < 0.01$  et + :  $p < 0.05$ ).

Tableau XXI : Coefficients de variation et rapports des concentrations en cations ( $\mu\text{moles.g}^{-1}$  PF (poids frais)) déterminées dans l'organisme des larves témoins (T) et des larves exposées pendant huit jours aux milieux contrôle (C) et acidifié (A). Test t de Student ; ns : non significatif ; \* :  $p < 0.05$  ; \*\* :  $p < 0.01$ ).

Cations dans l'organisme	Milieu d'exposition	Coefficient de variation %	Résultats des tests statistiques			Rapport A/T
			T-C	T-A	C-A	
Sodium	Témoin	11				x 0.48
	Contrôle	11	ns	**	**	
	Acidifié	28				
Potassium	Témoin	12				x 0.80
	Contrôle	9	**	**	ns	
	Acidifié	10				
Calcium	Témoin	97				x 1.86
	Contrôle	49	*	ns	ns	
	Acidifié	40				
Magnésium	Témoin	53				x 1.15
	Contrôle	29	ns	ns	ns	
	Acidifié	22				

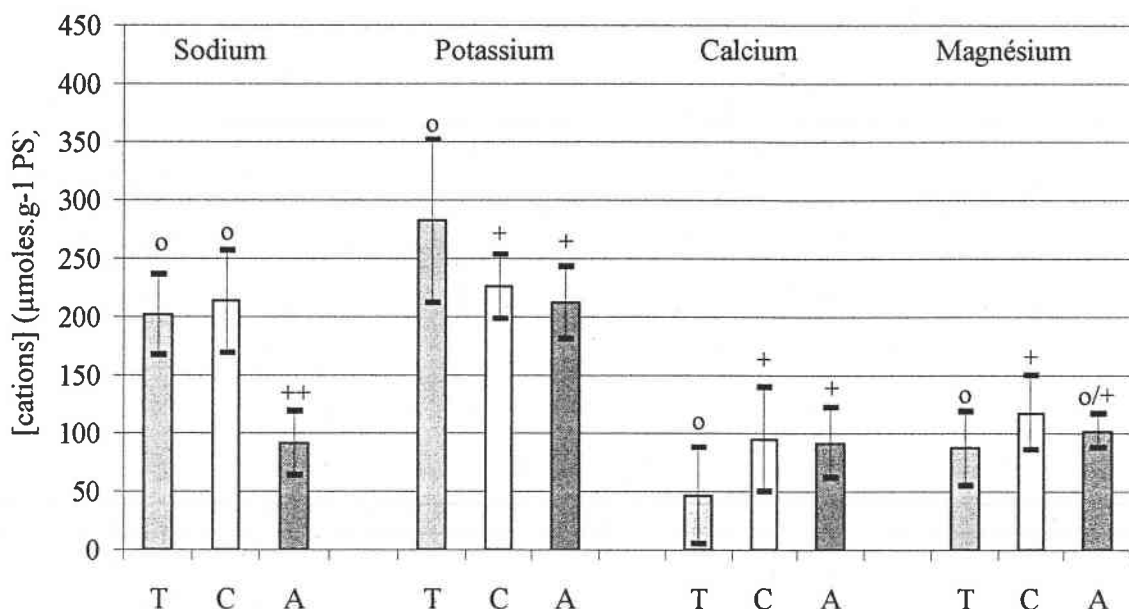


Figure 29 : Concentrations moyennes en cations ( $\mu\text{moles.g}^{-1}$  PS (poids sec)) dans l'organisme des larves témoins (T) et des larves exposées aux milieux contrôle (C) et acidifié (A) pendant huit jours. Les barres verticales représentent l'écart-type sur la moyenne des mesures (pour chaque élément o/+ : les moyennes ayant le même signe ne sont pas significativement différentes ; celles annotées de signes différents le sont avec : ++ :  $p < 0.01$  et + :  $p < 0.05$ ).

Tableau XXII : Coefficients de variation et rapports des concentrations en cations ( $\mu\text{moles.g}^{-1}$  PS (poids sec)) déterminées dans l'organisme des larves témoins (T) et des larves exposées pendant huit jours aux milieux contrôle (C) et acidifié (A). Test t de Student ; ns : non significatif ; \* :  $p < 0.05$  ; \*\* :  $p < 0.01$ ).

Cations dans l'organisme	Milieu d'exposition	Coefficient de variation %	Résultats des tests statistiques			Rapport A/T
			T-C	T-A	C-A	
Sodium	Témoin	17				x 0.45
	Contrôle	21	ns	**	**	
	Acidifié	30				
Potassium	Témoin	25				x 0.75
	Contrôle	13	*	*	ns	
	Acidifié	15				
Calcium	Témoin	89				x 1.98
	Contrôle	48	*	*	ns	
	Acidifié	33				
Magnésium	Témoin	37				x 1.18
	Contrôle	27	*	ns	ns	
	Acidifié	14				

ont une concentration en sodium dans l'organisme réduite de 50 % par rapport aux concentrations moyennes mesurées dans l'organisme des larves du lot témoin et contrôle. Cette baisse est hautement significative au seuil de 0.01.

#### \* Concentrations en potassium

Le potassium est présent en quantité importante dans l'organisme des larves témoins de *Dinocras cephalotes* (58  $\mu\text{moles.g}^{-1}$  PF, soit 280  $\mu\text{moles.g}^{-1}$  PS). Une exposition dans le milieu contrôle pendant 8 jours provoque une diminution hautement significative de ces concentrations par rapport au lot témoin qu'elles soient exprimées par rapport au poids frais ou au poids sec. L'exposition au milieu acidifié pendant la même durée entraîne également une baisse hautement significative dans les teneurs en potassium de l'organisme par rapport au lot témoin. Cependant, les concentrations moyennes obtenues pour les larves du lot exposé au milieu acidifié bien que plus faibles que celles des lots contrôle et témoin ne sont pas significativement différentes.

#### \* Concentrations en calcium

La concentration en calcium initialement très faible (11  $\mu\text{moles.g}^{-1}$  PF, soit 45  $\mu\text{moles.g}^{-1}$  PS) augmente dans l'organisme des larves exposées à un milieu contrôle ou acidifié ; les concentrations moyennes atteintes n'étant toutefois pas significativement différentes entre ces deux lots, du fait du coefficient de variation élevé.

#### \* Concentrations en magnésium

Les concentrations en magnésium mesurées dans les larves de *Dinocras cephalotes* du lot témoin, et dans celles exposées aux deux milieux contrôle et acidifié ne diffèrent pas lorsqu'elles sont exprimées par rapport au poids frais.

A l'inverse, ramenées au poids sec, les concentrations moyennes en magnésium augmentent significativement ( $p < 0.05$ ) dans le lot des larves exposées au milieu contrôle par rapport à celles des larves du lot témoin, alors que celles des larves du lot exposé au milieu acidifié ne varient pas. Pour cet élément, les différences interindividuelles sont très élevées.

Alors que le sodium est le cation majeur mesuré dans l'hémolymphe des Plécoptères, le potassium est l'élément le plus abondant dans l'organisme en entier. Le calcium et le magnésium, dont les concentrations dans les deux compartiments extra- et intra- cellulaires sont faibles, montrent de fortes variations interindividuelles.

#### IV.3.4.3. Discussion

Des larves de *Dinocras cephalotes* exposées à un milieu acidifié, peu minéralisé et enrichi en aluminium (4.6PMAI) peuvent y survivre (environ 58 % du lot) pendant huit jours. De grandes modifications se produisent dans l'équilibre osmotique du milieu intérieur des larves qui survivent ; elles sont évaluées pour les quatre cations considérés dans cette étude. Dans l'hémolymphe, les concentrations en sodium diminuent très significativement (plus de 50 %) par rapport aux concentrations initiales tandis que les concentrations en potassium et en magnésium augmentent de façon significative. Pour le calcium, les variations interindividuelles trop importantes ne permettent pas d'établir la significativité d'une tendance à l'augmentation. Dans l'organisme, les concentrations en sodium et en potassium des larves exposées au milieu acidifié diminuent significativement par rapport aux concentrations initiales tandis que celles en calcium et en magnésium augmentent malgré des variations interindividuelles élevées qui ne permettent pas de conclure pour la significativité.

Les comparaisons des concentrations relatives des quatre cations dans le compartiment extra- et intra-cellulaires des larves du lot témoin mettent en évidence plusieurs faits.

Dans l'hémolymphe, le sodium est le cation qui prédomine. Les concentrations des trois autres cations mesurées dans le compartiment extra-cellulaire sont environ dix fois moins importantes. Ces résultats correspondent à ceux donnés par Sutcliffe pour *Dinocras cephalotes* (1962).

Dans l'organisme, le potassium est le cation le plus représenté, apparaissant ainsi essentiellement intra-cellulaire. La concentration en sodium est également élevée tandis que celles en calcium et en magnésium le sont moins.

Ces deux derniers éléments, calcium et magnésium, sont faiblement représentés dans l'insecte, que ce soit au niveau extra- ou intra-cellulaire par rapport aux teneurs en sodium et potassium. De plus, il existe de très fortes variations interindividuelles rendant impossible toutes comparaisons et interprétations des résultats obtenus entre les lots d'individus témoins et ceux exposés aux milieux contrôle et acidifié pendant huit jours.

Aucune différence n'est établie dans la concentration en calcium et en magnésium mesurée pour les larves des lots exposés aux milieux contrôle et acidifié. Ainsi, ces deux éléments ne semblent pas répondre positivement à l'objectif de cette expérience qui consiste, entre autres, à déterminer des critères physiologiques pouvant être utilisés comme indicateurs de stress spécifiques à une exposition en milieu acide.

Les concentrations en potassium mesurées dans l'hémolymphe des larves du lot témoin présentent également de fortes variations, probablement dues à sa faible concentration dans ce

compartiment. A l'inverse, dans l'organisme entier, les variations interindividuelles observées sont plus faibles. Peu de travaux ont été réalisés sur les concentrations en potassium dans l'organisme et dans l'hémolymphe des insectes avant et après une exposition en milieu acidifié. Dans nos conditions expérimentales (pH : 4.6, minéralisation : 25 mg.l<sup>-1</sup>, [Al]<sub>tot</sub> : 0.50 µg.l<sup>-1</sup>), les larves de *Dinocras cephalotes* présentent une augmentation du potassium dans le compartiment extra-cellulaire accompagnée d'une diminution de la teneur potassique dans l'organisme. Rockwood et Coler (1991) ont montré que pour *Libellula julia* (Odonates), les concentrations en potassium dans l'organisme entier et dans l'hémolymphe ne sont pas significativement affectées pendant 96 heures d'exposition aux différents pH et concentrations d'aluminium. Ils signalent toutefois une augmentation, mais celle-ci n'est pas significative. A l'inverse, les résultats de Lechleitner *et al.* (1985) ne mettent en évidence aucun changement significatif dans la concentration en potassium dans l'organisme entier du Plécoptère *Pteronarcys proteus* suite à une exposition de 5 jours à pH 3.0. De même, une exposition de 96 heures à pH 3.5 n'entraîne aucun changement significatif dans le contenu en potassium de l'organisme de l'Ephémère *Stenomena femoratum* (Rowe *et al.*, 1988).

Trois hypothèses peuvent être formulées en ce qui concerne l'origine de l'augmentation de la teneur en potassium dans l'hémolymphe de *D. cephalotes* suite à l'exposition au milieu acidifié :

- une entrée de potassium à partir du milieu extérieur,
- un passage du potassium du compartiment intracellulaire vers le compartiment extracellulaire,
- une baisse du volume hémolympatique.

Etant donné que la teneur totale en potassium diminue au niveau de l'organisme, la première hypothèse n'est pas retenue. Les deux autres sont complémentaires pour illustrer une même interprétation. Le potassium est le cation intracellulaire principal balançant les effets du sodium extracellulaire (Gonzalez et Dunson, 1989). Ainsi, une perte de sodium à partir de l'hémolymphe vers le milieu extérieur génère un gradient osmotique entre les compartiments extra- et intracellulaires de l'insecte. Le passage du potassium du compartiment intra-cellulaire vers l'hémolymphe permet de minimiser ce gradient. Ce même phénomène est également rapporté pour le Bivalve *Anodonta anatina* dont la concentration en potassium hémolympatique augmente suite au passage des ions provenant du compartiment intracellulaire (Pynnönen, 1994). De plus, la diminution du volume du fluide extracellulaire accentue cette diminution puisque cela entraîne une augmentation dans toutes les concentrations des solutés.

Ce phénomène est également observé pour les concentrations en protéines totales. En effet, la teneur en protéines totales dans l'hémolymphe augmentent très significativement chez les individus ayant été exposés au milieu acidifié par rapport à celles mesurées dans les individus des lots témoins (78 %) et contrôle (66 %). Celle-ci peut être expliquée par deux hypothèses pouvant être combinées dans l'organisme, soit la concentration en protéines circulantes augmente, soit le volume

d'hémolymphe diminue avec une même quantité de protéines augmentant ainsi leurs concentrations. Une diminution de l'hémolymphe ayant été mise en évidence par l'étude histologique cf. § IV.III.7.2.) l'augmentation de ces teneurs est plutôt due à ce phénomène qu'à une libération à partir du compartiment intracellulaire. Toutefois, seule une mesure de la concentration en protéines totales dans l'organisme permettrait de conclure s'il ne se produit aucun passage de ces molécules du compartiment intra- vers le compartiment extracellulaire.

Cette interprétation sur les modifications de concentration en potassium et en protéines est en accord avec les travaux de Florkin *et al.* (1974), Schoffeniels (1960) et Edwards (1982), qui montrent que les insectes sont capables de réguler des variations dans leur pression osmotique interne. Ces mécanismes de compensation de la pression osmotique ne se déclenchent probablement que lorsqu'une quantité suffisante de sodium a été perdue vers le milieu extérieur, ce qui explique que certaines études ne montrent pas de variation ionique importante de ces composés malgré une perte de sodium.

L'hypothèse expliquant les modifications dans les concentrations en potassium et en protéines se confirme par l'expérience réalisée au laboratoire qui met en évidence qu'une quantité importante de sodium issue de l'hémolymphe et de l'organisme de *D. cephalotes* est perdue vers le milieu extérieur. En effet, après huit jours d'exposition à un milieu acidifié, les concentrations en sodium mesurées pour ces larves sont très significativement plus faibles que celles mesurées pour les larves témoins et contrôles.

De nombreuses études, dont certaines seront citées ultérieurement, ont suivi cet élément soit dans l'hémolymphe ou dans le sang, soit dans l'organisme entier d'individus appartenant à des ordres variés. Toutefois, même si les conditions d'exposition varient d'une étude à l'autre avec quelquefois, des descriptions de milieu assez succinctes (surtout pour la minéralisation) et des paramètres dont les niveaux testés sont un peu extrêmes, un point reste commun à toutes ces études : la concentration en sodium au niveau sanguin ou hémolympatique ou au niveau corporel diminue significativement pour les individus exposés au milieu acidifié.

La plupart des études ont été réalisées en laboratoire sur des poissons acido-sensibles, surtout des Salmonidés. Elles sont basées sur des expositions d'individus pendant des durées limitées dans des eaux ayant un pH acide, de fortes concentrations en aluminium et dont la minéralisation est surtout caractérisée par une faible concentration en calcium. Les résultats obtenus pour les teneurs en sodium sanguin et corporel montrent une diminution très significative (Dalziel *et al.*, 1986 ; Booth *et al.*, 1988 ; Wood *et al.*, 1988). D'autres auteurs ont réalisé ce type d'études avec des amphibiens, mettant également en évidence des diminutions dans les concentrations en sodium (McDonald *et al.*, 1984). Freda et Dunson (1984) concluent même que les amphibiens en terme de balance sodique répondent plus fortement que les poissons. Les écrevisses présentent également ce même type de réponse ; une perte de sodium est démontrée par les études de Morgan et Mc Mahon (1982), ainsi que Jensen et Malte (1990). Chez les Mollusques Bivalves Unionidés (Malley *et al.*, 1988 ; Pynnönen, 1991 ;

Mäkela et Oikari, 1992) et les Gastéropodes (Dewith *et al.*, 1989), l'exposition à un milieu acidifié provoque une chute des concentrations en sodium.

Chez les insectes aquatiques, ce test a été réalisé pour des ordres variés. Les mesures sont réalisées le plus souvent dans l'organisme en entier après minéralisation (Lechleitner *et al.*, 1985 ; Hermann, 1987 ; Rowe *et al.*, 1989) et, plus rarement, dans l'hémolymphe (Rockwood et Coler, 1991). Une régulation ionique perturbée est observée pour les larves de *Libellula julia* (Odonates) exposées durant 96 h à un milieu acidifié, avec des baisses de 32 % dans l'hémolymphe et de 61 % dans l'organisme (Rockwood et Coler, 1991). Cependant par rapport au volume, la quantité de sodium perdu par l'hémolymphe est supérieure à celle perdue par l'organisme entier. Des Ephémères *Ephemera danica* et *Heptagenia sulphurea* exposées à la combinaison de pH (4 et 4.8) et Al (0.5 et 2 mg.l<sup>-1</sup>) montrent après 14 jours une baisse du sodium corporel (Hermann, 1987). Quand les Ephémères *Stenomema femoratum* sont exposées à un pH 3.5, il y a une perte de chlorures et de sodium (Rowe *et al.*, 1988). A l'opposé, d'autres insectes ne présentent pas de perte de sodium (Berrill *et al.*, 1987 ; Vangenechten et VanderBorgh, 1980).

D'une manière générale, la perte de sodium mesurée pour *Dinocras cephalotes* et les autres insectes est provoquée par l'influence des éléments physico-chimiques composant le milieu extérieur dans lequel les individus sont exposés. Ainsi, les fortes concentrations en protons et en aluminium combinées à la faible minéralisation des eaux sont à l'origine de la fuite des ions. Toutefois, le détail des mécanismes physiologiques impliqués dans ce dérèglement n'est pas décrit dans cette partie, mais le sera dans la discussion de la partie V ; l'objectif de cette dernière étant de mettre en évidence les effets respectifs de chacun des paramètres caractérisant le milieu acidifié, ainsi que de leurs différentes combinaisons pour dégager leur influence relative dans les perturbations observées.

Des quatre éléments mesurés, le sodium est le plus fiable et le plus reproductible des critères à suivre pour estimer le stress subi par les larves de *Dinocras cephalotes* exposées à un milieu acidifié, et ce pour les raisons suivantes :

- présence en grande quantité dans l'organisme et dans l'hémolymphe,
- faible variation interindividuelle (surtout à J<sub>0</sub>),
- diminution hautement significative pour les larves exposées au milieu acidifié,
- pas de différence constatée entre les lots exposés aux milieux contrôle et témoin, ce qui permet de conclure que les variations observées sont provoquées par le milieu acidifié.

En ce qui concerne le compartiment à étudier, le sodium est plus facile à estimer au niveau de l'hémolymphe. Le protocole à suivre pour le dosage est simple et demande moins de manipulation de l'échantillon que celui employé pour le dosage de cet élément dans l'organisme en entier. De plus, le biais pouvant être induit par les ions adsorbés par la cuticule de l'insecte est évité.

La perturbation de l'équilibre ionique doit être considérée très sérieusement. En effet, les ions sont pour la plupart impliqués dans des fonctions physiologiques. Ces dernières, comme par exemple les échanges membranaires, ainsi que les fonctions nerveuses et musculaires, sont extrêmement sensibles aux changements dans la concentration osmotique totale et dans la composition relative des fluides corporels. Une régulation ionique détériorée induisant des balances ioniques anormales dans le tissu corporel conduit à des stress sévères au niveau des fonctions vitales avec des effets tels qu'une détérioration des capacités de motilité et de coordination, des désordres nerveux et des anomalies comportementales.

#### IV.3.5. Conséquences de l'exposition de *Dinocras cephalotes* à un milieu acidifié sur le pourcentage de poids sec par rapport au poids frais

##### IV.3.5.1. Résultats

Les mesures de poids frais et de poids sec d'un même organisme permettent de calculer le pourcentage de poids sec par rapport au poids frais qui est indicatif de la proportion d'eau et de la quantité de réserves contenue dans l'organisme considéré.

Ce paramètre  $[(PS / PF) * 100]$  est déterminé pour chaque larve témoin et chaque larve exposée aux milieux contrôle et acidifié pendant huit jours, à partir des mesures de poids frais et de poids sec. Pour chaque lot, une moyenne est établie (Tableau XXIII).

Tableau XXIII : Pourcentage moyen de poids sec par rapport au poids frais pour des lots de larves avant (témoin) et après exposition de huit jours aux milieux contrôle et acidifié (C.V. : Coefficient de variation ; n : nombre de larves).

Lot	(Poids sec / poids frais) * 100		C.V. %	n	Tests statistiques		
	Moyenne	Ecart - type			T - C	T - A	C - A
Témoin (T)	20.5	4.5	28	25			
Contrôle (C)	20.7	4.7	23	14	n.s.	n.s.	n.s.
Acidifié (A)	17.1	6.3	36	14			

Aucune différence significative (Test t ;  $p < 0.05$ ) n'est établie entre les valeurs moyennes obtenues pour les larves du lot témoin et celles du lot contrôle.

Pour le lot acidifié, le pourcentage moyen de poids sec par rapport au poids frais est inférieur à ceux établis pour les lots témoin et contrôle. Cette diminution n'est toutefois pas significative au seuil de 0.05. D'autre part, le coefficient de variation plus élevé de ce lot traduit une différence interindividuelle plus élevée.



#### IV.3.5.2. Discussion

Après 8 jours d'exposition dans le milieu acidifié, la différence interindividuelle plus élevée mise en évidence par le coefficient de variation, peut s'expliquer par une résistance individuelle variable vis-à-vis d'un tel environnement. En effet, pendant l'expérience 42 % des individus sont morts et, parmi les survivants à 8 jours, certains sont en situation de pré-létalité, situation qu'il convient de prendre en compte en complément des données purement statistiques.

Même si la différence n'est pas significative (Test t ;  $p < 0.05$ ), le pourcentage de poids sec par rapport au poids frais diminue pour le lot de larves exposé au milieu acide. Deux hypothèses peuvent expliquer cette baisse, ainsi que celle du poids sec :

- une entrée d'eau vers le compartiment hémolympatique,
- une diminution des réserves de l'organisme.

Or, au cours de l'expérience, le volume d'hémolymphe tend à diminuer. Il est, en effet, beaucoup plus difficile d'en prélever suffisamment pour effectuer les analyses. L'augmentation des facteurs de dilution pour les échantillons d'hémolymphe des larves exposées au milieu acidifié met aussi en évidence la réduction de la quantité d'hémolymphe, ainsi que le changement de sa viscosité. L'étude histologique (cf. § IV.4.3.7.2.) permettra de visualiser l'hémolymphe contenue dans l'organisme au niveau des différentes coupes réalisées et ainsi, d'apprécier la quantité présente pour confirmer ou non l'éventuelle diminution du volume hémolympatique.

Il semble donc que le volume de liquide extra-cellulaire soit moins élevé chez les organismes ayant été exposés 8 jours à un milieu acidifié. De ce fait, après 8 jours d'exposition, une entrée d'eau ne semble pas s'être produite. La diminution du volume d'hémolymphe chez des individus exposés à un milieu acidifié est rapportée pour d'autres organismes. C'est le cas notamment pour les Odonates, *Libellula julia* (Rockwood et Coler, 1991) et les Salmonidés, *Salmo gairdneri* (Milligan et Wood, 1982).

La réduction du poids sec serait donc plutôt provoquée par l'utilisation des réserves de l'organisme, d'autant plus que la plupart des larves de ce lot montre une baisse dans leur prise alimentaire. Ceci contribue à expliquer la baisse de vitalité et l'affaiblissement général observés chez les larves de *Dinocras cephalotes* exposées au milieu acidifié.

La baisse du pourcentage de poids sec par rapport au poids frais mesurée à  $J_8$  indique également qu'il n'y a vraisemblablement pas de perte d'eau du corps de l'insecte vers le milieu extérieur. Le changement dans la quantité et la viscosité de l'hémolymphe pourrait donc être provoquée par un passage du fluide du compartiment extracellulaire (hémolymphe) vers le compartiment intracellulaire. Une telle redistribution de l'eau est rapportée pour des poissons exposés à des eaux

acidifiées ; leur contenu total en eau étant maintenu pendant les expériences (McDonald et Wood, 1981 ; Milligan et Wood, 1982 ; Lee *et al.*, 1983). Ce changement dans la répartition du fluide peut être une conséquence des diminutions mesurées dans les concentrations ioniques en sodium (et chlorures), qui sont les contributeurs majeurs de la pression osmotique. Chez les poissons, ces pertes génèrent des gradients osmotiques et ioniques favorisant le mouvement d'eau vers le compartiment intracellulaire (du sang vers les différents organes) et le mouvement d'électrolytes dans la direction opposée (des différents organes vers le sang) (McDonald et Wood, 1981 ; Milligan et Wood, 1982).

### **IV.3.6. Conséquences de l'exposition de *Dinocras cephalotes* à un milieu acidifié sur la respiration**

#### **IV.3.6.1. Résultats**

La consommation en oxygène est mesurée pour les larves du lot témoin, ainsi que pour celles des lots exposés pendant huit jours aux milieux contrôle (composition similaire au milieu d'origine des larves) et acidifié. Afin que la consommation en oxygène soit suffisamment élevée pour pouvoir être détectée par la méthode de respirométrie décrite précédemment (cf. Matériel et méthodes § II.6.7.), les larves sont regroupées par lot de deux pour chaque série de mesure. La moyenne et l'écart type sont calculés à partir des résultats obtenus pour l'ensemble des groupes exposés à un même milieu (Tableau XXIV). Le Test t de Student permet d'évaluer si des différences significatives existent dans la consommation moyenne en oxygène des larves du lot témoin, et celles des lots exposés au milieu contrôle et acidifié.

Les résultats de respirométrie du lot témoin indiquent la consommation en oxygène des larves de Plécoptères à  $J_0$ , dont la moyenne initiale est de  $0.3361 \text{ mg.O}_2.\text{g}^{-1}$  de poids frais.

Après une exposition de huit jours dans le milieu contrôle, la consommation moyenne en oxygène ( $0.4026 \text{ mg O}_2.\text{g}^{-1} \text{ PF}$ ) du lot considéré est significativement plus élevée ( $p < 0.05$ ) que celle du groupe de larves témoins.

A l'inverse, le taux de respiration des larves exposées pendant une semaine au milieu acidifié ( $0.3036 \text{ mg O}_2.\text{g}^{-1} \text{ PF}$ ) est significativement plus faible ( $p < 0.05$ ) que celui mesuré pour les larves du lot contrôle

Comparée à celle du témoin, la consommation en oxygène des larves exposées au milieu acidifié est réduite (10 %). Cependant à cause de la variation interindividuelle élevée, la différence n'est pas statistiquement significative.

Tableau XXIV : Consommation en oxygène exprimée par rapport au poids frais ou au poids sec pour chaque série de larves (S) des lots témoin et exposés aux milieux contrôle et acidifié pendant 8 jours. Chaque série est composée de deux larves dont les mesures de poids frais (PF) et de poids sec (PS) sont réunies en une unique valeur.

S	Poids (g)		Consommation par série		moyenne ± écart-type mg O <sub>2</sub> .g <sup>-1</sup> PF	mg O <sub>2</sub> .g <sup>-1</sup> PS
	PF	PS	mg O <sub>2</sub> .g <sup>-1</sup> PF	mg O <sub>2</sub> .g <sup>-1</sup> PS		
Lot témoin	1	0.4174	0.0954	0.3089	0.3361 ± 0.0372	1.4382 ± 0.3173
	2	0.4097	0.1008	0.3156		
	3	0.3382	0.0785	0.3007		
	4	0.2657	0.0691	0.3258		
	5	0.1720	0.0479	0.3806		
	6	0.1993	0.0369	0.3851		
Lot Contrôle	1	0.5339	0.1233	0.4767	0.4026 ± 0.0631	1.8085 ± 0.1945
	2	0.3820	0.0757	0.3579		
	3	0.3968	0.1123	0.4347		
	4	0.3574	0.0655	0.3193		
	5	0.2580	0.0578	0.4243		
Lot acidifié	1	0.4337	0.0916	0.3588	0.3036 ± 0.0403	1.3630 ± 0.2336
	2	0.5220	0.1269	0.2854		
	3	0.2726	0.0622	0.3053		
	4	0.3435	0.0733	0.2649		

#### IV.3.6.2. Discussion

Selon les espèces d'insectes exposées à des milieux acidifiés deux types de réponses sont observées : soit une augmentation, soit une diminution du taux respiratoire. Ainsi, Rockwood *et al.* (1990) constatent que les larves d'Odonates *Libellula julia* exposées à un milieu ayant une concentration élevée en protons et variable en aluminium (pH : 4.0, [Al] : 0 ; 0.3 ; 3 et 30 mg.l<sup>-1</sup>) consomment moins d'oxygène que les larves du lot témoin. Cette diminution est d'autant plus marquée que la concentration en aluminium est élevée. Une autre espèce d'Odonates, *Somatochlora cingulata* montre la même réponse lorsqu'elle est confrontée à un milieu acidifié (Correa *et al.*, 1985). Les larves du Trichoptère *Limnephilus sp.* présentent également une baisse de leur taux respiratoire lorsqu'elles sont exposées durant 96 heures à pH 4.0 et [Al] : 0 et 0.3 mg.l<sup>-1</sup>. Cette différence avec les individus témoins n'est toutefois pas significative (Correa *et al.*, 1986).

A l'opposé, Herrmann et Andersson (1986) mesurent une augmentation du taux respiratoire de trois espèces d'Ephémères *Heptagenia fuscogrisea*, *Heptagenia sulphurea* et *Ephemera danica* après une exposition de 10 jours à 0.5 et 2.0 mg.l<sup>-1</sup> d'aluminium et à pH 4.0 et 4.8. Selon les auteurs, l'augmentation de la consommation en oxygène permettrait à l'insecte de disposer d'une plus grande quantité d'énergie pour maintenir son équilibre physiologique interne. Toutefois, Kapoor (1979) et Edwards (1982) ont démontré que cette hypothèse ne s'applique pas aux larves du Plécoptère *Paragnetina media*, ni du moustique *Aedes aegypti* exposées à des milieux de salinité extrême. En effet, aucun changement significatif n'est apparu dans la consommation en oxygène de ces larves soumises à des milieux hypo- ou hypertoniques montrant ainsi que la demande d'énergie pour l'osmorégulation est minimale chez ces espèces. Le prélèvement plus actif d'oxygène observé pour certaines espèces d'insectes n'est donc pas destiné à cette fonction. L'augmentation observée pour les larves de *Dinocras cephalotes* du lot contrôle s'accorde avec cette conclusion, d'autant plus qu'à priori, aucune perturbation physiologique n'est observée dans les individus de ce lot. Cette augmentation peut être due à une plus grande activité liée au stress de l'expérience elle-même (exposition au laboratoire, nourriture moins fréquente que *in situ*, confinement dans un petit volume d'eau pour la mesure respirométrique, ...) . Les larves exposées au milieu acidifié subissant un stress plus important devraient donc, a priori, également présenter un taux respiratoire plus élevé compte tenu d'une demande supplémentaire d'énergie. Or, les résultats mesurés pour ce lot montrent que la consommation diminue.

Il est donc probable qu'un phénomène physique limite la pénétration de l'oxygène. Chez les poissons, la capacité de transporter cet élément dans le sang est réduite pendant une exposition à un milieu acidifié (Packer, 1979 ; Waring et Brown, 1995). Cette explication ne s'applique toutefois pas aux insectes pour lesquels le transport d'oxygène se fait directement vers les cellules grâce aux trachées et aux trachéoles. D'autres études réalisées sur des poissons (Muniz et Leivestad, 1980 ; Playle *et al.*,

1989) ont montré que du mucus et/ou des précipités d'aluminium réduisent la surface de la zone spécialisée pour le prélèvement actif d'oxygène. Toutefois, chez les insectes, l'hypothèse de la production et de l'accumulation de mucus sur le tégument ne peut être envisagée puisque les insectes, contrairement aux poissons, sont dépourvus d'une telle fonction. Certaines études confirment cette absence de production muqueuse pour des espèces de Plécoptère, *Pteronarcys dorsata* (Lechleitner *et al.*, 1985) et d'Ephémères *Ecdyonurus venosus* et *Baetis rhodani* (McCahon *et al.*, 1987). Afin d'expliquer la diminution du prélèvement d'oxygène, il reste l'hypothèse de la présence de précipités d'aluminium sur la surface corporelle des individus. De nombreuses études l'ont confirmée. Ainsi, de l'aluminium se trouve associé avec les surfaces respiratoires et osmorégulatrices des poissons et des macroinvertébrés (Neville, 1985 ; Karlsson-Norrgrén *et al.*, 1986 ; Youson et Neville, 1987). Chez les Ephémères *Ecdyonurus venosus* et *Baetis rhodani* exposées à pH 5 et à 350 µg d'aluminium.l<sup>1</sup> pendant 24 h, de l'aluminium a été mis en évidence sur l'exosquelette entier, dans et autour des branchies ainsi que sur la surface extérieure de l'abdomen (McCahon *et al.*, 1987). De tels précipités formés sur les branchies de *Dinocras cephalotes* peuvent expliquer la baisse de consommation en oxygène mesurée car, pour les Plécoptères, les branchies sont le site primordial de la respiration. Elles sont en effet responsables d'environ 80 % de la consommation en oxygène de l'insecte (Kapoor, 1974). Une autre interprétation est envisageable, concernant les mouvements du liquide trachéolaire ; elle sera abordée ultérieurement dans la partie histologique (cf. IV.3.7.4).

### **IV.3.7. Histopathologie des larves de *Dinocras cephalotes***

Après avoir examiné les perturbations de différentes fonctions physiologiques de *Dinocras cephalotes* engendrées par l'exposition à un milieu acidifié, il est apparu intéressant de vérifier au niveau des organes les éventuelles histopathologies causées par ce stress. Ainsi, cet examen permet d'une part de compléter la liste des effets négatifs provoqués par une telle exposition et, d'autre part, d'apporter des explications supplémentaires aux dérèglements physiologiques mis en évidence.

#### **IV.3.7.1. Anatomie de *Dinocras cephalotes***

La dissection d'une larve de *Dinocras cephalotes* est réalisée afin de situer les différents organes les uns par rapport aux autres, et de les localiser dans l'organisme. Cette observation est un préalable nécessaire à l'observation des coupes histologiques. Trois plans d'observation ont été déterminés de la face dorsale à la face ventrale :

- le système circulatoire dorsal,
- le système digestif et le système excréteur dans le plan médian,
- les ganglions cérébroïdes et la chaîne nerveuse ventrale.

Le système trachéen est présent dans tout l'organisme.

\* Le système circulatoire (Figure 30)

Comme chez tous les insectes, l'appareil circulatoire de *Dinocras cephalotes* se réduit à une structure tubulaire dorsale. Il comprend au niveau de l'abdomen une partie contractile, ou coeur, prolongée dans le thorax et la tête par une partie conductrice; l'aorte. Le coeur comprend une série de chambres ou ventriculites. Le diaphragme dorsal est composé de muscles aliformes, insérés sur les ventriculites et la face interne des tergites, et d'une membrane conjonctive.

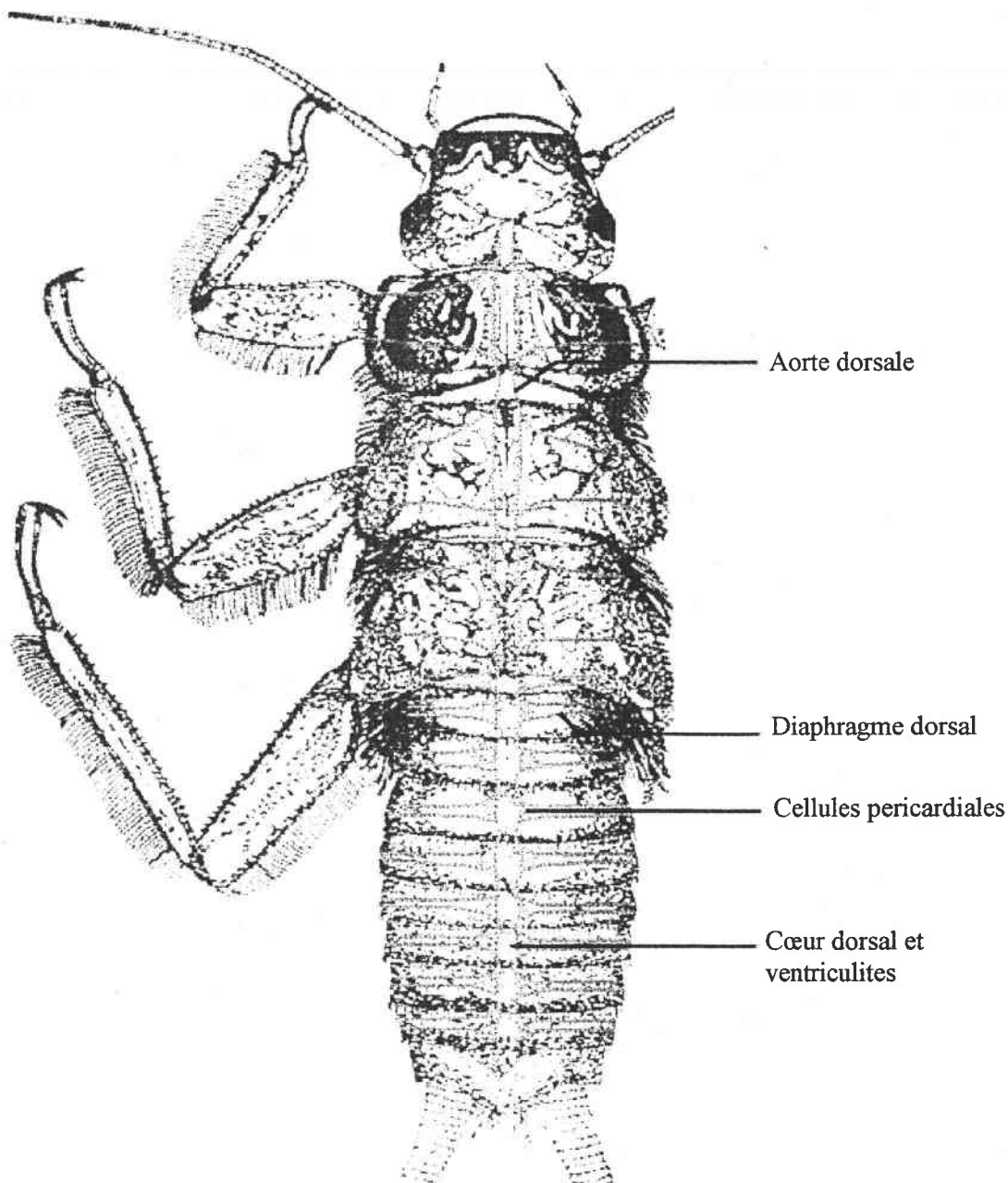


Figure 30 : Schéma du système circulatoire de *Dinocras cephalotes*.

\* Le système digestif et excréteur (Figure 31)

Le tube digestif comporte trois segments : un segment antérieur ou stomodeum, un segment médian ou mésentéron, et un segment postérieur ou proctodeum. Le stomodeum est composé par un pharynx et un oesophage. Huit coecas pyloriques se trouvent dans la portion antérieure du mésentéron, qui se termine au niveau du point d'insertion des tubes de Malpighi. Ces derniers sont des formations tubulaires longues, aveugles, très nombreux (une cinquantaine) et de couleur blanchâtre. Ils sont enchevêtrés dans tout l'abdomen, mais cela n'est pas représenté sur la figure 31 pour clarifier le schéma. Seuls leurs niveaux d'insertion sont localisés. Le proctodeum comprend l'intestin et le rectum.

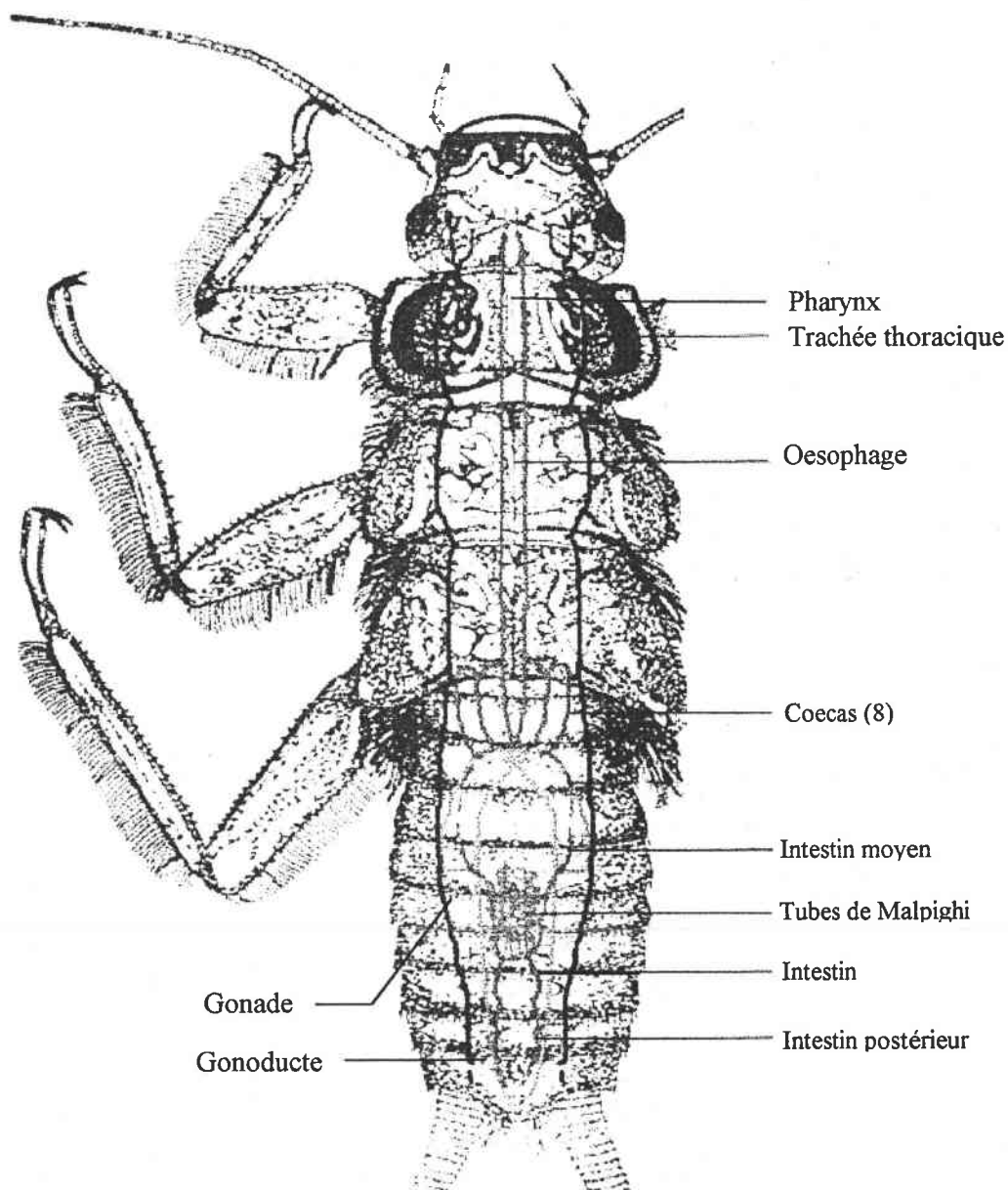


Figure 31 : Schéma des systèmes digestifs et excréteurs de *Dinocras cephalotes*.

\* Le système nerveux (Figure 32)

Le cerveau (ganglion cérébroïde) résulte de la fusion, au dessus de l'oesophage, des ganglions correspondant aux trois premiers métamères céphalisés (proto, deuto et tritocérébron).

Sous l'oesophage, une condensation de 3 paires de ganglions constitue le ganglion sous-oesophagien. Cette masse est réunie aux ganglions cérébroïdes par le collier péri-oesophagien. La chaîne nerveuse comporte trois paires de ganglions thoraciques plus ou moins soudés qui innervent les pattes et les ailes. Ils sont suivis par 11 paires de ganglions abdominaux plus ou moins fusionnés. Comme pour tous les insectes, chez *Dinocras cephalotes*, on observe autant de paires de ganglions nerveux que de segments. Ils sont réunis entre eux par une courte commissure et à ceux des métamères voisins par des connectifs longitudinaux parallèles. Cette disposition est dite en échelle de corde.

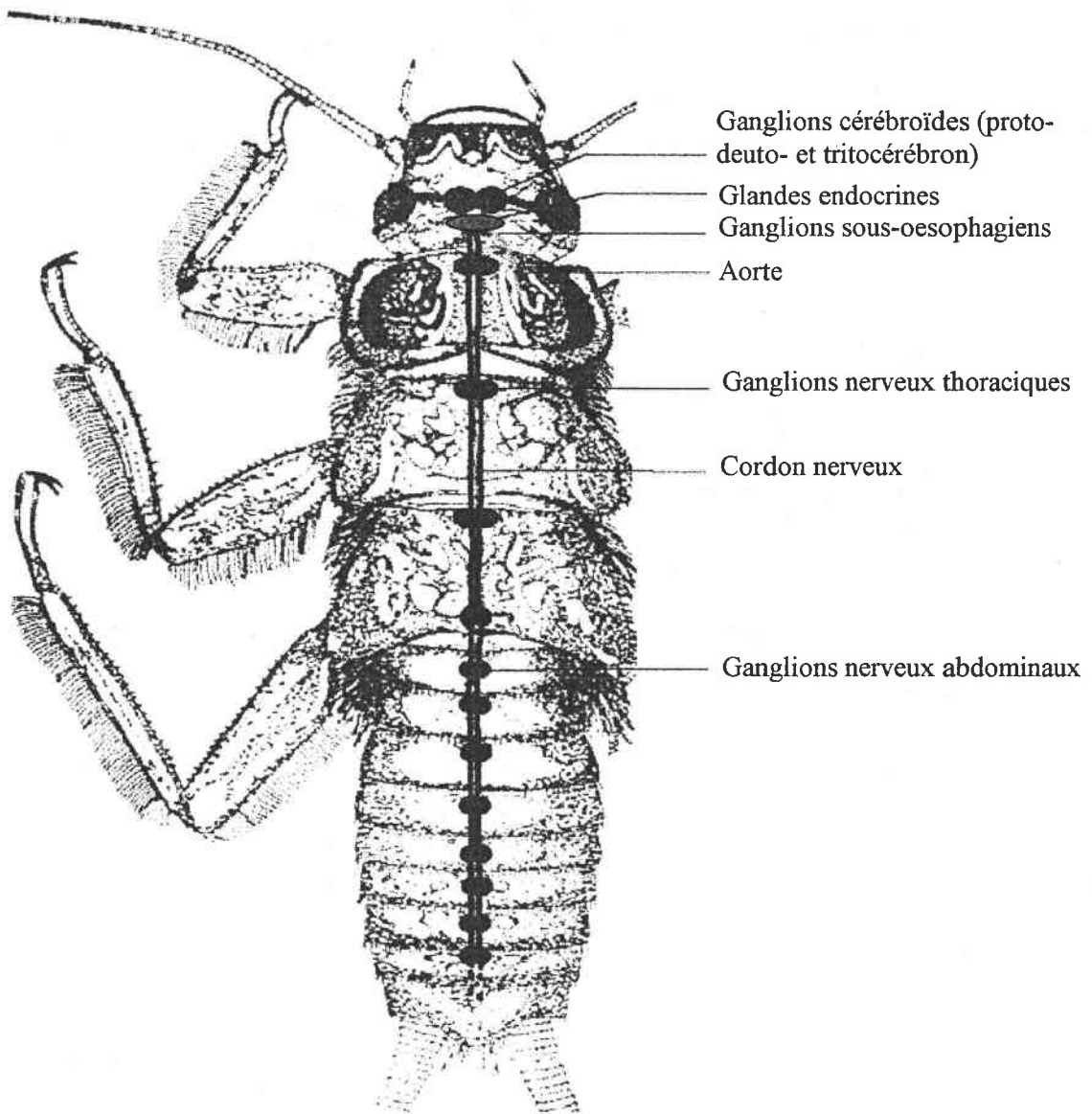


Figure 32 : Schéma du système nerveux de *Dinocras cephalotes*.



### \* Le système trachéen

Le système trachéen est réparti dans tout l'organisme de l'insecte et assure le transport de l'oxygène de l'extrémité branchiale aux organes. Le liquide trachéolaire, par ses mouvements, est le milieu transportant l'oxygène vers les organes. Ce système est schématisé dans son ensemble par la figure 33. Il n'est représenté que partiellement dans la figure 31.

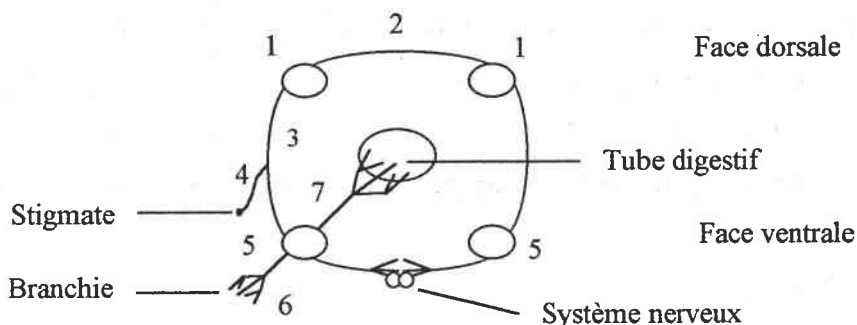


Figure 33 : Représentation schématique du réseau trachéen de *Dinocras cephalotes*. 1, Tronc trachéen principal latéro - dorsal ; 2, Anastomose trachéenne dorsale ; 3 et 4, Tronc stigmatique (St) non fonctionnel (4) sur connectif transverse (3) ; 5, Tronc trachéen principal latéro - ventral ; 6, Branchie ; 7, Trachée viscérale. Exemple de système "Porte" "Trachéen" (6 + 7).

### \* Le système endocrine

Il est composé de deux grands ensembles :

- les cellules neurosécrétrices réparties dans le système nerveux central,
- les glandes endocrines spécialisées (les corps allates, les corps cardiaques et les glandes prothoraciques).

Ces deux ensembles produisent des hormones qui sont généralement relâchées directement ou indirectement, via les organes de stockage, dans l'hémolymphe.

## IV.3.7.2. Effets observés sur l'hémolymphe (Planches I et II)

### IV.3.7.2.1. Résultats

#### \* Lot témoin

L'hémolymphe, répartie dans tout le corps de la larve apparaît sous la forme de coagulum d'aspect granuleux et d'un certain nombre d'hémocytes. Ces derniers sont :

- soit dans le coagulum,
- soit en contact avec les différents organes.

## PLANCHE I

### **Mise en évidence de la diminution du volume d'hémolymphe chez des larves de *Dinocras cephalotes* suite à une exposition de huit jours à un milieu acidifié.**

Photo I.1 : Hémolymphe (flèche) présente au niveau des corps allate et cardiaque d'une larve témoin (grossissement x 250).

Photo I.2 : Hémolymphe (flèche) présente dans l'espace pérित्रachéen d'une larve témoin (grossissement x 160).

Photo I.3 : Hémolymphe (flèche) présente au niveau des corps allate et cardiaque d'une larve exposée au milieu acidifié pendant huit jours (grossissement x 250).

Photo I.4 : Hémolymphe (flèche) présente dans l'espace pérित्रachéen d'une larve exposée au milieu acidifié pendant huit jours (grossissement x 160).

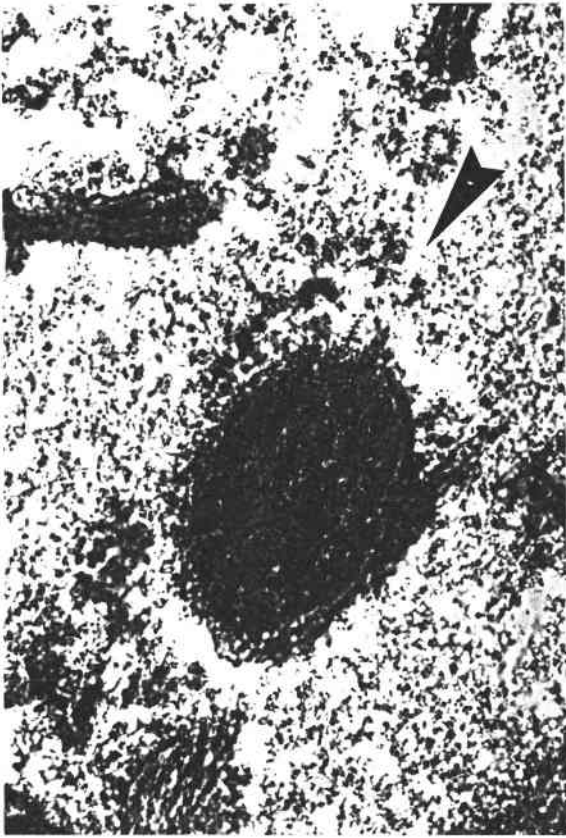


Photo I.1



Photo I.2

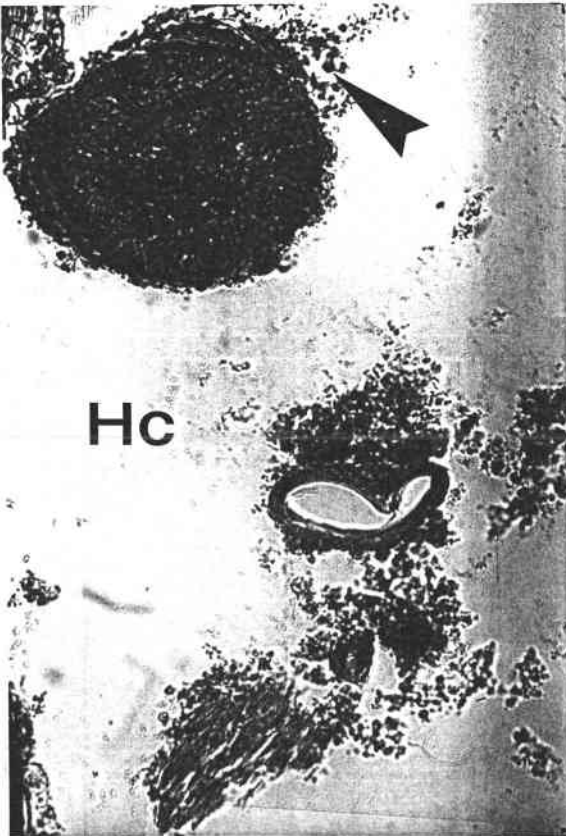


Photo I.3

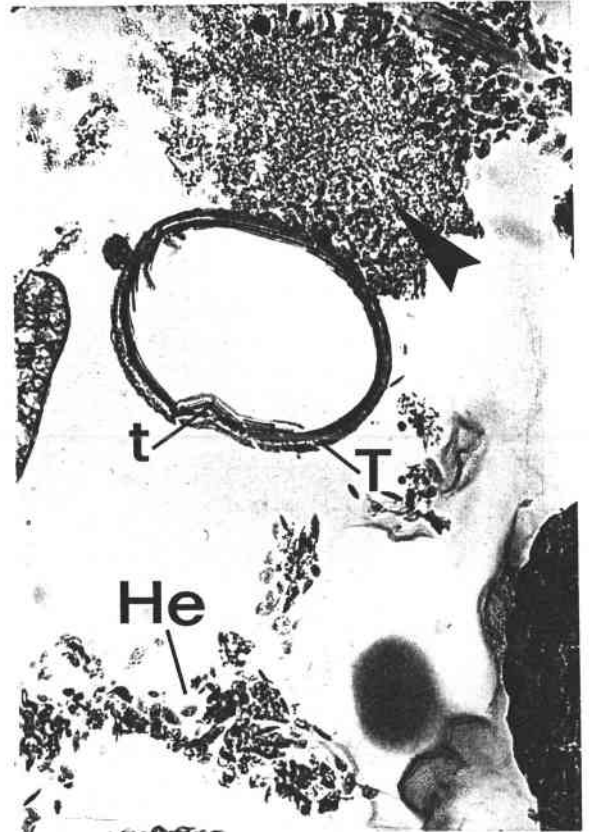


Photo I.4

## PLANCHE II

### **Détail de la structure de l'hémolymphe de larves de *Dinocras cephalotes* témoins et après une exposition de huit jours à un milieu acidifié.**

Photo II.1 : Détail de l'hémolymphe (coagulum + hémocytes) présente dans l'espace pérित्रachéen d'une larve témoin. Les hémocytes peu nombreux apparaissent en rose dans le coagulum coloré en bleu (grossissement x 400).

Photo II.2 : Détail de l'hémolymphe (coagulum + hémocytes) présente dans l'espace périoesophagien d'une larve témoin (grossissement x 1000).

Photo II.3 : Détail de l'hémolymphe (coagulum + hémocytes) présente dans l'espace pérित्रachéen d'une larve exposée à un milieu acidifié pendant huit jours (grossissement x 400).

Photo II.4 : Détail de l'hémolymphe (coagulum + hémocytes) présente dans l'espace périoesophagien d'une larve exposée à un milieu acidifié pendant huit jours (grossissement x 1000).



Photo II.1

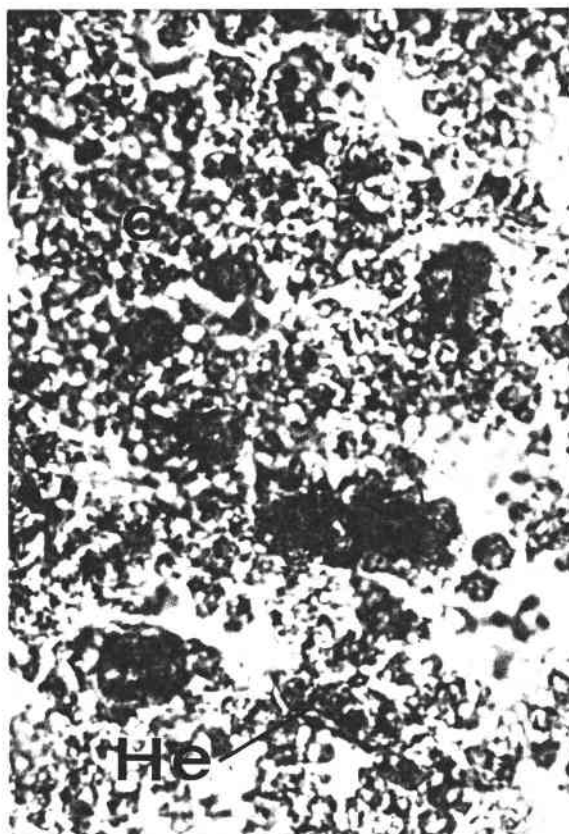


Photo II.2



Photo II.3



Photo II.4

Au niveau des corps allates et cardiaques, organes endocrines de l'insecte, l'hémolymphe est disséminée dans tout l'espace environnant (Photo I.1).

De même, dans des zones proches des trachées, l'hémolymphe occupe tout l'espace pérित्रachéen (Photo I.2). L'observation à plus fort grossissement de cette zone révèle quelques hémocytes, notamment à proximité des trachées et une grande quantité de coagulum (Photo II.1). Dans le reste de l'organisme, cette distribution (beaucoup de coagulum avec peu d'hémocytes) se retrouve (Photo II.2).

Les organes endocrines et les trachées principales ont été choisies comme organes repères pour les observations car ils sont aisés à situer dans l'organisme. Ils se situent par ailleurs au niveau d'hémocoèles importants.

\* Lot exposé au milieu acidifié pendant huit jours

La comparaison des coupes histologiques réalisées chez des insectes exposés au milieu acidifié pendant huit jours à des niveaux de l'organisme similaire à celles des larves témoins décrites ci-dessus révèle des différences. Tandis que les corps allates et cardiaques des larves témoins baignent dans une hémolymphe riche en coagulum, ceux des larves stressées baignent dans une hémolymphe pauvre en coagulum observable seulement à proximité des organes (Photo I.3).

Cette observation s'applique également à l'espace pérित्रachéen (Photo I.4). La partie figurée de l'hémolymphe est présente en quantité moins importante que pour les témoins et elle a un aspect plus dense formant un caillot. A plus fort grossissement, ces amas révèlent une grande proportion d'hémocytes par rapport au coagulum des témoins (Photo II.3).

Cette différence dans la répartition coagulum - hémocytes de l'hémolymphe des larves stressées par rapport aux larves témoins est confirmée par l'observation de l'hémocoèle à d'autres niveaux de l'organisme, tels que l'espace périoesophagien. De grande quantité de cellules sanguines sont amassées dans peu de coagulum (Photo II.4).

#### IV.3.7.2.2. Discussion

L'hémolymphe, fluide extracellulaire circulant dans l'hémocoèle, est répartie dans tout l'organisme de l'insecte. Elle contient des hémocytes, soit répartis dans le coagulum, soit en contact avec les organes. Dans cette étude, les différents types d'hémocytes n'ont pas été identifiés car, d'une part, la nomenclature variant selon les auteurs rend l'identification très difficile et d'autre part, la majorité de ces cellules étant adhérente aux organes, elles sont peu aisées à prélever avec l'hémolymphe.

Lorsque des larves sont exposées au milieu acidifié, il apparaît lors de la ponction que plus l'exposition est longue, plus l'hémolymphe est difficile à prélever (cf. § IV.3.3.). Cela semble être dû à

une diminution de volume et à un changement de viscosité. Cette impression se confirme lors de l'observation des coupes histologiques réalisées sur les larves du lot témoin et du lot exposé en milieu acidifié. Une nette différence apparaît dans le volume et dans le rapport coagulum - hémocyte. En effet, dans les différentes cavités de l'organisme, une quantité très réduite de la partie figurée de l'hémolymphe (coagulum) est visible, ce qui entraîne à ces niveaux, un plus grand nombre d'hémocytes groupés en caillots.

L'hémolymphe est normalement constituée à 90 % d'eau et la réduction de son volume est donc liée à une diminution de la fraction hydrique. Cette variation explique également le changement dans la fluidité et confirme l'hypothèse avancée dans la discussion sur le pourcentage de poids sec par rapport au poids frais (cf. § IV.3.5.2.). De plus, l'hémolymphe restante apparaît surtout aux environs des organes, facilitant ainsi les échanges entre ces deux compartiments extra et intracellulaires.

Cette diminution de la proportion d'eau entraîne une concentration localisée des constituants de l'hémolymphe, ne permettant pas cependant de compenser le sens des échanges ioniques des cellules vers le milieu intérieur avec fuite du potassium.

### **IV.3.7.3. Effets observés sur les tubes de Malpighi (Planches III à VI)**

#### **IV.3.7.3.1. Résultats**

##### **\* Observation des tubes de Malpighi des larves témoins**

Deux types de cellules, les cellules étoilées et les cellules primaires composent l'épithélium tubulaire.

##### **Les cellules étoilées**

Ces cellules sont distribuées le long des cellules primaires sous la lame basale. Elles sont de petite taille, avec un petit noyau central. Le cytoplasme apparaît clair et dépourvu de grains (Photo III.1).

##### **Les cellules primaires**

Les cellules primaires, qui sont les plus nombreuses, sont situées directement sous la lame basale du tube qui apparaît comme une zone assez fine (Photo III.2).

L'observation des coupes de tubes de Malpighi en microscopie optique et électronique révèle une organisation des organites à l'intérieur de ces cellules allant de l'hémocoel vers la lumière centrale. Trois zones se distinguent (Figure 34) :

- sous la lame basale du tube se trouve la membrane basale de la cellule avec des invaginations et de nombreuses mitochondries,

- la partie médiane avec le noyau, des vacuoles et des sphérules à différents stades de formation,
- la partie apicale entourant la lumière du tube dépourvue de sphérules avec des microvillosités et des mitochondries abondantes.

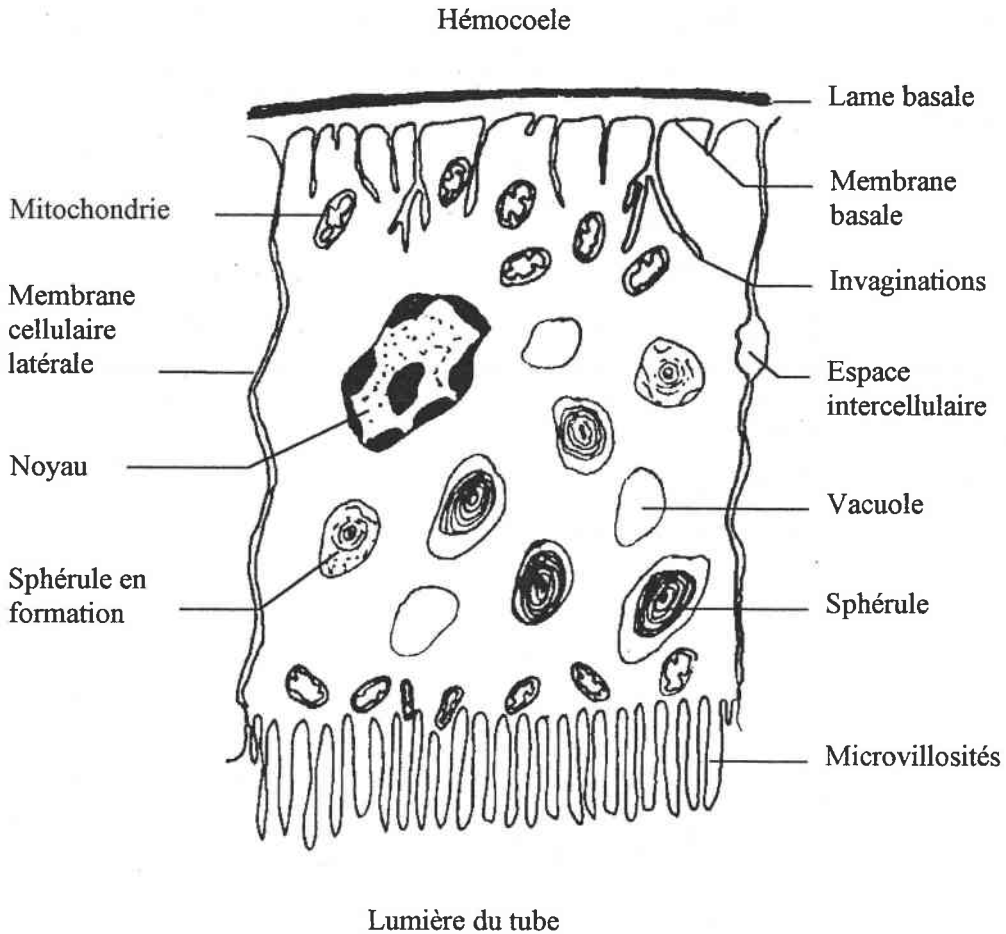


Figure 34 : Schéma d'une cellule primaire de tube de Malpighi prélevée chez une larve témoin.

L'observation des coupes semi-fines confirme cette organisation, elle montre également que les sphérules sont répartis d'une façon homogène dans toute la section du tube (Photo IV.1).

En microscopie électronique, la membrane cellulaire basale de la cellule primaire présente un aspect lamellaire. Elle s'invagine dans le cytoplasme à de nombreux endroits augmentant ainsi la surface d'échange. De nombreuses mitochondries sont présentes dans cette région (Photo V.1).

Des sphérules de diamètres différents (0.8 - 4  $\mu\text{m}$ ), contenues dans des vacuoles, sont dispersés dans tout le cytoplasme (Photo V.2).

Lors de la réalisation des coupes fines pour l'observation en microscopie électronique, ces sphérules peuvent disparaître en totalité ou partiellement par fracture pendant la coupe provoquant l'apparition de nombreuses vacuoles vides dans le cytoplasme. Le vide observé peut également être imputé au niveau de la réalisation de la coupe, le sphérule n'étant alors pas concerné par le plan de coupe. D'autres vacuoles renferment du liquide. L'examen détaillé des sphérules montre qu'ils sont



formés d'une alternance de bandes concentriques claires et foncées (Photo V.3). Les sphérules apparaissent à des stades variés de formation et sont observables de la lame basale à la zone apicale (Photos VI.1 et VI.2).

Autour de la lumière du tube se trouve la membrane cellulaire apicale riche en microvillosités. Dans le cytoplasme environnant, de nombreuses mitochondries, des ribosomes et du réticulum endoplasmique sont abondants (Photo V.4).

\* Observation des tubes de Malpighi des larves exposées pendant huit jours au milieu acidifié

L'organisation générale des cellules primaires présentes en majorité dans les tubes de Malpighi reste identique à celle décrite pour les larves témoins. En allant de l'hémocoèle vers la lumière centrale, trois zones sont identifiables (Figure 35) :

- membrane basale avec des invaginations,
- zone médiane avec des sphérules,
- partie apicale périphérique à la lumière centrale du tube.

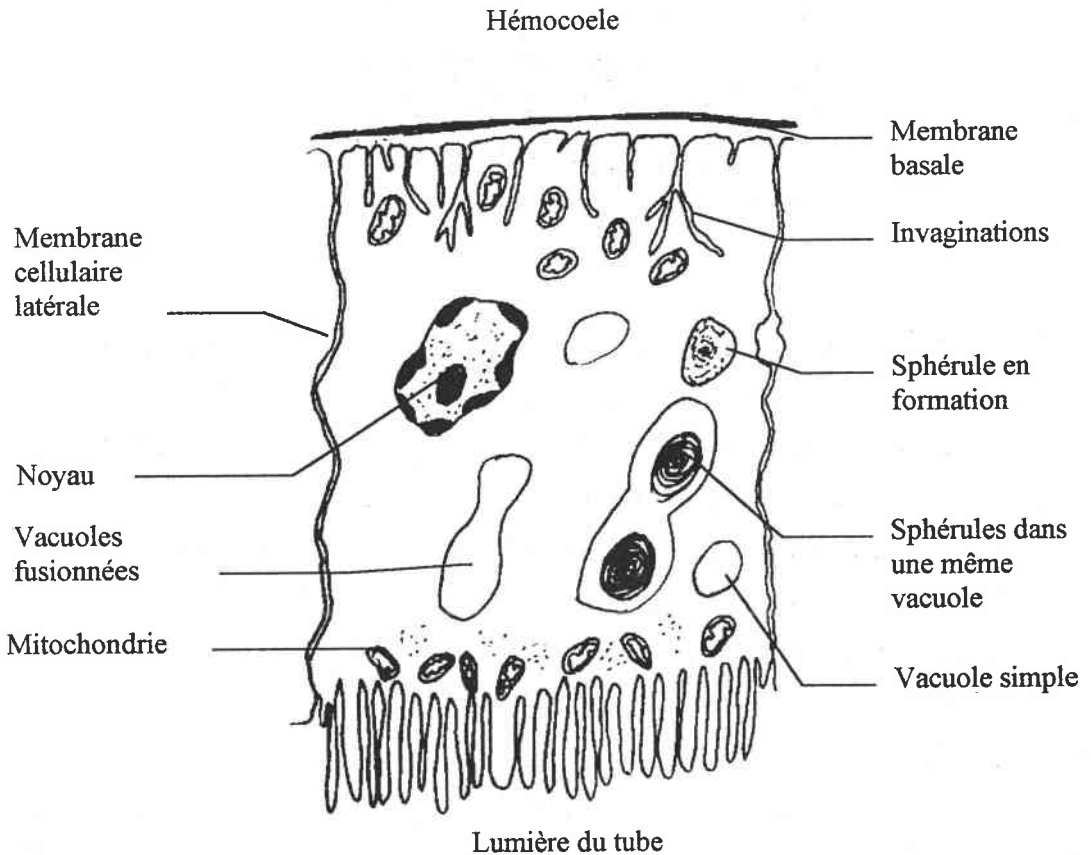


Figure 35 : Schéma de cellule primaire de tube de Malpighi prélevée chez une larve exposée huit jours à un milieu acidifié.

### PLANCHE III

**Mise en évidence de l'organisation cellulaire des tubes de Malpighi de larves témoins et exposées pendant huit jours à un milieu acidifié par l'observation de coupes en microscopie optique.**

Photo III.1 : Mise en évidence de la présence de cellule étoilée (flèche) dans les tubes de Malpighi prélevés chez une larve témoin (grossissement x 250).

Photo III.2 : Coupe transversale de tube de Malpighi de larve témoin. Les cellules primaires sont mises en évidence (grossissement x 1000).

Photo III.3 : Coupe transversale de tube de Malpighi de larve ayant été exposée pendant huit jours à un milieu acidifié. De grands espaces vides sont présents dans les cellules primaires. La forme est modifiée avec une bordure moins circulaire (grossissement x 1000).

Photo III.4 : Coupe transversale de tube de Malpighi de larve ayant été exposée pendant huit jours à un milieu acidifié (grossissement x 1000).

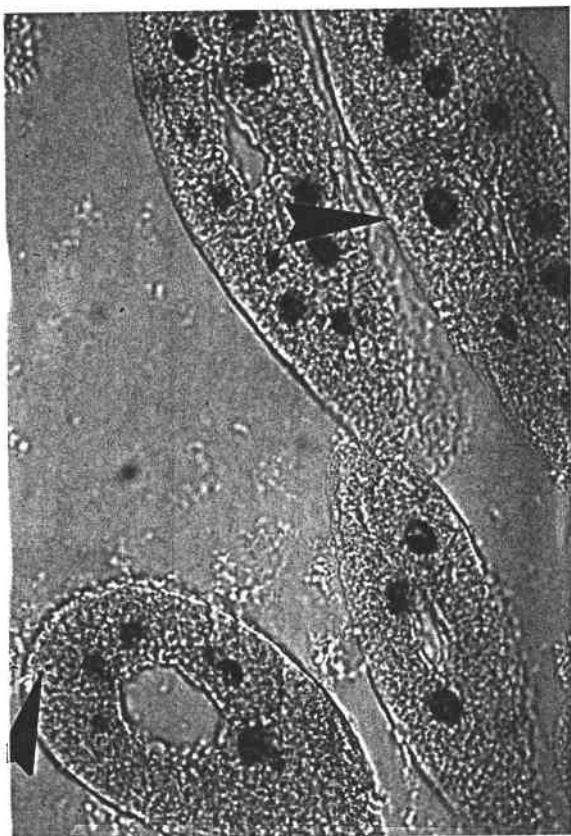


Photo III.1

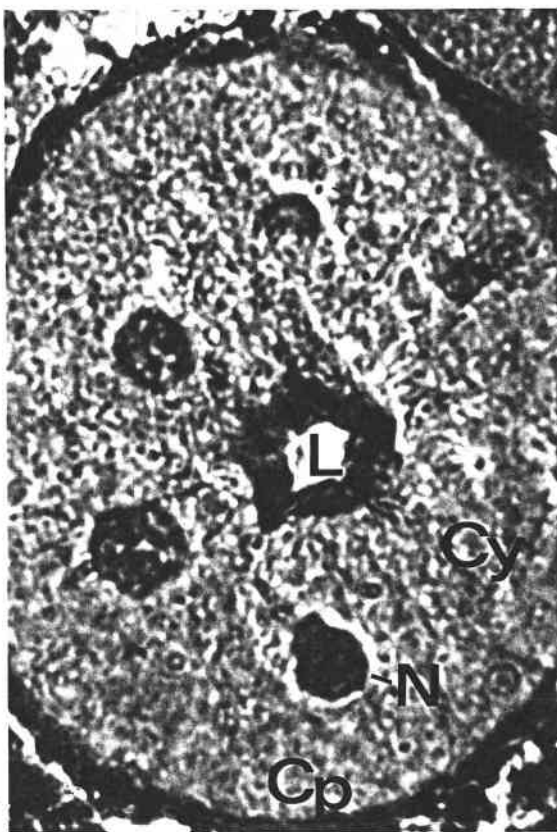


Photo III.2

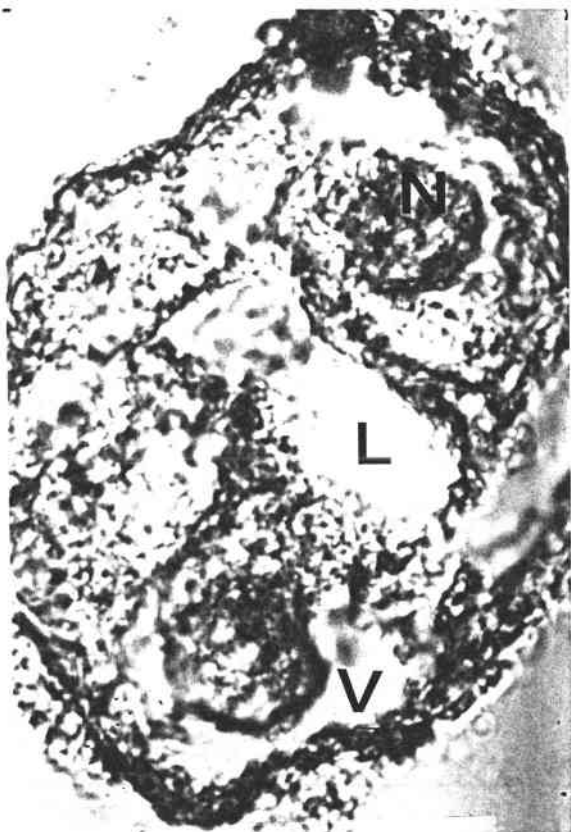


Photo III.3

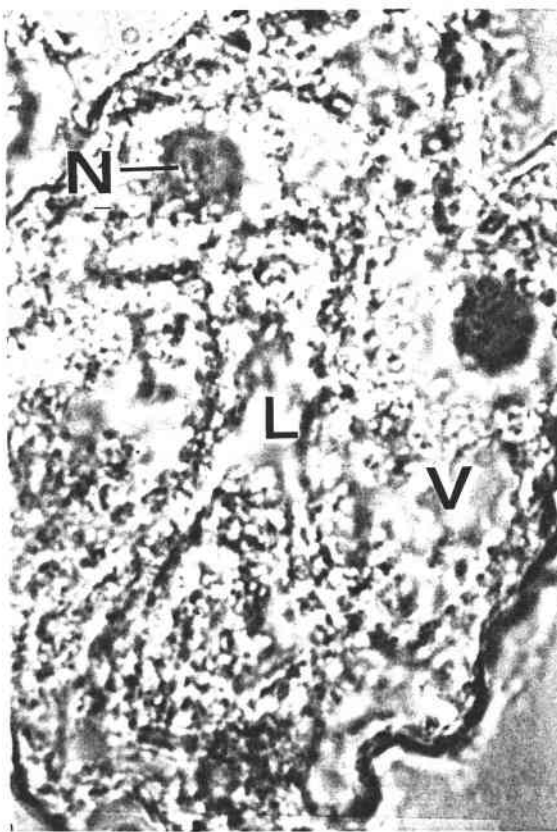


Photo III.4

## PLANCHE IV

**Mise en évidence de l'organisation cellulaire des tubes de Malpighi de larves témoins et exposées pendant huit jours à un milieu acidifié par l'observation de coupes semi-fines.**

Photo IV.1 : Coupe semi-fine de tubes de Malpighi prélevés chez une larve témoin. Les sphérules sont répartis de façon homogène dans les cellules primaires (grossissement x 400).

Photo IV.2 : Coupe semi-fine de tubes de Malpighi prélevés chez une larve après huit jours d'exposition à un milieu acidifié. La vacuolisation dans les cellules primaires mise en évidence par l'observation en microscopie optique est confirmée (grossissement x 400).

Photo IV.3 : Détail d'une coupe semi-fine de tube de Malpighi prélevé chez une larve après huit jours d'exposition à un milieu acidifié (grossissement x 1000). Remarquer la vacuolisation importante.

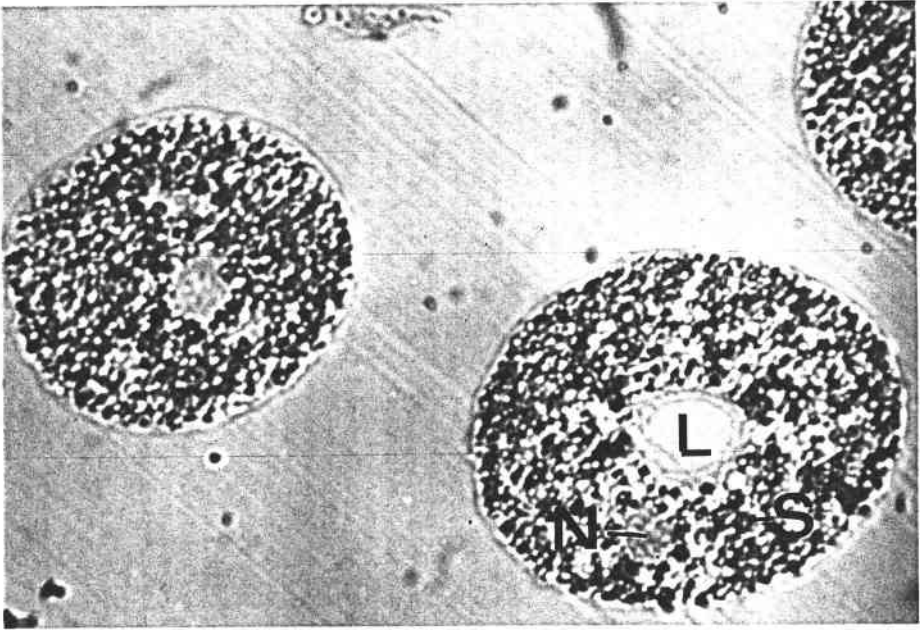


Photo IV.1



Photo IV.2

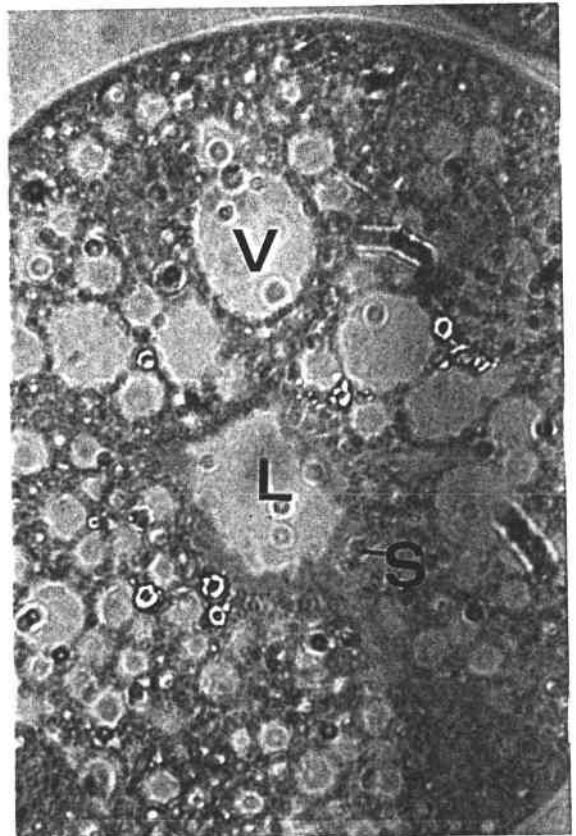


Photo IV.3

## PLANCHE V

**Mise en évidence de l'ultrastructure des cellules primaires des tubes de Malpighi de larve témoin par l'observation de coupes en microscopie électronique.**

Photo V.1 : Détail de la membrane basale d'une cellule primaire de tube de Malpighi prélevé chez une larve témoin (grossissement x 15 000).

Photo V.2 : Mise en évidence de la présence de sphérules dans la cellule primaire de tube de Malpighi prélevé chez une larve témoin (grossissement x 5 000).

Photo V.3 : Détail de sphérules chez une larve témoin. Un sphérule est formé d'une alternance de bandes concentriques claires et foncées (flèche) (grossissement x 13 000).

Photo V.4 : Détail de la membrane cellulaire apicale d'une cellule primaire de tube de Malpighi prélevé chez une larve témoin (grossissement x 13 000).



Photo V.1

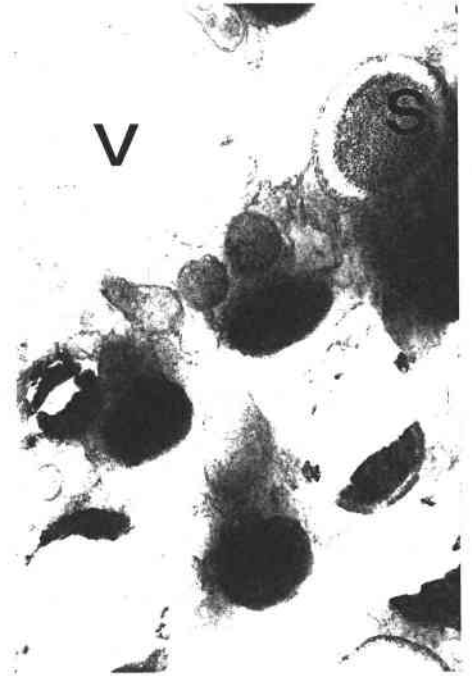


Photo V.2



Photo V.3

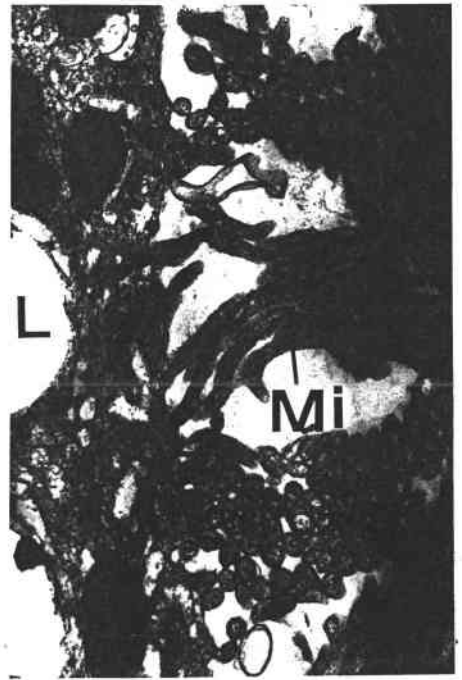


Photo V.4

## PLANCHE VI

**Références du témoin et mise en évidence des modifications dans les cellules primaires des tubes de Malpighi de larves de *Dinocras cephalotes* exposées pendant huit jours à un milieu acidifié.**

Photo VI.1 : Détail de sphérules de la cellule primaire de tube de Malpighi prélevé chez une larve témoin (grossissement x 5 000).

Photo VI.2 : Détail de sphérules dans la partie apicale de la cellule primaire de tube de Malpighi de larve témoin (grossissement x 7 500).

Photo VI.3 : Détail de sphérules de la cellule primaire de tube de Malpighi prélevé chez une larve exposée à un milieu acidifié pendant huit jours (grossissement x 5 000).

Photo VI.4 : Détail de sphérules de la cellule primaire de tube de Malpighi prélevé chez une larve exposée à un milieu acidifié pendant huit jours. Différentes formes de vacuolisation sont mises en évidence. Les flèches signalent l'absence de membrane délimitante entre deux sphérules où plusieurs vacuoles fusionnées (grossissement x 5 000).

Photo VI.5 : Mise en évidence de la vacuolisation observée dans les cellules primaires de tube de Malpighi prélevé chez une larve exposée à un milieu acidifié pendant huit jours. Aucune membrane délimitante ne sépare les deux sphérules contenus dans la même vacuole (flèche) (grossissement x 13 000).



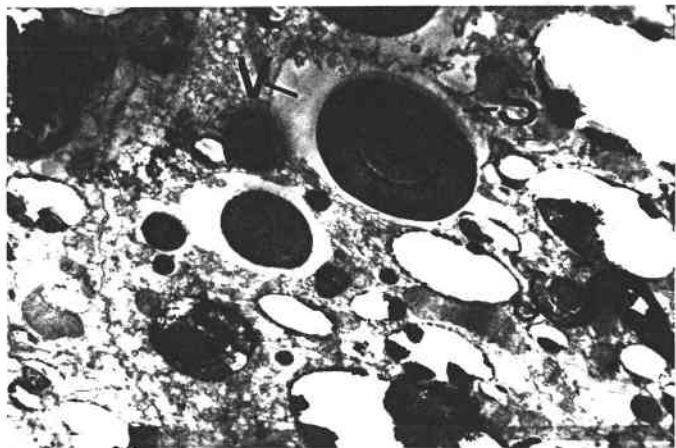


Photo VI.1

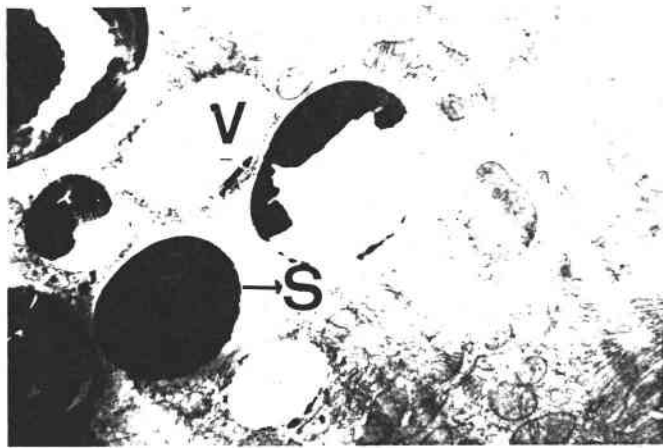


Photo VI.2

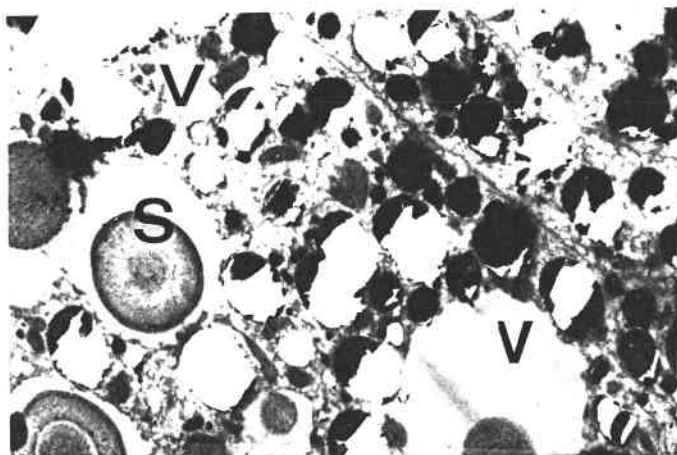


Photo VI.3

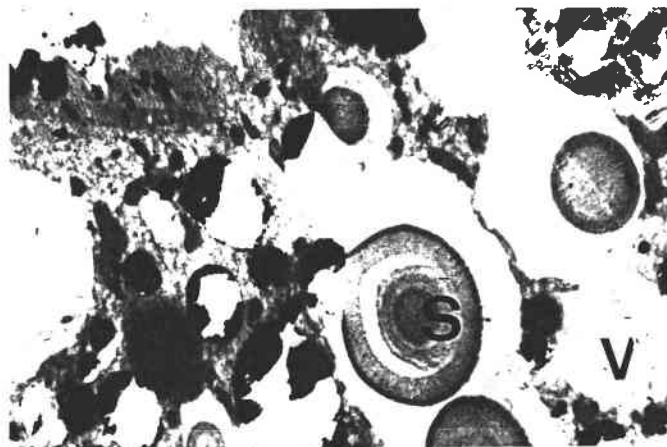


Photo VI.4



Photo VI.5

Toutefois, l'observation en microscopie révèle des différences dans la distribution des sphérules dans la partie médiane du tube. Les coupes en microscopie optique (Photos III.3 et III.4) et les coupes semi-fines présentent de grands vides et une répartition irrégulière des sphérules (Photos IV.2 et IV.3).

Les observations réalisées en microscopie électronique confirme qu'une vacuolisation se produit dans les cellules primaires au niveau de la partie médiane. Du côté extérieur, la membrane basale lamellaire s'invagine plus ou moins dans le cytoplasme où des sphérocristaux plus ou moins développés sont répartis jusqu'à la zone de microvillosités entourant la lumière centrale (Photo VI.3).

Dans la zone médiane contenant les sphérocristaux, des différences par rapport aux témoins apparaissent au niveau des vacuoles. En effet, certaines, comme pour les témoins ne contiennent aucun sphérule tandis que d'autres en renferment un seul. A l'opposé, dans d'autres vacuoles de taille supérieure, il est possible d'observer plusieurs granules, ce qui n'a pas été rencontré chez les témoins (Photos VI.4 et VI.5).

#### IV.3.7.3.2. Discussion

Les tubes de Malpighi jouent un rôle fondamental dans l'excrétion. Ils sont impliqués dans la production d'une urine primaire dont les constituants ont pour la majorité des concentrations similaires à celles rencontrées dans l'hémolymphe d'où ils sont issus. Ce fluide primaire est drainé vers le tube digestif postérieur où sont réabsorbées les substances nécessaires à l'insecte tandis que les autres sont rejetées. La composition et le volume de l'hémolymphe est ainsi gardé constant ou ajusté selon les besoins de l'insecte.

L'épithélium des tubes de Malpighi des larves de *Dinocras cephalotes* issus du lot témoin est composé par deux types cellulaires: les cellules étoilées et les cellules primaires. Ces deux types de cellules sont également décrits dans les tubes de Malpighi d'un autre Plécoptère *Paragnetina media* (Kapoor, 1994), ainsi que dans chez les moustiques, *Aedes taeniorhynchus* et *Aedes aegypti* (Bradley *et al.*, 1982). Chez toutes ces espèces, la proportion des cellules étoilées est toujours inférieure à celle des cellules primaires. Kapoor (1994) estime qu'elles représentent 10 à 12 % de la totalité cellulaire.

L'observation en Microscopie Electronique à Transmission (MET) révèle l'ultrastructure des cellules primaires. Elles présentent des invaginations de la membrane cellulaire basale, et du côté apical, de nombreuses microvillosités et mitochondries autour de la lumière du tube. Ces particularités sont caractéristiques des épithéliums de transport. Les invaginations et les microvillosités constituent des canaux intracellulaires dans lesquels se forment des gradients osmotiques qui génèrent les mouvements d'eau et d'ions. Les mitochondries présentes à ces niveaux fournissent l'énergie

nécessaire. La présence de nombreuses concrétions à l'intérieur du cytoplasme cellulaire des cellules primaires traduit aussi ce rôle de transport.

Ces sphérules sont identiques à ceux observés dans les tubes de Malpighi d'un autre Plécoptère *Paragnetina media*, et également de l'Ephéméroptère, *Ecdyonurus dispar* (Nicholls, 1983). Ils sont également décrits chez des insectes terrestres. Ainsi, ce type de sphérules est trouvé dans le tube de Malpighi de *Calpododes ethlius* (Lépidoptère) (Ryerse, 1979) et de *Musca domestica* (Diptère) (Sohal *et al.*, 1976). Leur présence en outre n'est pas limitée aux tubes de Malpighi, ni aux insectes. En effet, ils sont également mis en évidence dans d'autres organes tels que l'épithélium du tube digestif moyen de *Musca domestica* (Sohal *et al.*, 1977) et de *Formica polyctena* (Jeantet *et al.*, 1974), ainsi que dans le manteau de la moule *Amblema* (Davis *et al.*, 1982).

Trois modes de formation peuvent être à l'origine de ces sphérules. Ils peuvent se former à partir de vésicules issues du complexe de Golgi autour desquelles se déposent un matériel granuleux dense en lamination régulière. Cet ensemble est au centre d'une vacuole. Certaines sont issues de l'invagination de la membrane de la vacuole sur laquelle s'était déposée du matériel dense. L'aspect concentrique est dû aux invaginations successives des membranes. D'autres proviennent des lysosomes secondaires. En fait, les sites intracellulaires de formation des concrétions varient selon les insectes. Dans les tubes de Malpighi de *Musca domestica*, les trois origines sont observées tandis que dans l'épithélium, elles ne sont que d'origine golgiennne (Sohal *et al.*, 1976 et 1977). L'observation des vacuoles présentes dans les cellules primaires de *Dinocras cephalotes* montre que les sphérules présents sont issus de l'invagination de la membrane vacuolaire. Ce mode de formation semble être commun aux Plécoptères et a été rapporté pour l'espèce *Paragnetina media* (Kapoor, 1994).

Les concrétions sont des corps minéralisés denses dont la composition varie selon les espèces. D'une manière générale, elles contiennent du calcium, du magnésium, de l'acide urique et des phosphates. Leur rôle n'est pas encore très bien déterminé. Toutefois, il semblerait qu'elles interviennent pour le stockage de matériel, ainsi que pour le transport d'éléments qu'elles déverseraient dans la lumière du tube. Ce relargage entraînerait une augmentation de la pression osmotique dans le fluide luminal qui déclencherait le mouvement de l'eau à travers l'épithélium du tube de Malpighi (Sohal *et al.*, 1976).

D'autres éléments (Na, K) transitent par les cellules primaires des tubes de Malpighi sans passer par la formation des granules. Le transport de ces ions est probablement actif, nécessitant l'intervention d'une enzyme, la Na-K ATPase dont le rôle dans le transport est prouvé. Les études réalisées par Kapoor (1980) et Anstee et Bell (1975) ont confirmé la présence d'une telle enzyme au niveau des tubes de Malpighi.

L'observation des cellules primaires des tubes de Malpighi des larves de *Dinocras cephalotes* exposées au milieu acidifié pendant huit jours met en évidence une différence dans l'ultrastructure par rapport à celles décrites pour les larves témoins. Chez ces dernières, les vacuoles renfermant des sphérules n'en contiennent qu'une alors que chez les larves exposées au milieu acidifié, certaines vacuoles renferment deux, ou plus de sphérules. Par ailleurs, beaucoup d'autres vacuoles sont vides et géantes. Cela laisse supposer qu'une perturbation se produit dans le transport de l'eau et des ions qui transitent par le tube de Malpighi. En effet, il est probable que dans un premier temps d'exposition au milieu acidifié, le transport soit activé à cause des différences de pression osmotique entre les différents compartiments de l'organisme suite aux pertes d'électrolytes se produisant à partir de l'hémolymphe vers le milieu extérieur. Ce relargage accéléré de matériaux expliquerait la présence de vacuoles qui fusionnent alors ensemble ou avec d'autres (une ou plusieurs) contenant encore un sphérule.

Ce dysfonctionnement doit également se répercuter pour les éléments ne nécessitant pas la formation de sphérules pour leur passage. Ainsi, l'absorption et la réabsorption du sodium peut être perturbée. Colby (1972) a montré qu'une augmentation dans les pertes de sodium se produit dans les urines des larves de *Pteronarcys californica* (Plécoptères) exposées à de l'eau déminéralisée. D'autres études réalisées sur des insectes exposés en milieu acidifié montrent également que l'excrétion de sodium est augmentée (Frick, 1990 ; Twitchen, 1990). Une réduction dans l'activité de l'enzyme Na-K ATPase peut expliquer ce phénomène par une diminution de la résorption active.

#### **IV.3.7.4. Effets observés sur les trachéobranchies (Planches VII à IX)**

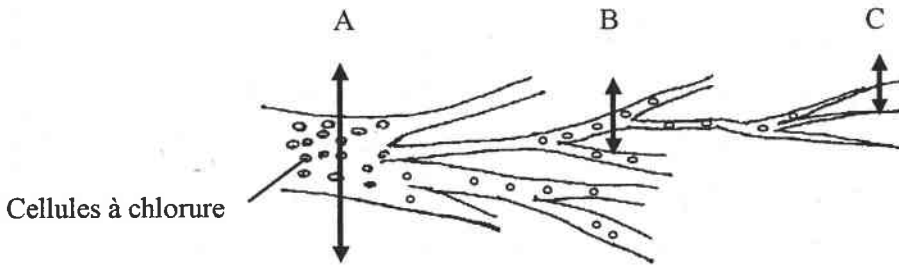
##### **IV.3.7.4.1. Résultats**

L'observation des branchies est limitée au niveau des trachées et des trachéoles, les cellules à chlorures faisant l'objet d'études dans le même laboratoire (Guérol, 1992 ; 1995).

##### **\* Observation des branchies de larves témoins**

Les branchies sont composées d'un nombre important de filaments branchiaux renfermant des trachées se ramifiant pour donner des filaments de plus en plus fins, les trachéoles (Figure 36).

L'observation en microscopie optique des coupes de branchies prélevées sur des larves témoins montre l'organisation des filaments branchiaux (Photo VII.1). Une cuticule externe délimite chaque filament. Les cellules à chlorures forment des disques à la surface de la cuticule.



A, B, C : localisation des différents niveaux de coupe.

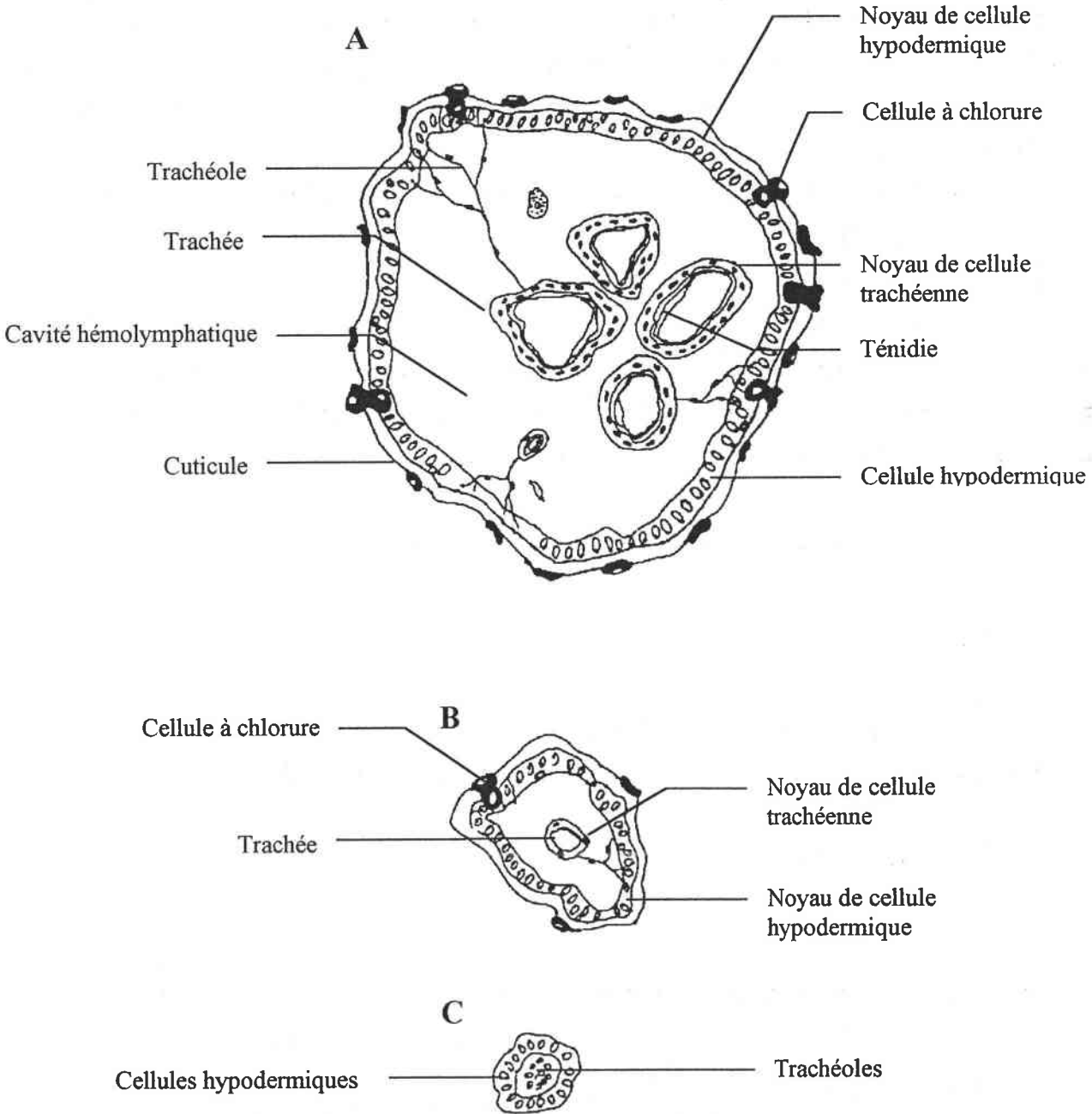


Figure 36 : Schéma d'une "houpe" branchiale

## PLANCHE VII

**Mise en évidence de la structure histologique des branchies de larves témoin et exposées pendant huit jours à un milieu acidifié par l'observation de coupes en microscopie optique.**

Photo VII.1 : Coupe transversale d'un filament branchial prélevé chez une larve témoin (grossissement x 160).

Photo VII.2 : Détail d'une coupe de filament branchial prélevé sur une larve témoin (grossissement x 1000).

Photo VII.3 : Coupe transversale de filaments branchiaux prélevés sur une larve exposée à un milieu acidifié pendant huit jours. Les ténidies apparaissent écrasées (flèche) (grossissement x 160).

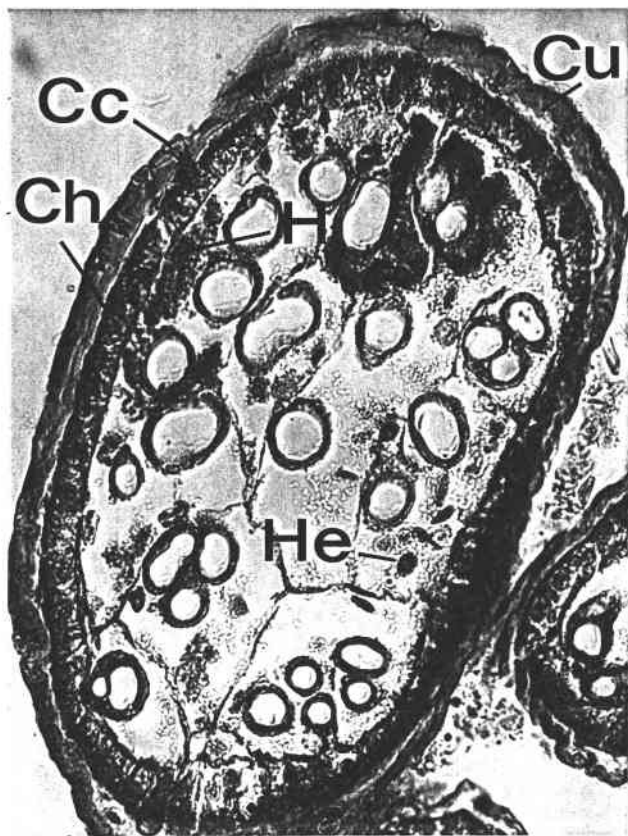


Photo VII.1



Photo VII.2

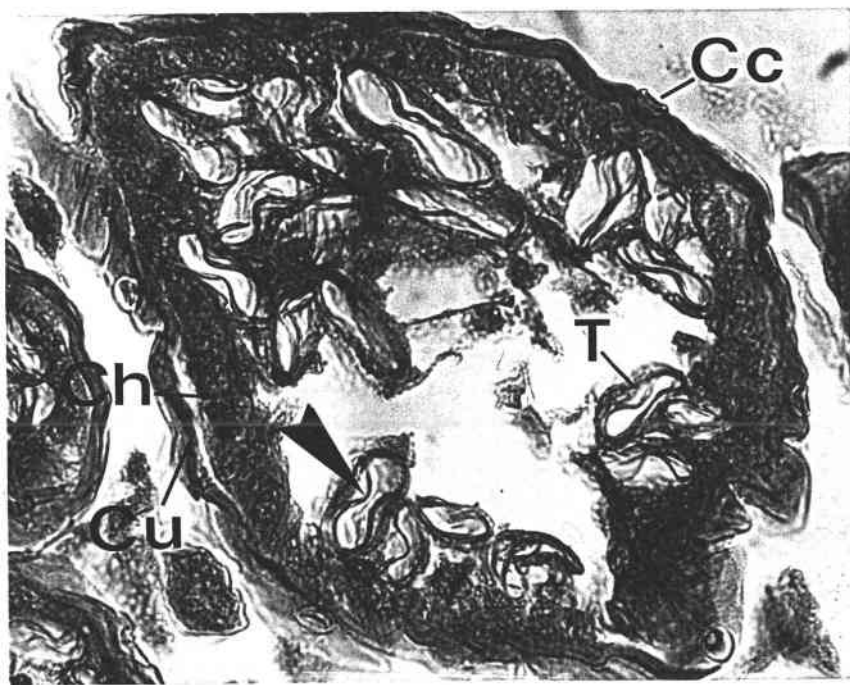


Photo VII.3

## PLANCHE VIII

**Mise en évidence de la structure histologique des branchies de larves témoin et exposées pendant huit jours à un milieu acidifié par l'observation de coupes semi-fines.**

Photo VIII.1 : Coupe transversale de filaments branchiaux d'une larve témoin (grossissement x 400).

Photo VIII.2 : Coupe d'un filament branchial prélevé sur une larve exposé à un milieu acidifié pendant huit jours (grossissement x 400). Noter l'absence de liquide trachéolaire (flèches).

Photo VIII.3 : Détail d'une coupe de filament branchial prélevé sur une larve exposé à un milieu acidifié pendant huit jours (grossissement x 1000). Noter le décollement des épithéliums trachéens avec remplissage de liquide (flèches).



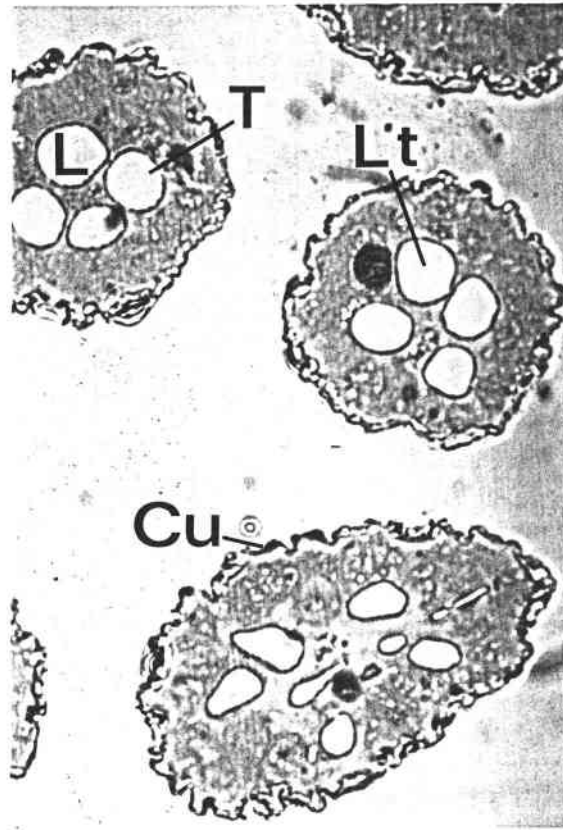


Photo VIII.1

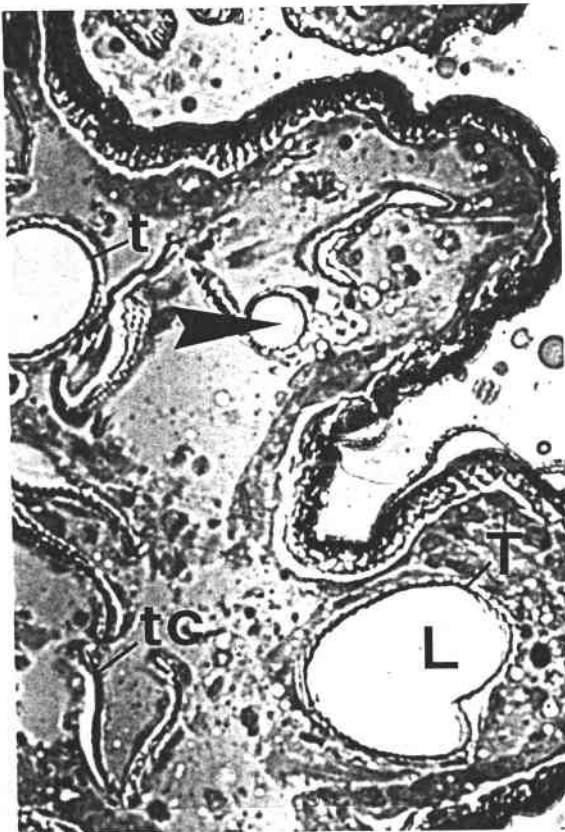


Photo VIII.2

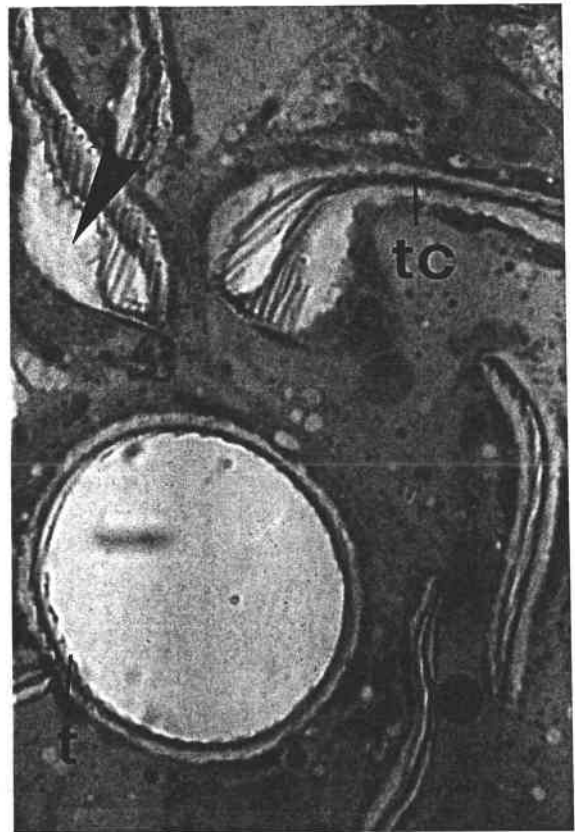


Photo VIII.3

## PLANCHE IX

**Mise en évidence de l'ultrastructure des branchies de larves témoin et exposées pendant huit jours à un milieu acidifié par l'observation en microscopie électronique.**

Photo IX.1 : Détail d'une branchie prélevée sur une larve témoin (grossissement x 15 000).

Photo IX.2 : Mise en évidence de la présence du liquide trachéolaire (grossissement x 10 000).

Photo IX.3 : Ténidie plus ou moins collapsée (flèche) dans un filament branchial prélevé sur une larve exposé à un milieu acidifié pendant huit jours (grossissement x 4 000).

Photo IX.4 : Ténidie plus ou moins collapsée (flèche) dans un filament branchial prélevé sur une larve exposé à un milieu acidifié pendant huit jours (grossissement x 10 000).

Photo IX.5 : Ténidie entièrement collapsée (flèche) observée dans un filament branchial prélevé sur une larve exposé à un milieu acidifié pendant huit jours (grossissement x 13 000).

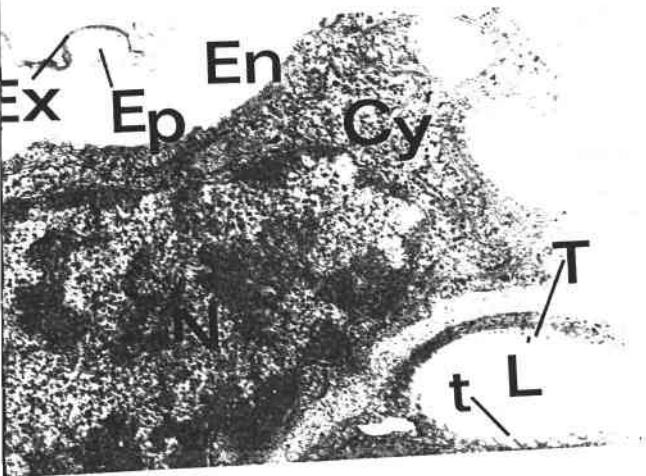


Photo IX.1

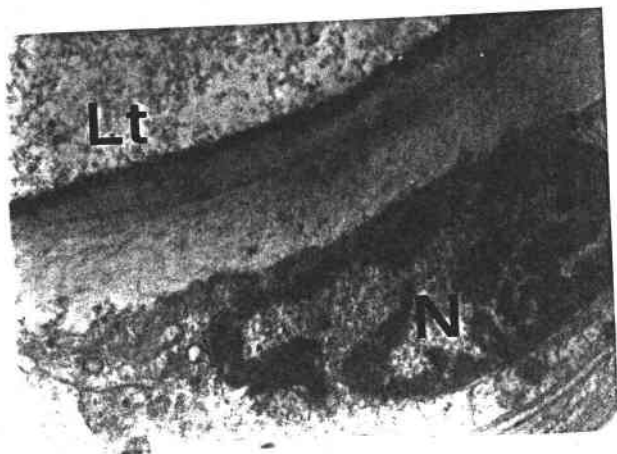


Photo IX.2

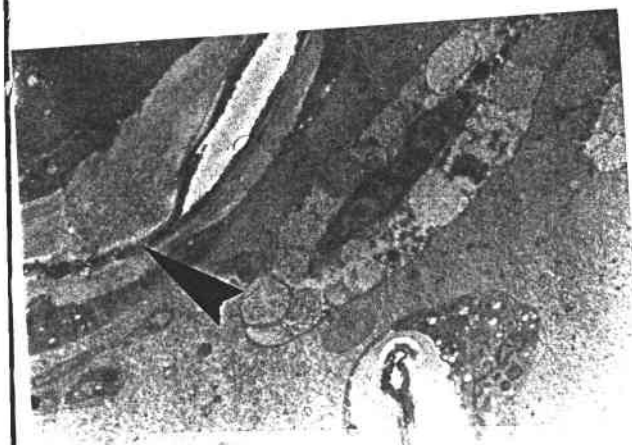


Photo IX.3

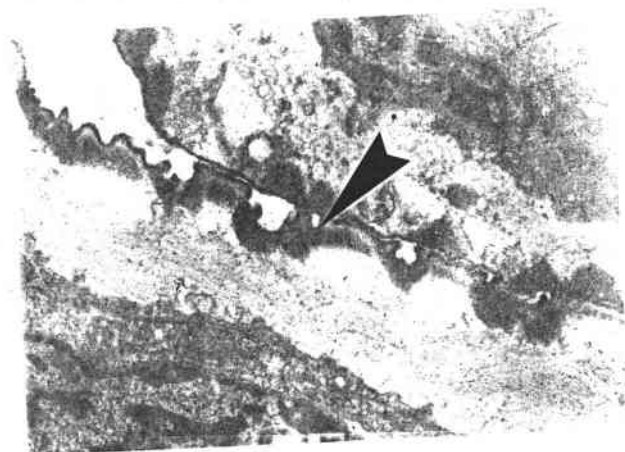


Photo IX.4



Photo IX.5

Sous la cuticule se situe une assise cellulaire hypodermique dont chaque cellule est caractérisée par la présence d'un gros noyau. A l'intérieur du filament dont la périphérie est formée des deux couches décrites ci-dessus, un certain nombre de trachées (ou de trachéoles selon le niveau de coupe) sont observables ainsi que de l'hémolymphe (Photo VII.2). Les trachées consistent en tubes formés extérieurement de cellules trachéennes dont le noyau est bien visible et contenant un filament enroulé en spirale, la ténidie.

L'observation des coupes semi-fines réalisées dans une partie plus éloignée de la base présente la même disposition (Photo VIII.1).

En microscopie électronique, l'ultrastructure de la branchie présente une cuticule formée de trois couches successives (Photo IX.1) :

- l'épicuticule, couche extérieure la plus fine,
- l'exocuticule, couche intermédiaire qui apparaît visible sous forme de petits "paquets" plus foncés dans les ornements de l'épicuticule
- l'endocuticule, couche la plus interne, plus épaisse que les deux autres. Elle présente un aspect feuilleté.

Sous la cuticule, l'assise cellulaires mise en évidence par les observations en microscopie optique est composée de cellules hypodermiques. Ces dernières sont formées par un gros noyau et un cytoplasme riche en ribosomes et en mitochondries.

Les trachées sont réparties dans le filament. Sur la périphérie de la coupe, un certain nombre de petites trachées (ou de trachéoles selon le niveau de coupe) sont observables, interpénétrées dans les cellules hypodermiques. L'extrémité des trachéoles est caractérisée par la présence d'un liquide, le liquide trachéolaire (Photo IX.2). Plus au centre, se trouvent des trachées de plus gros diamètre. Elles sont caractérisées par une couche unicellulaire de cellules trachéennes sous laquelle se situe un liquide d'origine hémolympatique, puis se trouve la ténidie.

#### \* Observation des branchies des larves exposés au milieu acidifié

L'observation réalisée sur de nombreuses coupes de branchies prélevées sur des insectes exposés à un milieu acidifié pendant huit jours n'a révélé aucune différence avec celles réalisées pour les larves témoins. Toutefois, sur certaines, des modifications sont mises en évidence au niveau des trachées (Photo VII.3). L'observation des coupes semi-fines montre qu'à de très nombreux endroits, la ténidie est collapsée et qu'à ce niveau, la trachée n'est plus fonctionnelle (Photos VIII.2 et VIII.3). En microscopie électronique, elles apparaissent aussi plus ou moins soudées (Photos IX.3, IX.4 et IX.5).

La figure 37 récapitule les différentes modifications histologiques et physiologiques observées au niveau des trachées chez des larves de *Dinocras cephalotes* exposées à un milieu acidifié.

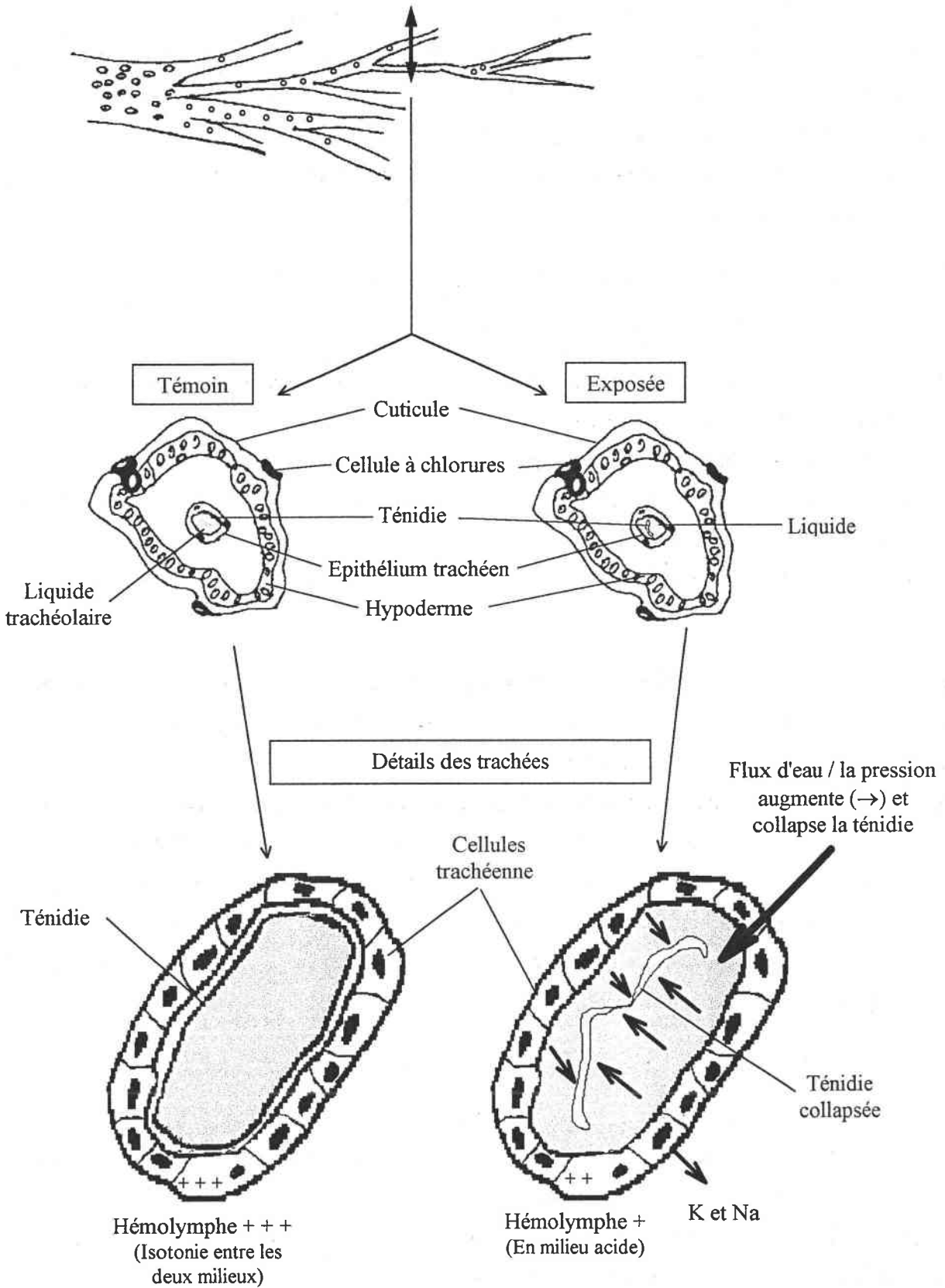


Figure 37 : Schéma récapitulatif des modifications histologiques et physiologiques au niveau des trachées de larves de *Dinocras cephalotes* exposées à un milieu acidifié (ces modifications se produisent coté trachéobranches et coté organes).

#### IV.3.7.4.2. Discussion

Les larves de *Dinocras cephalotes* sont aquatiques et prélèvent l'oxygène qui leur est nécessaire dans l'eau. Elles possèdent des stigmates non fonctionnels ainsi qu'un système de trachées closes. A l'extérieur de l'organisme, elles disposent de branchies ou trachéo-branchies qui représentent une surface effective pour les échanges gazeux. Les gaz diffusent à partir de ces branchies aux organes grâce à la structure des filaments branchiaux. La fonction respiratoire des branchies trachéennes des larves de Plécoptères est démontrée par de nombreux auteurs (Benedetto, 1970 ; Kapoor, 1974 ; Wichard et Komnick, 1974).

Peu de travaux décrivent l'ultrastructure des trachéo-branchies des insectes aquatiques. Des observations réalisées en microscopie électronique sont décrites par Wichard et Komnick (1971) pour des Ephémères, Wichard et Komnick (1974) pour des Plécoptères et Saini (1977) pour des Odonates. Les cellules hypodermiques situées sous la cuticule ont pour rôle de sécréter la nouvelle assise cuticulaire lors des mues.

Le système trachéen est composé de deux éléments : les trachée de large diamètre qui ont un rôle dans la conduite de l'air et les trachéoles qui sont responsables de la diffusion initiale et finale des gaz dans les tissus et organes. Les trachéoles, résultats de la division des trachées, ont un diamètre variant de 1 à 0.2  $\mu\text{m}$ . Elles ont la capacité de s'infiltrer au niveau des branchies dans les cellules hypodermiques et dans les cellules des tissus "cibles". Ainsi, de nombreuses trachéoles viennent s'infiltrer dans les cellules réduisant la distance à parcourir pour les gaz. De même, les cellules hypodermiques présentent des espaces intercellulaires dilatés remplis d'hémolymphe. Dans la branchie, l'hémolymphe et les cellules à chlorures représentent le site pour l'osmorégulation, et les trachées le site pour la respiration.

Les trachéoles sont de très fins capillaires qui correspondent à l'aboutissement des divisions trachéennes. Du point de vue ultrastructural, elles sont composées d'une paroi composée d'une couche unicellulaire de cellules trachéolaires sous laquelle se trouve un faible volume de liquide hémolymphatique et qui est séparée de la lumière trachéolaire par la ténidie. Au niveau des extrémités de ces filaments, un liquide dit "trachéolaire" est présent et son volume varie, notamment sous l'influence de la pression exercée par l'hémolymphe sur la ténidie (Wigglesworth, 1953). Ce liquide facilite par sa présence et son mouvement la diffusion des gaz dans les trachées pour leur entrée et dans les organes pour leur libération.

A chaque niveau de ramification, les trachées se divisent en deux donnant une figure caractéristique aux coupes histologiques réalisées à ce niveau. En effet, la trachée apparaît légèrement

écrasée en son centre ressemblant à une sorte de "8" plus ou moins bien formé par la ténidie. Ce type de figure se retrouve dans les observations réalisées pour les témoins et pour les individus exposés au milieu acidifié pendant huit jours. L'exposition au milieu acidifié n'entraîne donc pas de modifications au niveau des ramifications.

Chez les insectes exposés pendant huit jours au milieu acidifié, de très nombreuses ténidies apparaissent complètement collapsées, et de ce fait, ne contiennent plus de liquide. De l'hémolymphe est néanmoins répartie entre la ténidie et la cellule trachéenne. Une hypothèse peut être avancée pour expliquer ce résultat.

Lorsque des insectes sont exposés à un milieu acidifié, une diminution du volume hémolympatique du compartiment extracellulaire est observée (cf. § IV.3.5. et IV.3.7.2.). Elle est expliquée par un passage de l'eau du milieu extracellulaire vers le milieu intracellulaire. Il est fort probable que ce mouvement d'eau se produise également au niveau des branchies, donc des trachées et des trachéoles. Les trachées étant plus résistantes (plus épaisses), ce passage de liquide n'entraîne pas de modifications. En revanche, au niveau des trachéoles, le volume d'hémolymphe contenu augmente, ainsi que la pression qu'il exerce sur les ténidies conduisant à leur écrasement. Cette compression empêche alors la diffusion des gaz et explique ainsi, de façon physique, la diminution de la consommation en oxygène mesurée dans la partie (cf. § IV.3.6.).

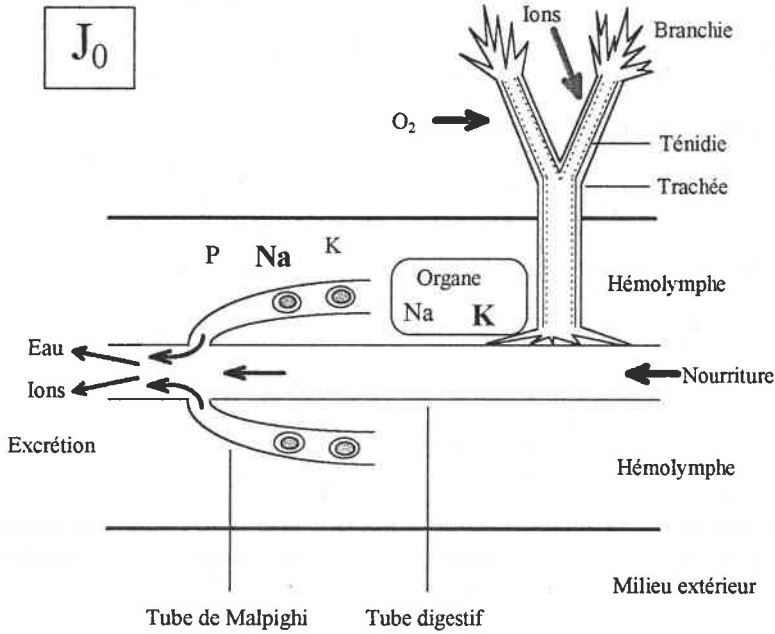
#### **IV.4. CONCLUSION PARTIELLE : SYNTHÈSE DU CHAPITRE IV**

Lorsqu'une larve de *Dinocras cephalotes* est confrontée à un milieu acidifié, son organisme doit lutter contre trois facteurs externes, un pH acide, une faible minéralisation et une concentration en aluminium élevée. La combinaison de ces trois facteurs induit des modifications dans la physiologie de l'insecte.

Les différentes études réalisées dans ce chapitre, à savoir :

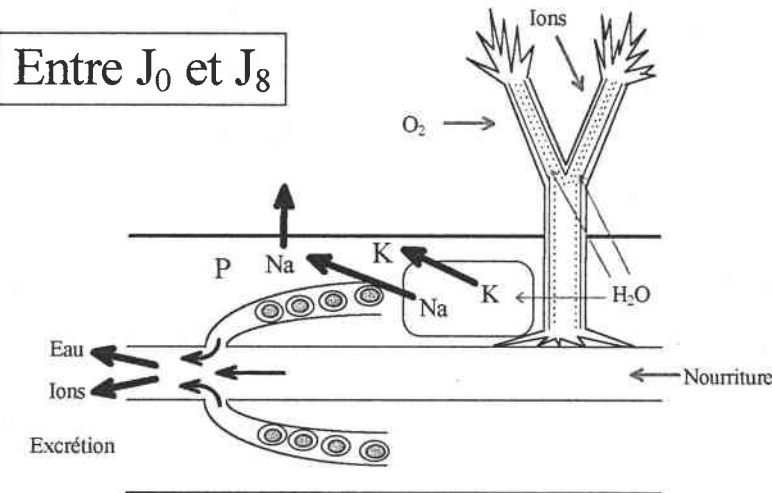
- la mortalité,
- la concentration en protéines dans l'hémolymphe,
- les concentrations en cations dans l'hémolymphe et dans l'organisme en entier,
- le pourcentage de poids sec par rapport au poids frais,
- le taux de consommation en oxygène,
- l'histologie,

permettent de suivre l'évolution des perturbations et de comprendre leur enchaînement qui aboutit, après un plus ou moins long temps d'exposition à la mort de l'individu (Figure 38)



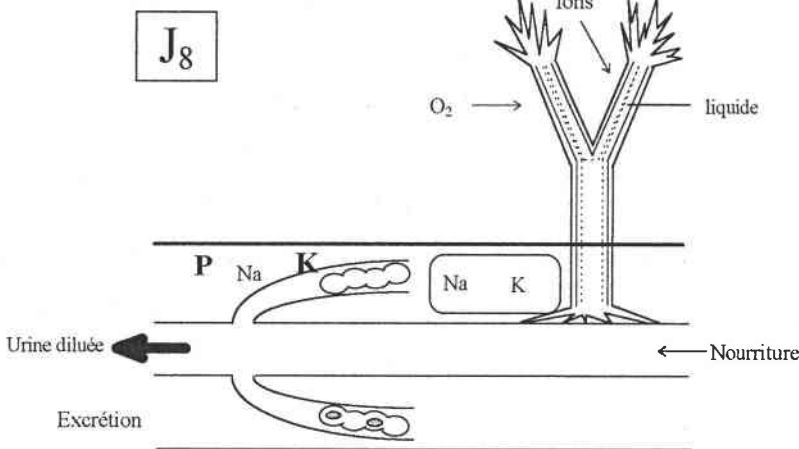
### Ce que l'on observe à J<sub>0</sub>

- \* [Na] élevée dans l'hémolymphe
- \* [K] élevée dans les organes
- \* entrée d'O<sub>2</sub> et d'ions par les branchies
- \* alimentation et excrétion normales



### Ce que l'on observe entre J<sub>0</sub> et J<sub>8</sub>

- \* Baisse de la prise de nourriture
- \* Réduction de l'entrée d'O<sub>2</sub> et d'ions
- \* Entrée d'eau dans les organes
- \* Perte de Na et K des organes vers l'hémolymphe
- \* Diminution du volume d'hémolymphe
- \* Perte de Na vers le milieu extérieur
- \* Augmentation de l'excrétion



### Ce que l'on observe à J<sub>8</sub>

- \* Faible prise de nourriture
- \* Ténidies collapsées
- \* Volume d'hémolymphe réduit :
  - [K] augmentée
  - [P] augmentée
- \* [Na] très fortement diminuée
- \* Vacuolisation dans les tubes de Malpighi
- \* Forte excrétion d'urine diluée

Figure 38 : Résumé des différents processus histologiques et physiologiques observés dans l'organisme d'une larve de *Dinocras cephalotes* lors d'une exposition à un milieu acidifié (P = protéines).



Dans un premier temps, une perte hautement significative de sodium est constatée dans le compartiment hémolympatique, puis elle se répercute dans l'organisme entier. Suite à ces pertes, une diminution de la pression osmotique de l'hémolymphe se produit. A partir d'un certain seuil, l'organisme met en place un dispositif de moyens pour lutter contre ces variations. Du potassium est libéré du compartiment intracellulaire vers l'hémolymphe qui présente une augmentation de la kaliémie. De plus si cette augmentation dans les concentrations en potassium n'est pas suffisante pour contrecarrer les pertes et comme elle demande une certaine quantité d'énergie, une diminution dans le volume d'eau composant l'hémolymphe peut également contribuer à augmenter la pression osmotique en concentrant les éléments présents tels que les protéines. En parallèle à ces problèmes de régulation ionique, des dysfonctionnements dans la respiration (donc baisse de la quantité d'énergie disponible) et dans l'excrétion sont mis en évidence.

A partir d'une certaine limite de perte ionique, donc de baisse de pression osmotique, l'insecte ne peut plus lutter de façon efficace contre la fuite d'ions à cause des perturbations des procédés physiologiques fondamentaux et de la baisse dans la quantité d'énergie disponible. La cascade de ces dérèglements finit par entraîner la mort de l'insecte.

Parmi les phénomènes mis en évidence, il est intéressant de déterminer ceux les plus appropriés pour déterminer un stress suite à une exposition en milieu acidifié et éventuellement pour établir une quantification de ce stress.

Le critère le mieux adapté doit présenter des caractéristiques telles que la facilité et la rapidité de réalisation. De plus, les résultats obtenus doivent pouvoir être exprimés par individu sans avoir à en regrouper plusieurs et surtout, ils doivent être significativement différents de ceux mesurés pour le lot de larves témoins et contrôles.

Les différents paramètres suivis dans cette expérience ne sont pas toujours adaptés pour une évaluation qualitative de stress : l'étude histologique est longue à réaliser et difficile à interpréter ; la respirométrie nécessite de regrouper les individus par lot de deux pour avoir une consommation en oxygène suffisamment élevée pour pouvoir être mesurée ; le pourcentage de poids frais par rapport au poids sec demande un trop grand nombre d'individus pour obtenir des résultats significatifs.

La concentration en protéines dans l'hémolymphe donne des résultats significatifs mettant bien en évidence un stress suite à une exposition à un milieu acidifié. Toutefois, pour mesurer ces concentrations, plusieurs dilutions de l'hémolymphe initialement prélevée doivent être réalisées avec des risques d'erreur.

Les concentrations en cations peuvent être intéressantes pour quantifier un stress, notamment celles déterminées dans l'hémolymphe car une unique manipulation est réalisée sur l'hémolymphe prélevée (dilution du volume prélevé dans 5 ml d'eau nanopure). Les mesures sont aisément réalisées

en spectrophotométrie d'absorption atomique et surtout, elles le sont dans l'heure suivant le prélèvement. Toutefois, selon les résultats présentés dans cette expérience, le calcium et le magnésium présentent trop de variations interindividuelles pour pouvoir être retenus. Le potassium donne des résultats significatifs, mais, il est présent en faible concentration dans l'hémolymphe. Des quatre éléments mesurés dans le compartiment extra-cellulaire, le sodium apparaît donc être l'élément le plus fiable et le plus reproductible pour mettre en évidence un stress induit par une exposition dans un milieu acidifié. Les raisons de ce choix sont :

- une présence en forte concentration dans l'hémolymphe,
- une faible différence interindividuelle (surtout à  $J_0$ ),
- une diminution significative des concentrations en sodium mesurées pour les larves exposées à un milieu acidifié,
- l'absence de variation dans les teneurs en sodium hémolympatique mesurées dans les lots de larves témoins et ceux exposées au milieu contrôle, ce qui signifie que seuls les insectes stressés présentent des variations significatives pour cet élément.

# CHAPITRE V. : EFFETS RESPECTIFS OU COMBINES DU pH, DE LA MINERALISATION ET DE LA CONCENTRATION EN ALUMINIUM D'UN MILIEU SUR LES CONCENTRATIONS IONIQUES DE L'HEMOLYMPHE DE *DINOCRAS CEPHALOTES*

## V.1. INTRODUCTION

Lors d'une exposition à un environnement acidifié, que ce soit sur le terrain ou en laboratoire, les larves de *Dinocras cephalotes* montrent un dérèglement de la régulation ionique accompagnée d'une forte mortalité. Les causes à l'origine de ces perturbations sont difficiles à estimer. En effet, un milieu acidifié tel que celui des ruisseaux vosgiens correspond à la combinaison de trois facteurs spécifiques principaux, un pH acide, une faible minéralisation et une forte concentration en aluminium dans l'eau. Il n'est donc pas possible de déterminer *in situ* le rôle respectif de chacun de ces facteurs ainsi que leurs interactions dans les effets observés.

Pour répondre à cette question, une série d'expérience dont les principes sont similaires est réalisée en laboratoire avec des milieux créés artificiellement. Ces derniers permettent de mettre en évidence, selon la combinaison de pH, de minéralisation et de concentration en aluminium qui les composent, les effets d'un facteur ou d'une combinaison de facteurs.

La mise au point de la composition et du suivi des milieux, ainsi que la maîtrise des différents paramètres physico-chimiques ont nécessité plusieurs expériences avec un nombre de milieu croissant par expérience. De ce fait, un même milieu s'est trouvé testé plusieurs fois. Afin d'éviter une redondance dans la présentation des résultats, seule la dernière expérience de la série est présentée, car elle réunit, en une seule manipulation, toutes les combinaisons réalisables en combinant les trois paramètres. Les milieux décrits dans l'expérience précédente sont à nouveau testés. Il s'agit du milieu contrôle et du milieu acidifié.

L'expérience décrite dans le chapitre IV a montré que la baisse de la concentration en sodium dans l'hémolymphe est un bon indicateur de stress pour les larves exposées au milieu acidifié. Ce paramètre, ainsi que celui de la mortalité, sont les critères choisis pour évaluer les éventuels effets des différents milieux testés sur les larves de *Dinocras cephalotes*. De même que lors de l'étude de terrain (cf. chapitre III), la concentration en chlorures dans l'hémolymphe est également mesurée, afin de déterminer si son évolution pendant cette expérience en laboratoire présente les mêmes avantages pour évaluer un stress lié à l'acidification que celle des ions sodium.

## V.2. PROTOCOLE EXPERIMENTAL

Les détails sur la composition et la préparation des différents milieux, ainsi que les techniques analytiques employées dans cette expérience sont présentés dans le chapitre II (matériel et méthodes).

### V.2.1. Milieux expérimentaux

Dans cette expérience, les milieux testés représentent les combinaisons réalisables avec les trois paramètres pH, minéralisation et concentration en aluminium. Chaque paramètre étant représenté par deux niveaux, huit combinaisons sont constituées (Tableau XXV).

Tableau XXV : Liste des huit combinaisons réalisées avec les trois paramètres : composition nominale et code correspondant.

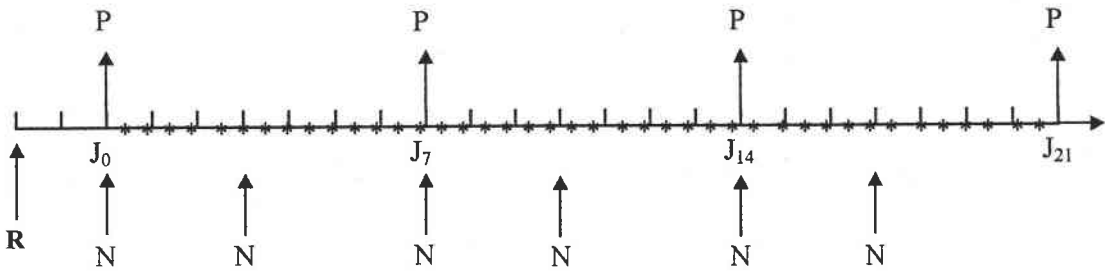
Type de milieu	pH	Minéralisation (mg.l <sup>-1</sup> )	Aluminium (mg.l <sup>-1</sup> )	Code
Milieu contrôle	6.6	82	0.01	6.6M
Milieu à concentration élevée en aluminium	6.6	82	0.54	6.6MAI
Milieu acide	4.6	82	0.01	4.6M
Milieu acide et riche en aluminium	4.6	82	0.54	4.6MAI
Milieu faiblement minéralisé	6.6	25	0.01	6.6PM
Milieu faiblement minéralisé et à concentration en aluminium élevée	6.6	25	0.54	6.6PMAI
Milieu à pH acide et à faible minéralisation	4.6	25	0.01	4.6PM
Milieu à pH acide, à faible minéralisation et à concentration en aluminium élevée	4.6	25	0.54	4.6PMAI

Tous ces milieux ne correspondent pas toujours à des situations observables *in situ* dans le secteur étudié. Toutefois, ils sont expérimentalement fondés pour mettre en évidence les effets éventuels de chacun des paramètres et de leurs différentes combinaisons. Quoi qu'il en soit, les niveaux étudiés pour chacun de ces trois facteurs sont pertinents avec des données recueillies sur le terrain.

Le milieu 4.6PMAI représente le milieu acidifié, car il réunit les trois facteurs caractéristiques de la physico-chimie d'un cours d'eau acidifié dans l'aire géographique prospectée.

### V.2.2. Protocole de prélèvement

La figure 39 résume le protocole de l'expérience.



R : Récolte des larves

P : Prélèvement d'hémolymphe

N : Nutrition de *Dinocras cephalotes* avec des larves vivantes de Chironomidés

\* : Renouvellement total de chaque milieu.

Figure 39 : Déroulement de l'expérience

Afin de réaliser cette expérience, 220 larves sont prélevées dans le ruisseau "la Plaine". Après deux jours d'acclimatation, 6 larves sont prises afin de prélever leur hémolymphe et de déterminer les concentrations initiales en chlorures et en sodium. Le reste des larves collectées est réparti par lot de 25 individus dans chacun des milieux expérimentaux. Tous les 7 jours, 6 larves sont prélevées dans chaque bac pour l'étude de l'hémolymphe. La durée de l'expérience est de 21 jours. Dans certains lots, les larves restant en fin d'expérience ont été remises dans leur cours d'eau d'origine.

### V.2.3. Traitements statistiques

Une analyse de variance est effectuée pour comparer les concentrations moyennes en chlorures et en sodium mesurées chaque semaine pendant les 21 jours d'expérience dans les lots de larves exposées aux huit milieux différents. Le seuil de significativité retenu pour cette étude est de 0.05. Lorsqu'une différence significative est établie dans une série, un test complémentaire de Tuckey HSD pour échantillon à nombres différents est réalisé. Il permet de préciser les échantillons présentant des différences significatives.

## V.3. RESULTATS

### V.3.1. Milieux d'exposition

La composition moyenne des différents milieux pendant les 21 jours d'expérience est donnée par le tableau XXVI.

Tableau XXVI : Composition physico-chimique moyenne mesurée dans les différents milieux pendant les 21 jours d'expérience (moyenne  $\pm$  écart-type ;  
n = nombre de mesures).

		6.6M	6.6MAI	4.6M	4.6MAI	6.6PM	6.6PMAI	4.6PM	4.6PMAI
pH		6.6 $\pm$ 0.04 n = 80	6.58 $\pm$ 0.05 n = 82	4.66 $\pm$ 0.15 n = 82	4.65 $\pm$ 0.12 n = 82	6.6 $\pm$ 0.06 n = 82	6.59 $\pm$ 0.04 n = 55	4.68 $\pm$ 0.15 n = 54	4.67 $\pm$ 0.14 n = 54
Conductivité	$\mu\text{s.cm}^{-1}$	86.4 $\pm$ 3.7 n = 76	87.4 $\pm$ 4.5 n = 79	86 $\pm$ 3.6 n = 78	86.6 $\pm$ 3.5 n = 78	16.8 $\pm$ 1.8 n = 77	20.6 $\pm$ 2.2 n = 53	18.3 $\pm$ 1.9 n = 51	20.9 $\pm$ 1.1 n = 51
Minéralisation calculée	$\text{mg.l}^{-1}$	81.9 $\pm$ 3.5 n = 76	82.8 $\pm$ 4.3 n = 79	81.5 $\pm$ 3.4 n = 78	82.1 $\pm$ 3.3 n = 78	22.9 $\pm$ 2.5 n = 77	28.1 $\pm$ 3.0 n = 53	25.0 $\pm$ 2.6 n = 51	28.5 $\pm$ 1.5 n = 51
Aluminium	$\text{mg.l}^{-1}$	0.010 $\pm$ 0.003 n = 14	0.410 $\pm$ 0.140 n = 13	0.010 $\pm$ 0.006 n = 14	0.440 $\pm$ 0.070 n = 13	0.010 $\pm$ 0.003 n = 14	0.420 $\pm$ 0.010 n = 7	0.01 $\pm$ 0.004 n = 8	0.430 $\pm$ 0.050 n = 8
Calcium	$\text{mg.l}^{-1}$	5.0 $\pm$ 0.3 n = 14	4.7 $\pm$ 0.3 n = 13	4.6 $\pm$ 0.3 n = 13	4.5 $\pm$ 0.4 n = 14	0.7 $\pm$ 0.2 n = 14	0.6 $\pm$ 0.1 n = 8	0.8 $\pm$ 0.1 n = 8	0.7 $\pm$ 0.1 n = 8
Sodium	$\text{mg.l}^{-1}$	6.3 $\pm$ 0.3 n = 13	6.0 $\pm$ 0.5 n = 14	5.6 $\pm$ 0.4 n = 14	5.5 $\pm$ 0.4 n = 13	1.0 $\pm$ 0.1 n = 14	0.8 $\pm$ 0.1 n = 8	0.9 $\pm$ 0.3 n = 8	0.9 $\pm$ 0.3 n = 8
Potassium	$\text{mg.l}^{-1}$	3.3 $\pm$ 0.4 n = 14	4.9 $\pm$ 0.3 n = 14	1.6 $\pm$ 0.2 n = 14	1.6 $\pm$ 0.4 n = 14	1.6 $\pm$ 0.4 n = 14	3.8 $\pm$ 0.4 n = 8	0.3 $\pm$ 0.2 n = 8	0.3 $\pm$ 0.2 n = 8
Magnésium	$\text{mg.l}^{-1}$	2.1 $\pm$ 0.2 n = 13	2.0 $\pm$ 0.2 n = 14	2.0 $\pm$ 0.1 n = 14	2.0 $\pm$ 0.1 n = 14	0.2 $\pm$ 0.02 n = 14	0.2 $\pm$ 0.03 n = 8	0.2 $\pm$ 0.04 n = 8	0.2 $\pm$ 0.03 n = 8
Chlorures	$\text{mg.l}^{-1}$	8.9 $\pm$ 0.9 n = 13	8.3 $\pm$ 0.6 n = 13	8.2 $\pm$ 1.0 n = 14	8.0 $\pm$ 0.7 n = 12	1.2 $\pm$ 0.2 n = 14	0.8 $\pm$ 0.1 n = 8	1.1 $\pm$ 0.4 n = 8	1.2 $\pm$ 0.5 n = 8
Nitrates	$\text{mg.l}^{-1}$	6.3 $\pm$ 0.6 n = 13	9.1 $\pm$ 0.3 n = 13	7.9 $\pm$ 0.8 n = 14	10.4 $\pm$ 0.6 n = 13	1.0 $\pm$ 0.2 n = 14	4.3 $\pm$ 0.3 n = 8	3.0 $\pm$ 0.8 n = 8	5.8 $\pm$ 0.6 n = 8
Sulfates	$\text{mg.l}^{-1}$	15.5 $\pm$ 1.3 n = 13	14.7 $\pm$ 0.8 n = 13	14.9 $\pm$ 1.3 n = 14	14.3 $\pm$ 0.8 n = 13	2.2 $\pm$ 0.2 n = 14	1.6 $\pm$ 0.4 n = 8	1.9 $\pm$ 0.4 n = 8	1.8 $\pm$ 0.3 n = 8
Alcalinité	$\text{meq.l}^{-1}$	0.07 $\pm$ 0.02 n = 6	0.07 $\pm$ 0.02 n = 6	-0.02 $\pm$ 0.01 n = 6	-0.03 $\pm$ 0.01 n = 6	0.04 $\pm$ 0.01 n = 6	0.05 $\pm$ 0.01 n = 5	-0.02 $\pm$ 0.01 n = 5	-0.04 $\pm$ 0.01 n = 5

Les paramètres physico-chimiques présentent de faibles coefficients de variation, suite au renouvellement total de chaque milieu deux fois par jour pendant les 21 jours d'expérience. De plus, toutes les concentrations mesurées correspondent aux concentrations nominales.

Seules les concentrations en aluminium ( $0.42 \text{ mg.l}^{-1}$  en moyenne) sont plus faibles que celles initialement prévues ( $0.54 \text{ mg.l}^{-1}$ ). Elles sont toutefois suffisamment élevées pour être caractéristiques d'un milieu acidifié. De plus, elles ne sont pas significativement différentes dans les quatre milieux concernés (6.6MAI, 6.6PMAl, 4.6MAL et 4.6PMAL).

Les concentrations en potassium sont plus élevées dans les milieux à pH 6.6 que dans ceux à pH 4.6 en raison de l'ajout d'hydroxyde de potassium pour ajuster la solution de départ à ce pH.

## V.3.2. Effets sur *Dinocras cephalotes*

### V.3.2.1. Mue

Un nombre peu élevé de mue est observé dans les lots de larves exposés aux différents milieux pendant toute la durée de l'expérience. Il n'apparaît pas de différences entre les huit milieux.

### V.3.2.2. Mortalité

La mortalité (Figure 40) s'exprime de façon différente selon le milieu considéré. Elle est plus faible dans les milieux minéralisés (6.6M, 6.6MAI, 4.6M, 4.6MAI) que dans les milieux faiblement minéralisés (6.6PM, 6.6PMAl, 4.6PM, 4.6PMAl).

Dans les milieux minéralisés la mortalité maximale, due aux conditions d'exposition, observée est de quatre individus. Toutefois, dans le milieu 4.6MAI, huit larves supplémentaires sont mortes accidentellement pendant l'expérience. En effet, suite à un changement d'eau dans ce milieu, le cadre en plastique qui protégeait l'embout d'aspiration s'est détaché et ces huit larves ont été broyées par la pompe.

Dans les milieux faiblement minéralisés, des différences apparaissent entre les milieux selon le pH et la concentration associée en aluminium. Dans le milieu 6.6PM, huit larves sont mortes pendant la première semaine d'exposition.

Lorsque de l'aluminium est ajouté au milieu (6.6PMAl), 11 larves sont mortes entre le premier et le 11<sup>ème</sup> jour de l'expérience. L'aluminium a entraîné une légère augmentation de la mortalité s'étalant sur un plus grand nombre de jours.

La plus forte mortalité apparaît dans les lots de larves exposés aux milieux acides et faiblement minéralisés sans ou avec aluminium (4.6PM, 4.6PMAL). Dans le milieu 4.6PM, quatorze larves sont trouvées mortes entre le 6<sup>ème</sup> et le 11<sup>ème</sup> jour de l'expérience. L'ajout d'aluminium à la précédente combinaison (4.6PMAl) entraîne une mortalité plus élevée (16 larves) et plus rapide que celle observée dans tous les autres milieux.

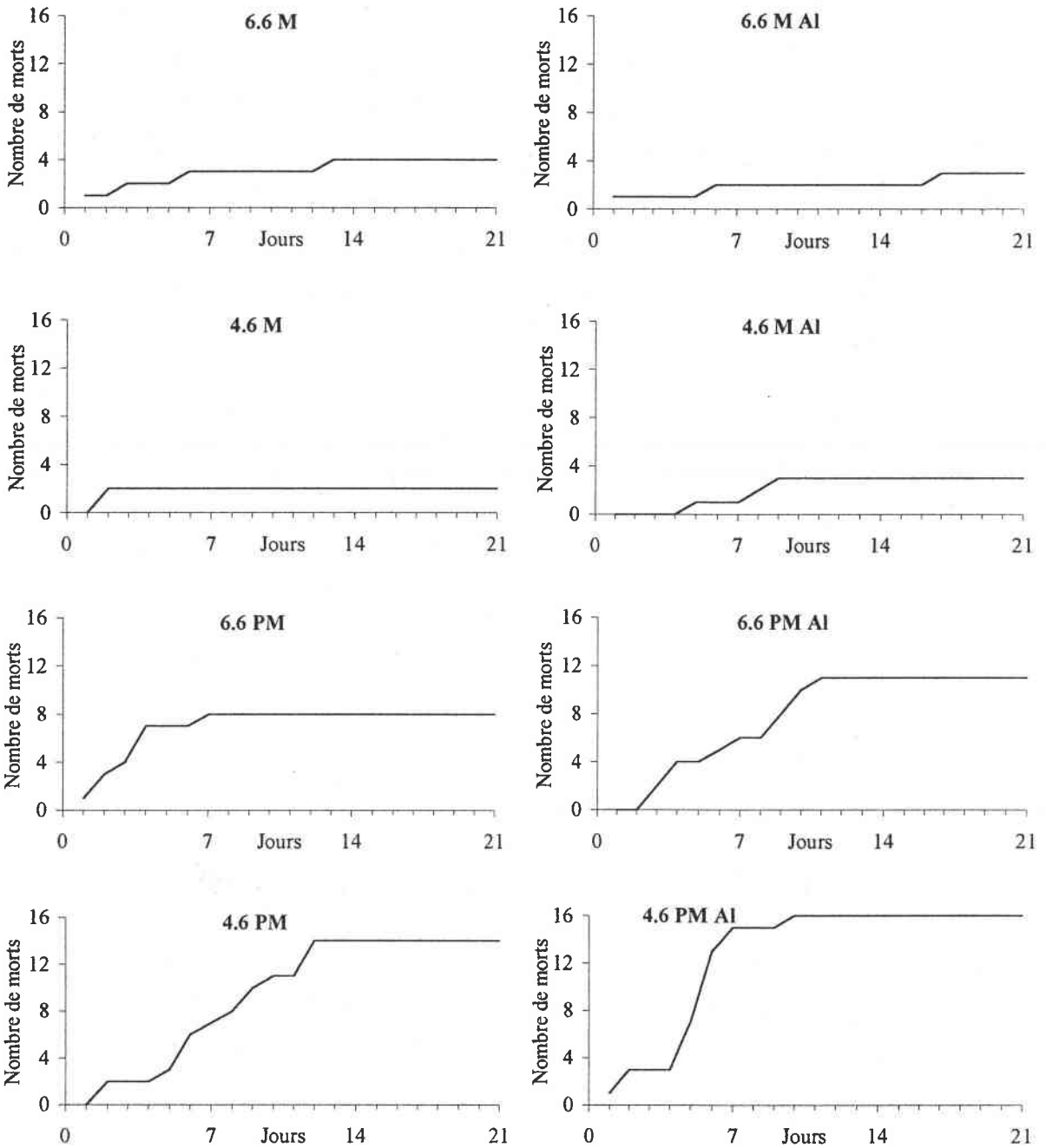


Figure 40 : Mortalité cumulée observée dans les différents milieux d'exposition pendant les 21 jours d'expérience.

### V.3.2.3. Effets des différents facteurs et de leurs combinaisons sur les concentrations en chlorures et en sodium dans l'hémolymphe

Les concentrations initiales mesurées dans l'hémolymphe des larves du lot témoin ( $J_0$ ) sont de 99.5 mmol. $l^{-1}$  pour les chlorures et de 99.8 mmol. $l^{-1}$  pour le sodium.



### V.3.2.3.1. Effets de l'exposition au milieu contrôlé pendant 21 jours

Les concentrations moyennes en chlorures mesurées dans l'hémolymphe des larves exposées au milieu contrôlé ne varient pas significativement pendant les 21 jours d'expérience. A la fin du traitement, les teneurs en cet ion ne sont pas significativement différentes ( $p < 0.05$ ) de celles déterminées pour le lot de larves témoin (Figure 41 a).

Cette constatation s'applique également aux concentrations en sodium (Figure 41 b). Aucune variation significative ( $p < 0.05$ ) n'est mesurée pendant les 21 jours d'exposition au milieu contrôlé.

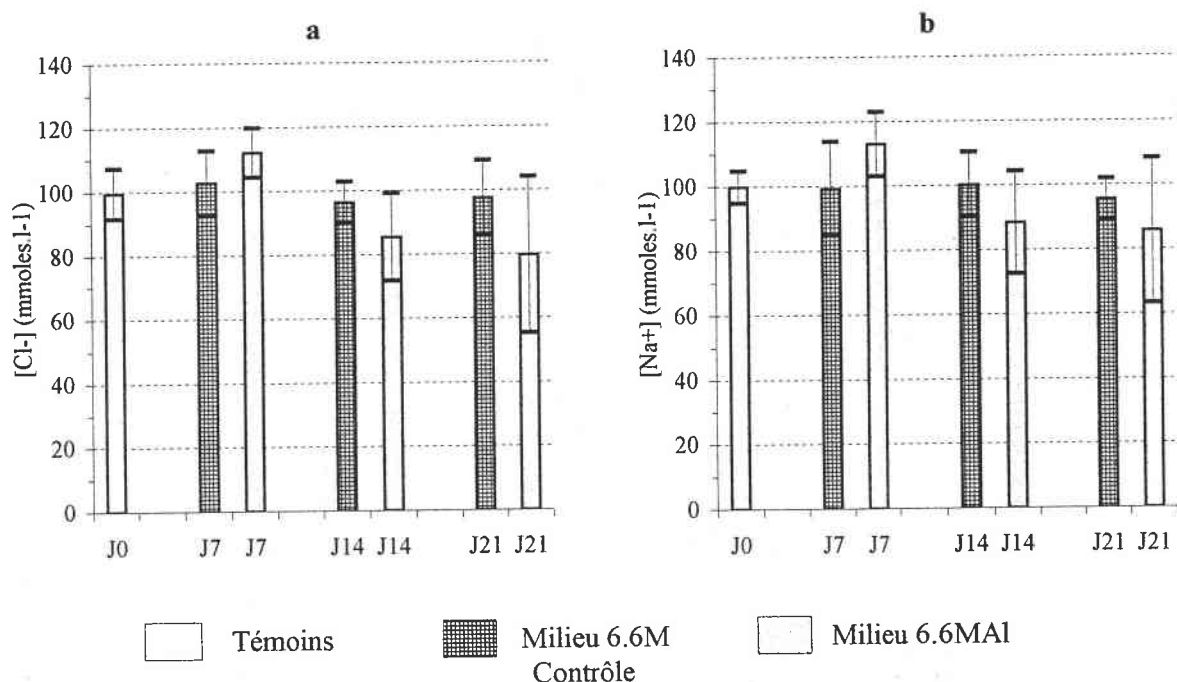


Figure 41 : Concentrations en chlorures (a) et sodium (b) mesurées à J<sub>0</sub>, J<sub>7</sub>, J<sub>14</sub> et J<sub>21</sub> dans l'hémolymphe des larves exposées aux milieux contrôlé (6.6M) et enrichi en aluminium (6.6MAI). Les barres verticales représentent l'écart-type sur la moyenne des mesures.

### V.3.2.3.2. Effets de l'aluminium

Afin de mettre en évidence les effets de l'aluminium sur les concentrations hémolympatiques en chlorures et en sodium de *Dinocras cephalotes*, des larves sont exposées à un milieu ayant une forte concentration en aluminium (6.6MAI), mais, dont les autres caractéristiques physico-chimiques sont similaires à celle du milieu contrôlé. Ainsi, les éventuelles variations mesurées dans les concentrations ioniques sont dues à l'aluminium puisque les autres facteurs du milieu (pH 6.6 et minéralisation) sont sans effets (cf. § V.3.2.3.1.).

La concentration moyenne en chlorures dans l'hémolymphe des larves exposées pendant une semaine au milieu 6.6MAI est plus élevée que celle mesurée pour le lot témoin (Figure 41 a). Cette augmentation, de 10 %, n'est toutefois pas significative ( $p < 0.05$ ) (Figures 48 et 49).

Après deux semaines d'exposition, la concentration en chlorures a diminué significativement par rapport à celle mesurée la semaine précédente. Cependant, la teneur moyenne mesurée n'est pas significativement différente ( $p < 0.05$ ) de celles établies pour les larves témoin et celles exposées au milieu contrôle pendant un temps similaire ( $J_{14}$ ).

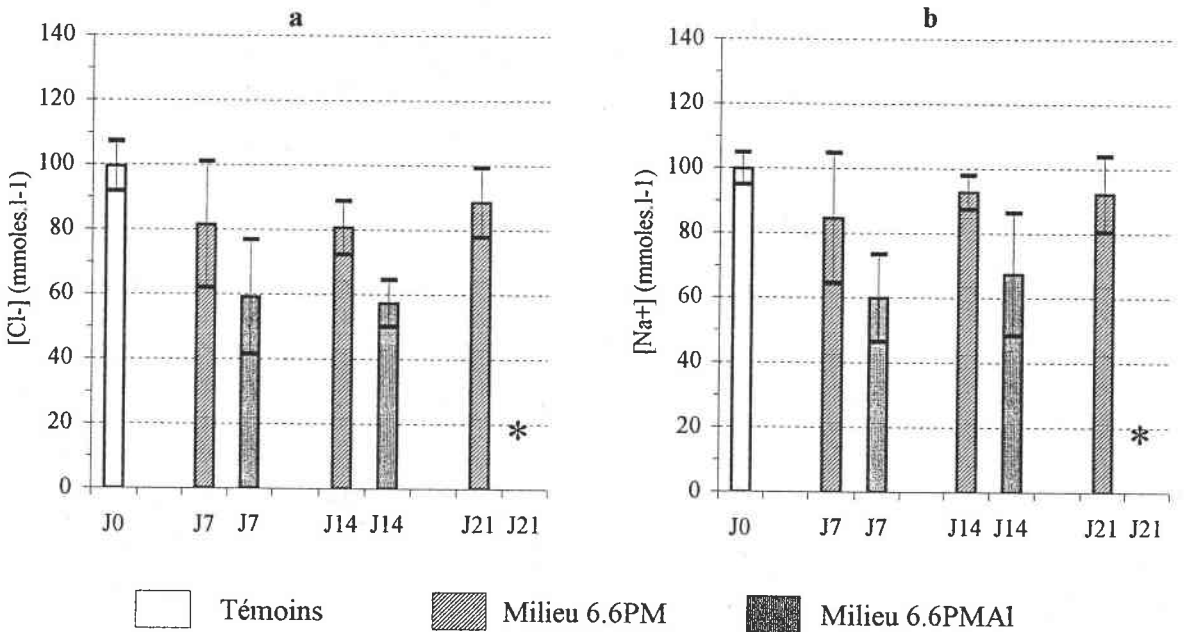
La concentration mesurée le 21<sup>ème</sup> jour est plus faible que celle de la semaine précédente. Cependant, aucune différence significative au seuil de 0.05 n'est établie avec celles du lot témoin et du lot exposé dans le milieu contrôle pendant 21 jours.

Les remarques faites pour les concentrations en chlorures mesurées pendant les 21 jours d'expérience s'appliquent également à celles en sodium (Figure 41 b).

L'aluminium seul semble provoquer des variations dans les concentrations ioniques des larves, mais, ces dernières ne sont pas significatives ( $p < 0.05$ ). Son effet peu marqué peut être lié à la minéralisation de l'eau qui est élevée dans le milieu 6.6MAI (cf. § V.3.2.3.3.).

#### V.3.2.3.3. Effets de l'aluminium et de la faible minéralisation combinés dans un même milieu

Les effets de l'aluminium dans un milieu peu minéralisé sont mis en évidence par la comparaison des résultats obtenus pour le lot de larves exposé au milieu faiblement minéralisé sans aluminium (6.6PM) et faiblement minéralisé avec aluminium (6.6PMAI) (Figures 42 a et b).



\* : aucune mesure n'a été réalisée en raison de la forte mortalité survenue dans ce lot.

Figure 42 : Concentrations en chlorures (a) et sodium (b) mesurées à  $J_0$ ,  $J_7$ ,  $J_{14}$  et  $J_{21}$  dans l'hémolymphe des larves exposées aux milieux faiblement minéralisés sans aluminium (6.6PM) et avec aluminium (6.6PMAI). Les barres verticales représentent l'écart-type sur la moyenne des mesures.

Après une semaine d'exposition ( $J_7$ ) dans le milieu 6.6PMAl, les concentrations moyennes en chlorures et en sodium mesurées dans l'hémolymphe des larves ont diminué significativement de 40 % ( $p < 0.05$ ) (Figures 48 et 49) par rapport aux concentrations établies pour les larves du lot témoin. Cependant, les concentrations atteintes ne sont pas significativement différentes de celles mesurées dans l'hémolymphe des larves exposées au milieu faiblement minéralisé sans aluminium (6.6PM).

Les concentrations moyennes obtenues après deux semaines d'exposition ( $J_{14}$ ) ne varient pas significativement de celles déterminées la semaine précédente dans ce même milieu 6.6PMAl. Elles sont toujours significativement plus faibles que celles déterminées initialement et ne sont pas significativement différentes ( $p < 0.05$ ) de celles mesurées dans le lot de larves exposées 14 jours dans le milieu faiblement minéralisé sans aluminium (6.6PM).

Aucune mesure n'a pu être faite pour le lot exposé au milieu 6.6PMAl le 21<sup>ème</sup> jour de l'expérience, car il ne reste aucune larve survivante.

Lorsque l'aluminium est en concentration élevée dans une solution faiblement minéralisée (6.6PMAl), la perte ionique observée dans l'hémolymphe est en général significativement plus élevée ( $p < 0.05$ ) que celle mesurée pour les larves soumises également à une forte concentration d'aluminium, mais, dans une solution minéralisée (6.6MAI). La toxicité de l'aluminium s'exprime donc plus lorsque le milieu le contenant est faiblement minéralisé.

Cependant, la comparaison entre les résultats obtenus pour les larves exposées aux milieux faiblement minéralisés sans (6.6PM) et avec aluminium (6.6PMAl) ne révèle aucune différence significative ( $p < 0.05$ ). La faible minéralisation semble donc avoir un effet propre dans la combinaison aluminium - faible minéralisation.

#### V.3.2.3.4. Effets de la faible minéralisation d'un milieu

L'analyse de variance des concentrations moyennes en chlorures et en sodium déterminées à  $J_0$  et après 7, 14 et 21 jours d'exposition dans un milieu faiblement minéralisé (6.6PM) ne montre aucune variation significative. Cependant, les teneurs mesurées pendant toute la durée de l'expérience sont plus faibles que les concentrations initiales, notamment pour les chlorures, les deux premières semaines et le sodium, la première semaine (Figure 43).

La faible minéralisation semble donc provoquer une légère baisse dans les concentrations ioniques, cette dernière n'étant cependant pas significative ( $p < 0.05$ ). Cette conclusion est la même que pour l'aluminium. Ainsi, chacun de ces deux facteurs faible minéralisation (6.6PM) - forte concentration en aluminium (6.6MAI) pris séparément ne provoque pas d'effets marqués sur les concentrations ioniques, alors que leur combinaison (6.6PMAl) provoque une diminution significative ( $p < 0.05$ ).

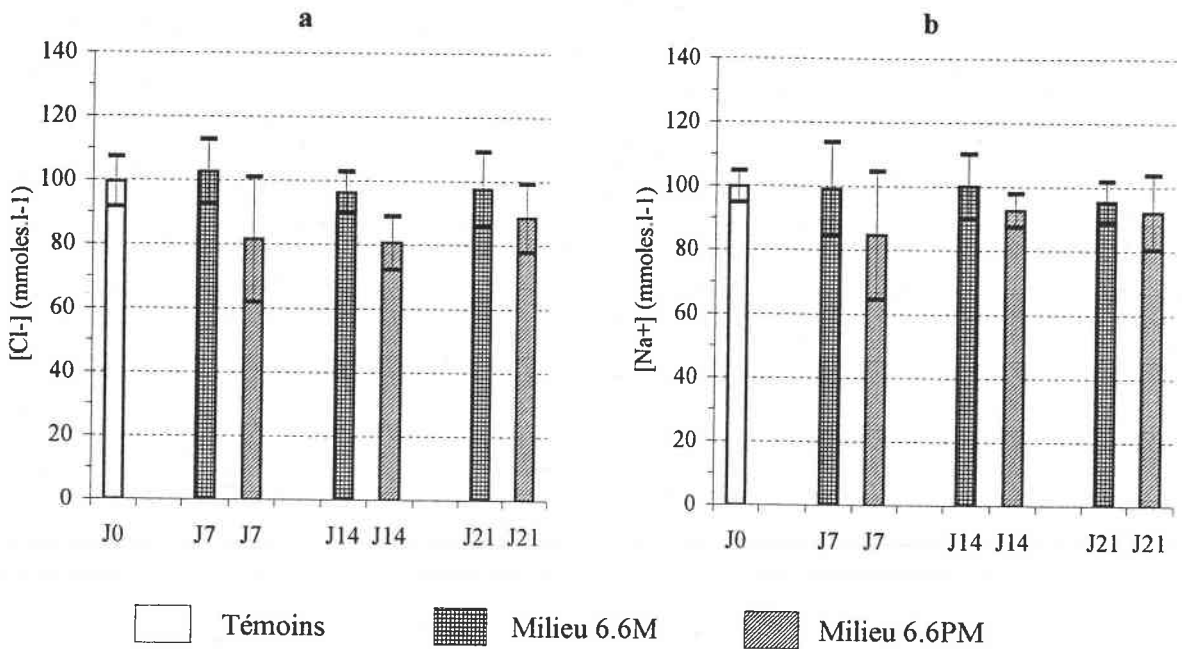


Figure 43 : Concentrations en chlorures (a) et en sodium (b) mesurées à J<sub>0</sub>, J<sub>7</sub>, J<sub>14</sub> et J<sub>21</sub> dans l'hémolymphe des larves exposées aux milieux contrôle (6.6M) et faiblement minéralisé (6.6PM). Les barres verticales représentent l'écart-type sur la moyenne des mesures.

#### V.3.2.3.5. Effets dus aux conditions observables *in situ*

Dans la partie précédente (cf. § V.3.2.3.3.), les effets de la combinaison des deux facteurs faible minéralisation et concentration en aluminium élevée sont mis en évidence par le milieu les réunissant, 6.6PMAI. Or, ce dernier ne représente pas une situation observable sur le terrain. En effet, la combinaison faible minéralisation et concentration en aluminium élevée est généralement associée à un pH acide. Ainsi, le milieu acidifié 4.6PMAI créé au laboratoire représente la situation *in situ*.

La figure 44 (a et b) présentent les résultats obtenus pour les larves exposées au milieu combinant une faible minéralisation et une concentration en aluminium élevée (6.6PMAI) et à celui similaire à la situation *in situ* (4.6PMAI).

Après une semaine d'expérience, les concentrations en chlorures et sodium mesurées dans l'hémolymphe des larves exposées aux deux milieux sont significativement inférieures à celles mesurées sur le lot témoin ( $p < 0.05$ ). Les pertes en chlorures et en sodium pour les larves exposées au milieu 6.6PMAI atteignent 40 % pour les deux ions, tandis que pour celles exposées au milieu 4.6PMAI, elles sont respectivement de 60 et 70 % (Figures 48 et 49).

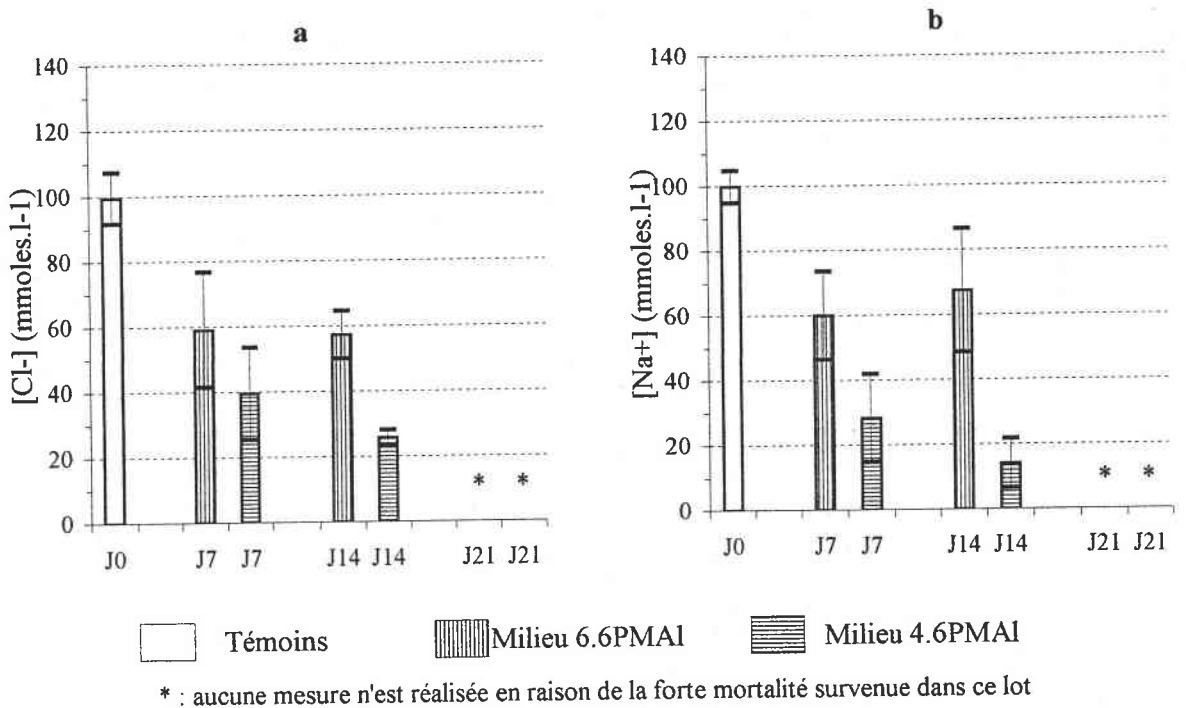


Figure 44 : Concentrations en chlorures (a) et en sodium (b) mesurées à J<sub>0</sub>, J<sub>7</sub>, J<sub>14</sub> et J<sub>21</sub> dans l'hémolymphe des larves exposées aux milieux faiblement minéralisés riches en aluminium (6.6PMAI) et acidifié (4.6PMAI). Les barres verticales représentent l'écart-type sur la moyenne des mesures.

Le niveau de perte en chlorures et en sodium estimé la première semaine dans l'hémolymphe des larves exposées au milieu 6.6PMAI n'a pas varié le 14<sup>ème</sup> jour de l'expérience. A l'opposé, celui des larves soumises au milieu 4.6PMAI est plus élevé, notamment pour le sodium.

Le 21<sup>ème</sup> jour de l'expérience, il ne reste aucune larve survivante dans les deux milieux.

Un pH acide amplifie les effets provoqués par la combinaison des deux facteurs faible minéralisation et forte concentration en aluminium.

#### V.3.2.3.6. Effets du pH acide d'un milieu

L'observation des résultats obtenus pour les larves exposées au milieu acidifié 4.6PMAI a montré qu'un pH acide ajouté à la combinaison faible minéralisation et forte concentration en aluminium entraîne une perte ionique plus importante. Afin de déterminer les effets dus à la seule forte concentration en protons, les résultats obtenus pour les lots de larves exposées aux deux milieux de minéralisation similaire, sans aluminium, mais de pH différents (6.6M, milieu contrôle ; 4.6M, milieu acide) sont comparés.

Les concentrations en chlorures et en sodium mesurées dans l'hémolymphe des larves exposées au milieu acide (4.6M) sont significativement inférieures ( $p < 0.05$ ) à celles du lot exposé au milieu contrôle pendant 7 jours (Figures 45 a et b). Les pertes mesurées par rapport à  $J_0$  sont de 37 et 34 %, respectivement pour les chlorures et le sodium (Figures 48 et 49).

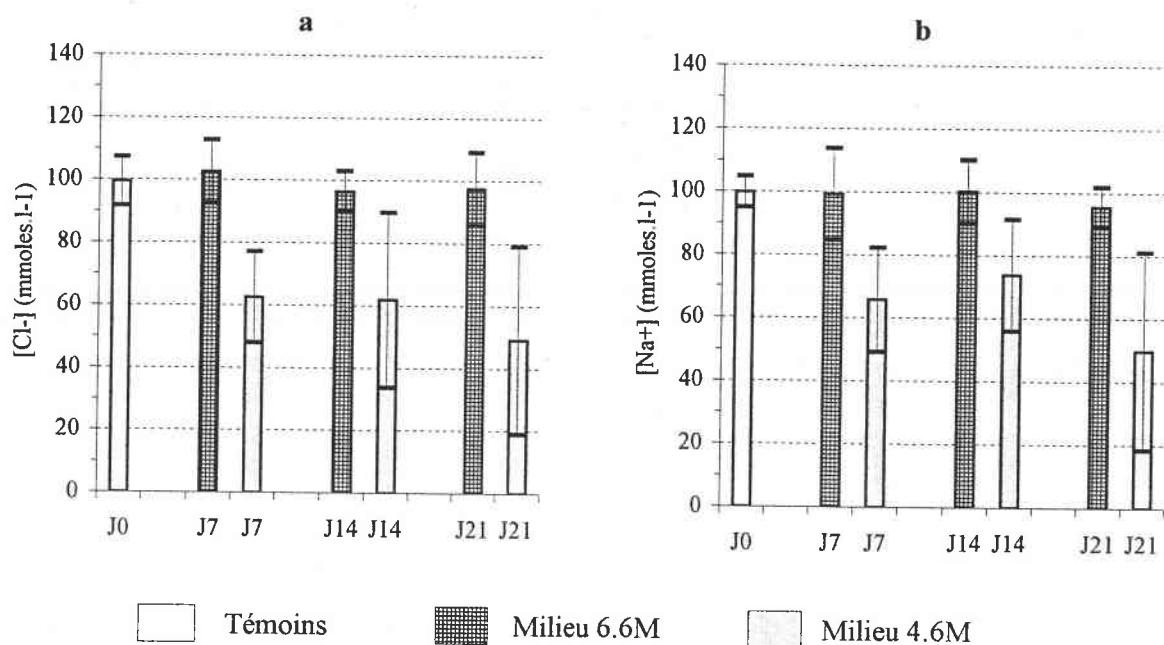


Figure 45 : Concentrations en chlorures (a) et sodium (b) mesurées à  $J_0$ ,  $J_7$ ,  $J_{14}$  et  $J_{21}$  dans l'hémolymphe des larves exposées aux milieux contrôle (6.6M) et acide (4.6M). Les barres verticales représentent l'écart-type sur la moyenne des mesures.

Le 14<sup>ème</sup> jour, alors que la concentration moyenne en chlorures ne varie pas par rapport à la précédente mesure, celle en sodium a augmenté et n'est plus significativement différente ( $p < 0.05$ ) de celles mesurées pour le lot témoin et le lot exposé au milieu contrôle pendant la même durée (14 jours).

Le maintien des concentrations en chlorures et l'amélioration des concentrations en sodium observés à  $J_{14}$  ne se poursuivent pas. En effet, les mesures réalisées le 21<sup>ème</sup> jour montrent que les pertes en ces deux ions se sont aggravées et atteignent des niveaux de 50 % par rapport aux valeurs des concentrations initiales.

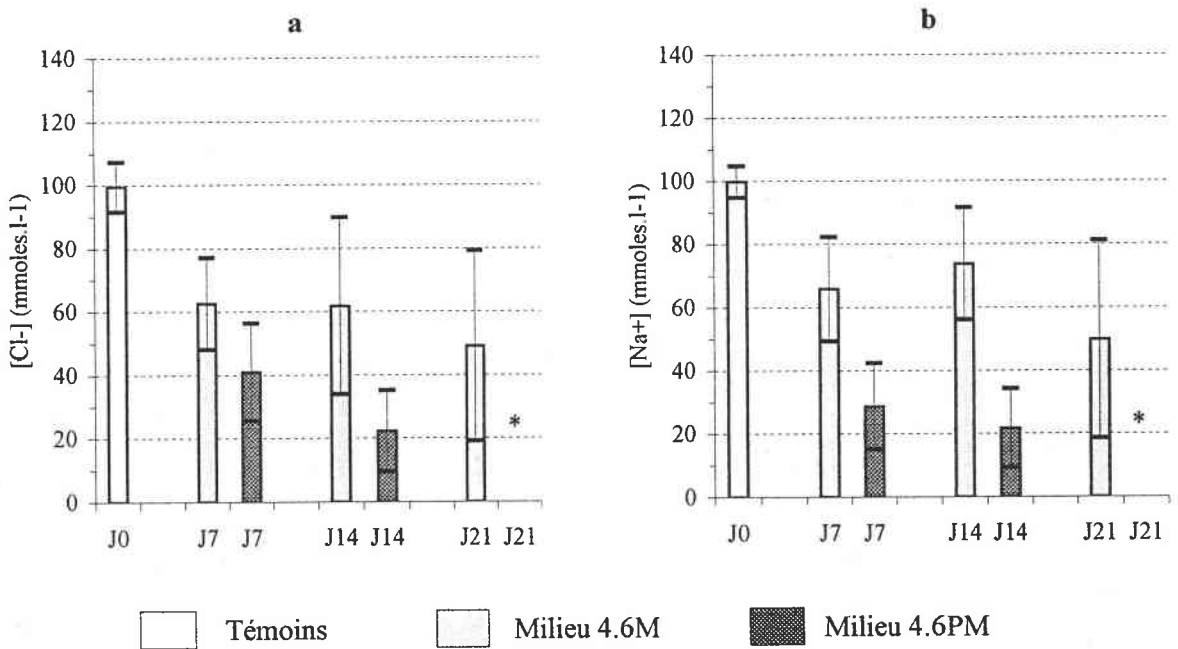
Une forte concentration en protons provoque des pertes en ions chlorures et sodium très significatives ( $p < 0.05$ ) dans l'hémolymphe des larves exposées pendant 21 jours à ce facteur.

### V.3.2.3.7. Effets de la combinaison pH acide et faible minéralisation dans un milieu

Un pH acide seul entraîne une perte ionique en sodium et en chlorures allant jusqu'à 50% par rapport aux concentrations initiales après 21 jours d'exposition. Nous avons vu que lorsque ce facteur est combiné avec une faible minéralisation et une forte concentration en aluminium, les pertes alors observées sont supérieures à 75 % après deux semaines d'exposition seulement.

Afin de déterminer l'interaction entre ces trois facteurs qui a conduit à des concentrations ioniques plus faibles, les effets de la combinaison pH acide et faible minéralisation ainsi que pH acide et forte concentration en aluminium sont évalués.

Une forte concentration en protons et une faible minéralisation sont réunis dans le milieu 4,6PM. Afin de déterminer l'impact de cette combinaison sur les concentrations ioniques de l'hémolymphe des larves de *Dinocras cephalotes*, les résultats obtenus pour les larves exposées à ce milieu sont comparés à ceux obtenus pour les larves exposés dans le milieu acide minéralisé (4.6M) (Figures 46 a et b).



\* : aucune mesure n'est réalisée en raison de la forte mortalité survenue dans ce lot

Figure 46 : Concentrations en chlorures (a) et en sodium (b) mesurées à J<sub>0</sub>, J<sub>7</sub>, J<sub>14</sub> et J<sub>21</sub> dans l'hémolymphe des larves exposées aux milieux acide minéralisé (4.6M) et acide faiblement minéralisé (4.6PM). Les barres verticales représentent l'écart-type sur la moyenne des mesures.

Après 7 jours d'exposition, les concentrations en chlorures et en sodium mesurées dans l'hémolymphe des larves exposées au milieu faiblement minéralisé sont plus faibles que celles mesurées dans le milieu minéralisé ayant un même pH. Cette différence n'est toutefois significative au seuil de 0.05 que pour les concentrations en sodium.

Après 14 jours d'expérience, les pertes ioniques observées dans l'hémolymphe des larves exposées au milieu 4.6PM se sont poursuivies pour les deux ions et sont supérieures à 75 %. Les concentrations mesurées sont significativement inférieures à celles des larves exposées au milieu 4.6M ( $p < 0.05$ ).

Aucune mesure n'est réalisée après 21 jours en raison la forte mortalité.

Une forte concentration en protons dans un milieu, de surcroît faiblement minéralisé, entraîne des pertes ioniques supérieures à celles provoquées par un pH acide dans un milieu minéralisé.

#### V.3.2.3.8. Effets de la combinaison pH acide et forte concentration en aluminium dans un milieu

Le milieu 4.6MAI combine une forte concentration en protons et en aluminium. La comparaison des résultats obtenus dans le lot de larves exposé 21 jours à ce milieu avec celui exposé à un pH acide seul permet de déterminer l'effet dû à la combinaison protons et aluminium (Figures 47 a et b).

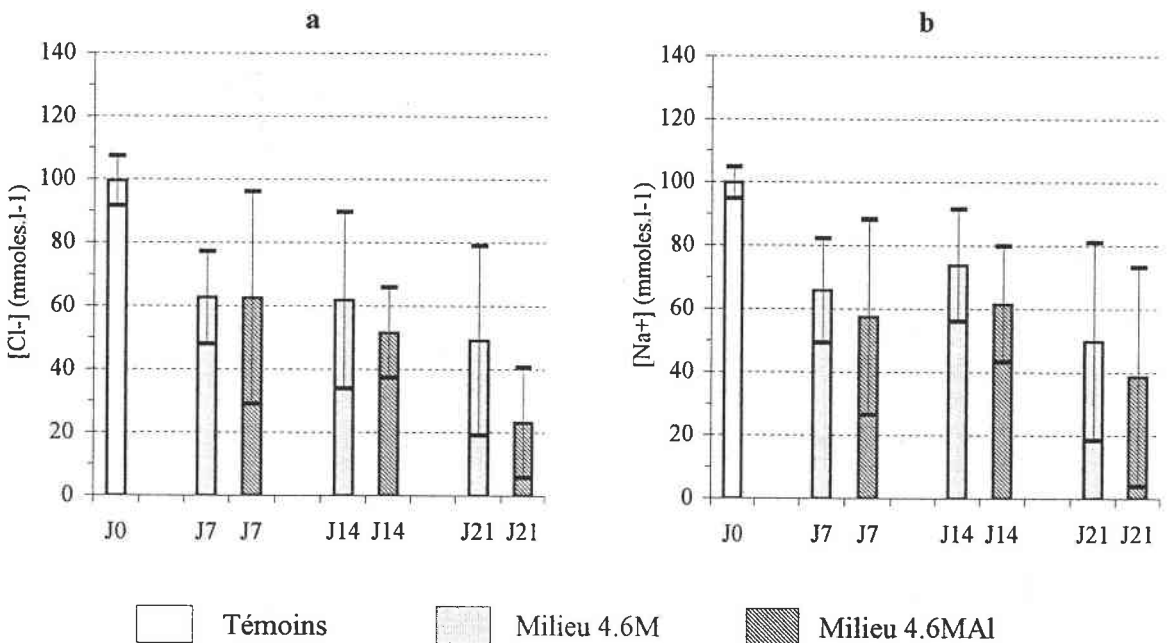


Figure 47 : Concentrations en chlorures (a) et en sodium (b) mesurées à J<sub>0</sub>, J<sub>7</sub>, J<sub>14</sub> et J<sub>21</sub> dans l'hémolymphe des larves exposées aux milieux acides sans (4.6M) et avec aluminium (4.6MAI). Les barres verticales représentent l'écart-type sur la moyenne des mesures.



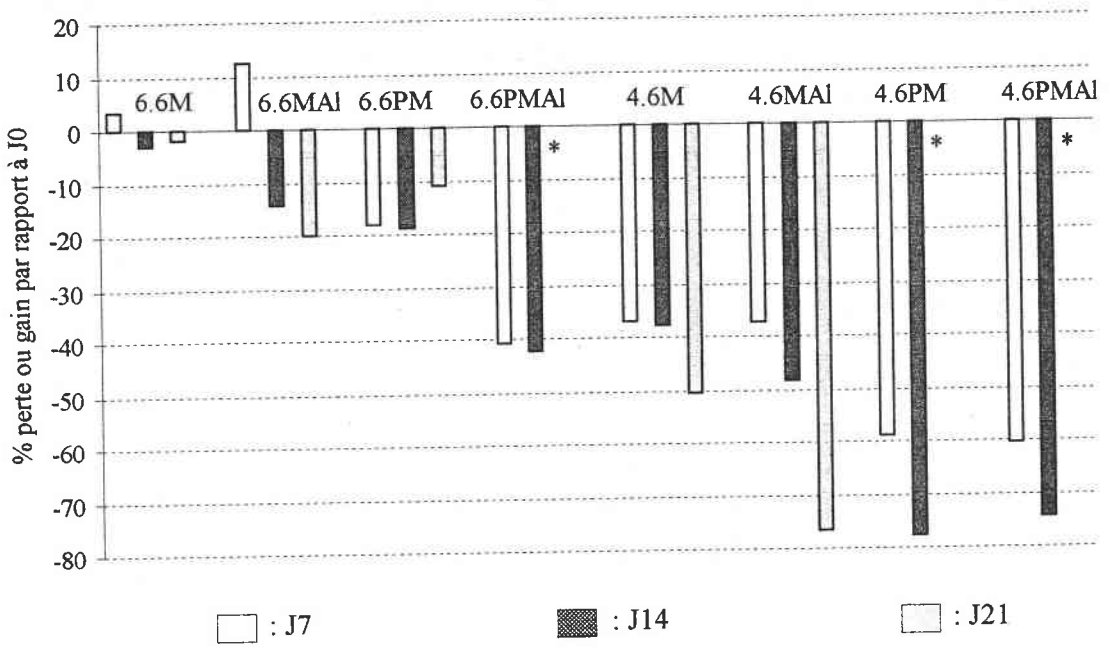


Figure 48 : Pourcentage des pertes ou des gains en chlorures mesuré dans l'hémolymphe des larves exposées aux différents milieux pendant une durée de 7, 14 et 21 jours (\* : pas de mesures).

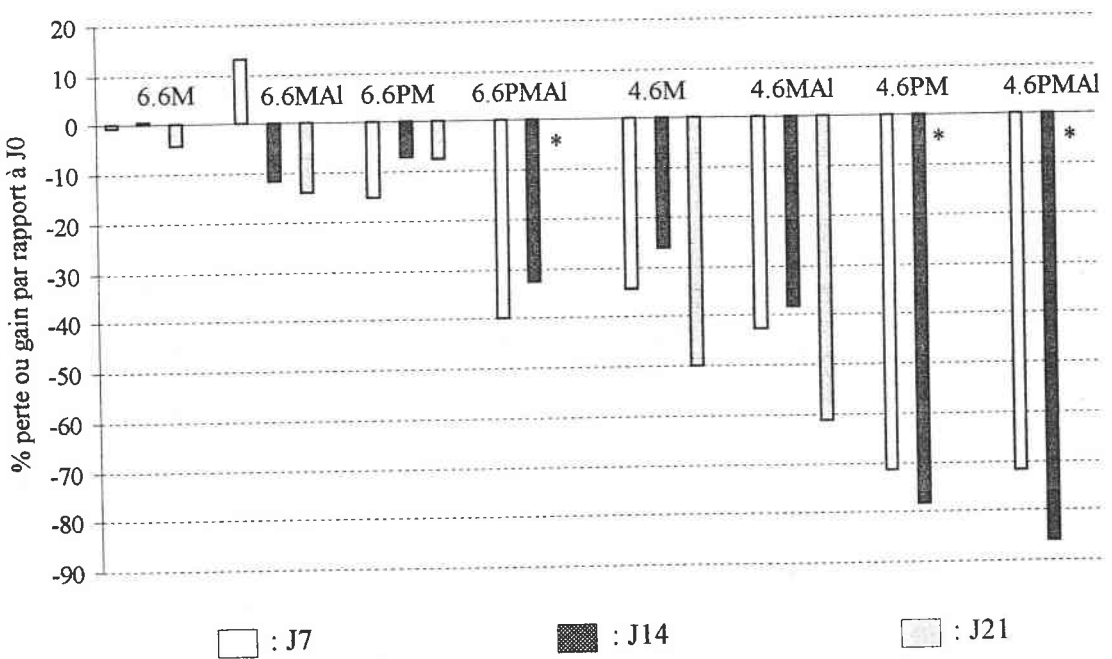


Figure 49 : Pourcentage des pertes ou des gains en sodium mesuré dans l'hémolymphe des larves exposées aux différents milieux pendant une durée de 7, 14 et 21 jours (\* : pas de mesures).

Dès le 7<sup>ème</sup> jour d'expérience, les concentrations mesurées dans l'hémolymphe des larves exposées au milieu 4.6MAI sont significativement inférieures à celles mesurées dans celle des larves du lot témoin, et le restent jusqu'à la fin de l'expérience ( $p < 0.05$ ). Toutefois, malgré des valeurs plus faibles, elles ne sont pas significativement différentes de celles mesurée dans l'hémolymphe des larves exposées au milieu 4.6M pour des durées d'exposition similaires ( $p < 0.05$ ).

L'effet observé est donc principalement du à la présence en forte concentration des protons.

#### V.4. CONCLUSION ET DISCUSSION

L'expérience décrite dans le chapitre III met en évidence que l'exposition de larves de *Dinocras cephalotes* à un milieu acidifié, dont les caractéristiques physico-chimiques principales sont un pH acide, une faible minéralisation et une concentration en aluminium élevée entraîne une perturbation de la régulation ionique traduite par une baisse significative des concentrations en chlorures et en sodium. et une forte mortalité. Il n'est cependant pas possible de dégager les effets respectifs des trois facteurs combinés dans ce milieu, ainsi que leurs interactions.

L'expérience réalisée en laboratoire est basée sur la constitution de milieux permettant de mettre en évidence les effets respectifs ou conjugués de chacun de ces paramètres.

Le tableau XXVII rappelle les effets principaux observés sur les larves de *Dinocras cephalotes* exposées aux différentes combinaisons pendant 21 jours (ou 14 jours lorsqu'une forte mortalité s'est produite).

Tableau XXVII : Effets des paramètres testés (pH acide, faible minéralisation, concentration en aluminium élevée) seuls ou conjugués sur la mortalité et les concentrations en chlorures et sodium de l'hémolymphe des larves de *Dinocras cephalotes*.

	Durée d'exposition	Mortalité	Baisse des concentrations ioniques de l'hémolymphe	
			Cl	Na
	jours			
pH acide	21	*	***	***
faible minéralisation	21	**	*	*
aluminium	21	*	*	*
pH acide + aluminium	21	*	***	***
Faible minéralisation + aluminium	14	**	**	**
pH acide + faible minéralisation	14	***	***	***
pH acide + faible minéralisation + aluminium	14	***	***	***

\* : < 20 % (référence) ; \*\* : 20 < \*\* < 50 % ; \*\*\* : > 50 %

D'une façon générale, il apparaît que, pour les conditions d'expérimentation réalisées en laboratoire :

- dans les milieux à pH acide, une perte d'ions chlorures et sodium est mise en évidence dans l'hémolymphe des larves,
- dans les milieux faiblement minéralisés, une forte mortalité survient,
- dans les milieux à forte concentration en aluminium, aucun effet marqué n'est observé sur la mortalité ou la régulation ionique si ce facteur est seul. Lorsqu'il est combiné à un autre, l'effet induit par ce dernier (mortalité pour la faible minéralisation ; perte ionique pour le pH acide) est amplifié.

\* Effets dus à la concentration en protons élevée

L'exposition de *Dinocras cephalotes* à un milieu dont le pH est acide, mais ayant une minéralisation élevée et ne contenant pas d'aluminium (milieu 4.6M) provoque une perte de chlorures et de sodium supérieure à 50 % après 21 jours d'exposition. Toutefois, ces pertes ne s'accompagnent pas de mortalité élevée. Il apparaît que la perturbation de la régulation ionique observée par les changements de concentration ionique dans l'hémolymphe de *Dinocras cephalotes* soit due essentiellement à la forte concentration en protons trouvée dans le milieu.

Cette réponse est observée pour d'autres Plécoptères acido-sensibles soumis à un environnement riche en protons. Ainsi, des pertes de sodium sont mesurées pour *Pteronarcys proteus* exposé 72 h à pH 3.0 (Lechleitner *et al.*, 1985). D'autres insectes tels les Ephémères présentent également une diminution de leur concentration ionique hémolympatique. C'est le cas notamment pour *Leptophlebia cupida* et *Stenomema femoratum* exposées 96 h à pH 3.5 (Berril *et al.*, 1987 ; Rowe *et al.*, 1989).

Une forte concentration en protons entraîne une perturbation de la régulation ionique chez d'autres organismes aquatiques que les insectes. Ainsi, des écrevisses *Astacus astacus* exposées 72 h à un pH de 3.7 montrent une diminution significative des concentrations en chlorures et en sodium dans l'hémolymphe (Appelberg, 1985). L'exposition à un milieu de pH 4.0 induit une perte nette de chlorures et de sodium chez les poissons *Ictalurus nebulosus* (Vangenechten *et al.*, 1987) et *Salvelinus fontinalis* (Gagen et Sharpe, 1987).

Toutefois, cette réponse n'est pas générale à tous les organismes exposés à de telles conditions. En effet, les concentrations en chlorures et en sodium dans l'hémolymphe des Odonates *Libellula lydia* et *Ishnura verticalis* ne sont pas affectées par une exposition de 96 h à pH 3.5 (Berrill *et al.*, 1987). Il en est de même pour l'Hémiptère *Corixa punctata* exposée 72 h à pH 3.0 (Vangenechten et Vanderborgh, 1980). Potts et Fryer (1979) montrent que le crustacé *Acantholeberis curvirostris* est également capable de maintenir sa concentration en sodium à un pH de 3.0. De même, l'écrevisse

*Cambarus robustus* parvient à réguler sa concentration interne en sodium à un pH de 3.8 tandis que *Oronectes rusticus* montre une perte ionique (Hollett *et al.*, 1986 ; Wood et Rogano, 1986).

Ces variations dans les réponses permettent de définir des espèces acido-sensibles caractérisées par une perte ionique et les acido-résistantes capables de maintenir leur balance ionique malgré l'influence des protons. Les insectes apparaissent être en général un ordre plus tolérant aux faibles pH que les crustacés, les amphibiens ou les poissons. Toutefois, la sensibilité varie entre et au sein des différents ordres (Okland et Okland, 1986). Les Diptères, les Trichoptères et les Hémiptères apparaissent être les plus acido-tolérants des insectes aquatiques (Bell, 1971 ; Vangenechten et Vanderborght, 1980).

Les espèces qui n'arrivent pas à maintenir leur balance ionique sont définies comme acido-sensibles ; la perte ionique mesurée est provoquée par la concentration en protons élevée dans le milieu extérieur. De ce fait, les pertes ioniques mesurées sont relatives au niveau de pH. Les résultats obtenus par Rowe *et al.* (1989) confirment cette hypothèse. Des pertes significatives en chlorures et en sodium mesurées pour l'Ephémère *Stenomena femoratum* lors d'une exposition à un pH de 3.5 n'apparaissent pas dans un milieu de pH 4.5. Il faut toutefois rester cohérent quant aux pH testés, car il semble évident que au delà d'un certain seuil, des perturbations apparaîtront pour une majorité d'organismes. La gamme idéale de test est celle qui comprend des concentrations en adéquation avec les mesures effectuées sur le terrain.

Les conclusions ci-dessus peuvent être appliquées pour définir un niveau de sensibilité pour une espèce donnée. Ce dernier pourrait être déterminé en fonction :

- de la concentration en protons qui entraîne une perte ionique. Ainsi, plus le pH d'exposition est acide sans provoquer de réponse de l'organisme exposé, plus celui-ci est acido-résistant.
- de la capacité à supporter des pertes ioniques. Ainsi, plus elles sont élevées, plus l'organisme est résistant. Dans notre cas, les concentrations en sodium dans l'hémolymphe sont celles utilisées comme référence puisque cet élément est le constituant ionique majeur du compartiment extracellulaire (cet aspect est développé ultérieurement dans la partie VI.I).
- du temps de survie dans un milieu acide. Cette durée est importante car même si un individu meurt lors d'une longue exposition à un pH acide, il peut être à même de supporter des stress acides de courte durée comme ceux qui se produisent notamment dans les Vosges pendant les épisodes de forte pluie et de fonte des neiges.

La régulation ionique des insectes d'eau douce consiste en un flux entrant et un flux sortant d'ions. La composante "flux entrant" comprend la boisson prise dans le milieu extérieur, les apports nutritionnels, le prélèvement au niveau de zones ou d'organes spécialisés ainsi que les ions qui sont partiellement réabsorbés au niveau du rectum par un procédé de transport actif. Le flux sortant d'ions

est principalement le résultat de l'activité du co-transport d'ions au niveau de transporteurs spécifiques et de l'excrétion en même temps que l'eau est expulsée du corps (Shaw et Stobbart, 1963). Toutefois, la réabsorption au niveau du rectum minimise partiellement les pertes.

La perturbation de la régulation ionique mise en évidence par les pertes d'ions mesurées dans l'hémolymphe de *Dinocras cephalotes* suite à une exposition dans un milieu contenant une forte concentration en protons peut donc être expliquée par la modification suivante des flux ioniques :

- diminution du flux d'ions entrant,
- augmentation du flux d'ions sortant.

La somme des deux paramètres correspond à un dérèglement de la balance ionique en faveur d'une perte. Cette conclusion s'applique à tous les organismes acido-sensibles. Toutefois, les facteurs physiologiques à l'origine sont propres à chaque ordre du fait des différents modes d'osmorégulation. Seul le cas des insectes sera considéré dans cette partie.

Dans le cas des insectes d'eau douce et, notamment des Plécoptères, l'absorption des ions se produit au niveau des cellules à chlorures lesquelles sont situées principalement au niveau des branchies. Ce prélèvement actif implique la participation d'une Na - K ATPase (Kapoor, 1980). Les cellules osmorégulatrices constituent une surface extra-rénale pour l'absorption des ions sodium et chlorures à partir de l'eau (Kapoor, 1978). Au niveau de ces sites actifs, les prélèvements de chlorures et de sodium se produisent via des transporteurs Na/H ou Na/NH<sub>4</sub> et Cl/OH ou Cl/HCO<sub>3</sub> (Vangenechten *et al.*, 1979) et se déroulent de façon analogue aux cinétiques de saturation enzyme - substrat (Stobbart et Shaw, 1974). Dans des conditions physiologiques et environnementales normales, l'affinité du transporteur est élevée pour le sodium du côté externe de la membrane et pour les protons du côté cytosol.

Cinq hypothèses basées sur le transport ionique peuvent être émises pour expliquer une diminution dans le flux de sodium entrant :

- les protons entrent en compétition avec le sodium,
- des changements ultrastructuraux dans les cellules à chlorures modifient leur efficacité,
- l'enzyme Na - K ATPase fournissant l'énergie nécessaire à ce type de transport a une activité réduite,
- l'excrétion à partir des tubes de Malpighi et la réabsorption rectale sont perturbées.

Il est probable que les protons entrent en compétition avec le sodium au niveau des sites de prélèvement spécifiques réduisant ainsi le flux entrant de sodium. Cela est en accord avec les travaux de Twitchen (1990) qui montrent que les protons agissent sur le prélèvement de sodium de façon analogue à celle induite par des inhibiteurs sur des cinétiques enzymatiques. D'autre part, il est également envisageable que l'affinité du transporteur augmente pour les protons du côté externe de la

membrane en raison du faible pH. Chez *Dinocras cephalotes*, le transporteur a une plus forte affinité pour  $H^+$  que pour  $Na^+$  et le prélèvement est réduit de 47 à 72 % dans un environnement acide.

Une baisse significative de l'influx de sodium chez les invertébrés suite à une augmentation des protons dans l'eau est montrée par des études de laboratoire (Camargo, 1995).

Des changements dans l'ultrastructure des cellules à chlorures peuvent être responsables d'une efficacité réduite dans le prélèvement d'ions à partir du milieu extérieur. Lechleitner *et al.* (1985) constatent des détériorations dans l'ultrastructure des cellules osmorégulatrices des larves de *Pteronarcys dorsata* (Plécoptères) exposées 9h à pH 2.5. Ces changements impliquent une perte des fonctions osmorégulatrices qui peuvent expliquer la mort de tous les organismes après 48h d'exposition. Toutefois, ces modifications n'apparaissent qu'à des niveaux de pH létaux. Dans ce cas, les pH testés ne correspondent pas à des niveaux réalistes par rapport aux données de terrain et il semble difficile de conclure que de tels effets puissent se produire dans des conditions plus proches de la réalité et donc d'imputer la diminution du flux entrant d'ions ionique exclusivement à des modifications ultrastructurales.

Pour le transport actif d'ions qui se produit au niveau des cellules osmorégulatrices, la Na - K ATPase est essentielle. On peut toutefois supposer que aux niveaux de ces sites, suite à la compétition entre Na et H, un certain nombre de protons entrent et modifient ainsi le pH aux environs de cette enzyme. De même, puisque à une entrée de sodium correspond la sortie d'un proton, la réduction de l'entrée de sodium s'accompagne de celle de la sortie des protons, entraînant ainsi de probables diminutions de pH. Or, l'ATPase montre un maximum d'activité dans des gammes de pH précises et est inhibée plus ou moins dans les zones de pH différents de cette gamme optimale. Kapoor (1980) observe une réduction de l'activité de Na - K ATPase de *Paragnetina media* quand l'enzyme est incubée au dessous de pH 7 et au dessus de 7.5. Ainsi, l'augmentation de  $H^+$  peut réduire la capacité des insectes aquatiques à prélever du sodium dans l'environnement en inhibant cette enzyme.

Chez beaucoup d'insectes aquatiques, une réabsorption active des ions sodium prend place dans le rectum (Shaw et Stobbart, 1963). Cette réabsorption active nécessite aussi la présence de l'enzyme Na - K ATPase dont la présence et l'activité à ce niveau est prouvée (Anstee et Bell, 1975 ; Kapoor, 1980). Une réduction dans l'activité de cette dernière peut agir d'une part, sur l'influx en le diminuant par une baisse du niveau de réabsorption et d'autre part, sur l'efflux en l'augmentant puisque la quantité d'ions excrétée est plus élevée. L'augmentation de l'efflux est rapportée pour les Ephémères *Ephemera danica* et *Heptagenia sulphurea* qui montrent une diminution de leur concentration en sodium suite à une exposition à un pH de 4.0 (Frick, 1990).

Les différentes hypothèses, ainsi que les résultats d'autres études citées ci-dessus permettent de proposer l'explication suivante sur les modifications qui se produisent au niveau de l'organisme de *Dinocras cephalotes* lorsqu'il est confronté à une concentration en protons élevée :

Une modification dans les flux ioniques se produit et se solde par une perte d'ions vers le milieu extérieur. Plusieurs mécanismes physiologiques sont à la base de ces altérations. La compétition entre le sodium et les protons permet probablement l'entrée de protons lesquels influent directement sur l'enzyme intervenant dans le transport actif en réduisant son activité. Comme cette dernière est également présente au niveau des tubes de Malpighi, la baisse de son activité agit sur le flux entrant en le réduisant et sur le flux sortant en l'augmentant.

#### \* Effets dus à la faible minéralisation

Lorsque des larves de *Dinocras cephalotes* sont exposées à un milieu faiblement minéralisé (pH : 6.6, sans aluminium), aucune différence significative n'est observée dans les concentrations moyennes ioniques mesurées dans l'hémolymphe des larves de ce lot comparées à celles des larves du lot témoin et contrôle. Par contre, une mortalité plus élevée que dans ces deux lots est observée. De plus, il apparaît avec tous les autres milieux de l'expérience qu'une forte mortalité est observée dans les milieux faiblement minéralisés et, cela indépendamment du pH et de la concentration en aluminium.

Dans ces milieux hypominéralisés, les insectes se retrouvent dans des eaux pauvres en ions calcium, sodium, magnésium et potassium. Toutefois, les différences éventuelles dans l'importance respective de chacun de ces éléments ne sont pas abordées dans ce chapitre, car cette question correspond à l'objectif de l'expérience rapportée dans la partie VI.II.

Les larves de *Dinocras cephalotes* soumises à un environnement très hypotonique par rapport à leur milieu interne montre une bonne capacité osmorégulatrice car elles arrivent à maintenir une relative constance dans leurs concentrations ioniques internes; cela dans le cadre de nos conditions expérimentales et surtout de la durée testée.

Cette capacité est une propriété commune aux larves de Plécoptères qui se sont révélées être d'excellents hyperosmorégulateurs dans les études de Colby (1972) et Kapoor (1979).

Lorsque des insectes se retrouvent exposés dans un milieu faiblement minéralisé, une entrée d'eau à partir du milieu extérieur se produit et s'accompagne d'une fuite d'ions à partir de l'organisme. Comme aucune modification n'est mesurée dans les concentrations en chlorures et en sodium dans l'hémolymphe de *D. cephalotes*, il semble que cette espèce soit apte à développer des mécanismes appropriés pour lutter contre les phénomènes induits par la différence de minéralisation entre les milieux externes et internes à l'insecte. Deux mécanismes physiologiques peuvent être envisagés :

- l'augmentation des prélèvements d'ions dans le milieu extérieur,
- la limitation des pertes ioniques au niveau de l'urine.

L'augmentation du prélèvement d'ions à partir du milieu extérieur peut être réalisée selon deux modes :

- une augmentation du nombre de cellules spécialisées à cet effet,
- une plus grande activité de ces cellules.

Dans le premier cas, comme le tégument des insectes est rigide, le nombre de cellules osmorégulatrices ne peut être modifié que lors du processus de mue. Dans certaines expériences exposant des macroinvertébrés à un milieu acidifié, le nombre de mues augmente dans les lots exposés au milieu entraînant des pertes ioniques. Leurs auteurs tels Wichard *et al.* (1973) interprètent ce phénomène comme une capacité à multiplier le nombre de cellules à chlorures. Pour *Dinocras cephalotes*, le nombre de mues comptabilisé dans cette expérience ne diffère pas entre les huit milieux expérimentaux. Par conséquent, aucune variation dans le nombre de cellules à chlorures ne se produit. Ces résultats sont en accord avec ceux de Berrill *et al.* (1991) qui montrent chez plusieurs espèces d'Ephémères que la densité des cellules à chlorures n'est pas corrélée à la tolérance au pH acide et que le nombre de ces cellules n'augmente pas malgré les mues se produisant pendant l'exposition. Bricknell (1989) conclut que pour les Plécoptères, ce n'est pas le nombre de cellules à chlorures qui intervient, mais le type cellulaire ; les cellules coniformes étant essentiellement, mis à part pour les exceptions, trouvées chez les espèces acido-sensibles. Ces cellules sont localisées sur les parties du corps de la larve où la cuticule est de moindre épaisseur, c'est-à-dire essentiellement sur les branchies et les membranes intersegmentaires. Elles ont la particularité d'être intracuticulaires et, de communiquer par leur partie apicale en forme de coupe avec le milieu ambiant ; leur partie basale se situant dans l'épithélium sous-jacent. Ces cellules sont caractérisées par un nombre important d'invaginations et de mitochondries traduisant leur implication dans l'osmorégulation (Wichard et Komnick, 1973 ; Komnick, 1977).

Une plus grande activité au niveau des cellules spécialisées reste donc pour *Dinocras cephalotes* le moyen le plus efficace pour augmenter le flux entrant d'ions nécessaire à la compensation des pertes provoquées par le milieu extérieur très hypotonique par rapport au milieu intérieur de l'insecte. L'absorption des ions à partir de l'eau environnante se produit à travers les cellules à chlorures grâce à un prélèvement actif impliquant la participation d'une enzyme Na - K ATPase. Cette enzyme est localisée principalement chez les insectes au niveau des branchies, du rectum et des tubes de Malpighi. Kapoor (1980) a mis en évidence que l'exposition de *Paragnetina media* (Plécoptère) à un milieu hypotonique entraîne une augmentation de 84 % de l'activité de l'enzyme branchiale. A cette variation, des modifications ultrastructurales se produisent avec notamment, une augmentation des invaginations, du nombre de mitochondries et de microtubules. Ces différences suggèrent que ces sites (cellules à chlorures branchiales), qui sont des surfaces métaboliquement actives pour l'absorption d'ions contre un gradient de concentration, semblent



pouvoir augmenter leur activité pour pomper plus de sodium et de chlorures du milieu extérieur dilué vers l'hémolymphe afin de maintenir la balance ionique interne au niveau initial.

La production d'une urine diluée peut permettre également à *Dinocras cephalotes* de retenir un maximum d'ions. La réabsorption se produit essentiellement au niveau du rectum et nécessite, comme pour les cellules à chlorures, la présence de l'enzyme Na - K ATPase. Cette capacité de rétention maximale d'ions est mise en évidence par Kapoor (1978). Ainsi, dans de l'eau déminéralisée, *Paragnetina media* et d'autres Plécoptères tels *Pteronarcys californica* sécrètent une urine très diluée et réussissent à maintenir leur hémolymphe hyperosmotique par rapport au milieu extérieur.

Cependant, les mécanismes physiologiques impliqués dans l'augmentation du prélèvement et de la réabsorption rectale requièrent tous de l'énergie fournie par la Na - K ATPase. Or, de ce fait, moins d'énergie reste disponible à l'insecte pour assurer le déroulement normale des autres fonctions. Les larves s'affaiblissent, deviennent moins résistantes, et meurent probablement d'épuisement. Les résultats obtenus lors de l'estimation de la mortalité montrent que celle-ci se produit essentiellement lors de la première semaine. Les données individuelles sur les concentrations en chlorures et en sodium réalisées à cette même date montrent que certaines larves ont perdu des ions. Il est possible aussi que les larves qui sont mortes étaient déjà très affaiblies par la lutte pour maintenir leur niveau ionique ainsi que par une diminution de leurs réserves métaboliques et qu'elles n'aient pas pu récupérer alors que les autres ont disposé de suffisamment de ressource pour maintenir leur balance ionique et ont pu ainsi survivre pendant toute la durée de l'expérience.

#### \* Effets dus à la forte concentration en aluminium seul

Dans nos conditions expérimentales, c'est à dire dans le milieu testé pour mettre en évidence les effets de l'aluminium seul, donc combinant une forte concentration en aluminium avec un pH de 6.6 et une minéralisation normale, l'aluminium ne semble provoquer aucun effet marqué sur les paramètres choisis. Une légère baisse est mesurée dans les concentrations ioniques en chlorures et en sodium dans l'hémolymphe, mais elle n'est pas significative. La mortalité ne diffère pas de celle mesurée dans le lot contrôle.

Des résultats similaires ont été obtenus pour les Ephémères *Ephemera danica* exposées à des concentrations en aluminium élevées. Cependant, les réponses vis à vis de cet élément varient en fonction de l'espèce étudiée. Ainsi, pour *Heptagenia sulphurea* (Ephémère), une perte de 4.6 % de sodium corporel par heure est mesurée pour un milieu ayant un pH de 6.0 et une concentration en aluminium de 2 mg.l<sup>-1</sup>, ce qui se rapproche des pertes mises en évidence pour cette espèce suite à une exposition à un pH de 4.0 sans aluminium (Frick, 1990).

Le mode d'action de l'aluminium, lorsqu'il provoque une réponse, pourrait donc être comparable à celui des protons. Ainsi, il pourrait contribuer à l'inhibition du prélèvement de sodium par la baisse de l'influx et, également à l'augmentation de l'efflux. Ces hypothèses rejoignent celles de Frick (1990) et de Twitchen (1990).

Il peut également agir en se déposant sur la cuticule et en interférant avec les différents mécanismes se déroulant à ce niveau. Frick et Hermann (1989) ont montré que cette fraction d'aluminium éliminée par l'exuvie correspond à 70 % de l'aluminium total analysé avant la mue. Dans ce cas, l'exuviation semblerait alors liée à l'élimination de l'aluminium déposé. Chez *Ecdyonurus venosus* (Ephémère), des colorations histochimiques ont mis en évidence de l'aluminium au niveau du tube digestif, des branchies et de la surface abdominale. Par ces deux modes de dépôt, externe et interne, il pourrait agir sur les procédés de diffusion transcellulaire tels que le prélèvement des ions sodium et chlorures ou la diffusion des gaz respiratoires.

En fait, peu de travaux ont été réalisés sur des insectes pour approfondir les effets de l'aluminium. Pour cette raison, les principaux résultats obtenus pour les poissons seront donnés dans cette partie. Cela permet de constater que les altérations mises en évidence pour les insectes sont identiques dans leur grande ligne à celles des poissons.

Les symptômes des effets toxiques de l'aluminium sur les poissons (Rosseland et Staurnes., 1994 ; Havas et Rosseland, 1995) sont les suivants :

- perturbation de la respiration due à des bouchons de mucus interlamellaire et à la précipitation de l'aluminium sur les branchies. Chez les insectes, la production de mucus n'est envisageable qu'au niveau de certaines portions du tube digestif.
- perturbation iono- et osmorégulatrice due à la baisse de l'influx et à l'augmentation de l'efflux d'ions (sodium, chlorures et calcium)
- perturbation circulatoire caractérisée par une augmentation des hématocrites due à un volume réduit du plasma sanguin et par le gonflement des érythrocytes. De plus, une augmentation de la concentration en protéines et de la viscosité du sang est mise en évidence. Chez les insectes, l'hémolymphe ne présente pas les mêmes caractéristiques pour les éléments figurés, mais la fraction liquide est à considérer.

N'ayant obtenu aucun effet marqué de l'aluminium sur la régulation ionique de *Dinocras cephalotes*, il serait intéressant de mesurer la consommation d'oxygène des larves exposées à cet élément seul car, suite aux dépôts sur la surface du corps et donc également au niveau des branchies, il est probable qu'une diminution de ce taux apparaisse.

Il est d'autant plus difficile de conclure sur les effets de l'aluminium que sa chimie est complexe. Son mode d'action est différent selon sa spéciation laquelle dépend du pH et de la composition du milieu. Par exemple, sa solubilité est maximale aux environs de pH 5.5. A pH 5.0,

l'aluminium sous forme  $Al^{3+}$  tend à s'hydrolyser et à polymériser en formant  $Al(OH)_3$  qui peut éventuellement précipiter (Brown, 1983). A ces grandes tendances, des complexes d'aluminium, ainsi que et des ligands organiques et inorganiques peuvent réduire la toxicité. Toutefois, là encore, les résultats sont variables. Ainsi, les fluorures peuvent réduire ou éliminer la toxicité de l'aluminium, mais dans d'autre cas, il peut aussi l'augmenter ou être sans action, cela varie avec la concentration. De faibles concentrations en fluorures peuvent réduire les dommages morphologiques observés sur les branchies de poissons (*Salmo salar*) exposés en milieu acidifié tandis que de fortes concentrations ( $>100 \mu g.l^{-1}$ ) ne réduisent pas sa toxicité (Hamilton et Haines, 1995). De plus, selon les espèces, la toxicité se manifeste pour des gammes de pH variables. Pour *Daphnia magna*, le maximum de toxicité se manifeste dans la gamme de pH 4.5 - 6.5 avec un maximum de prélèvement d'aluminium à pH 6.5 et un minimum à pH 4.5 (Havas et Lickens, 1985). Pour d'autres espèces, la toxicité est mise en évidence pour d'autres pH. Les résultats peuvent même varier selon les études pour une même espèce. Ainsi, l'aluminium apparaît plus toxique pour les Salmonidés à pH 5.2 et moins à pH 4.4 (Playle *et al.*, 1989) alors que d'autres auteurs situent le maximum de toxicité à pH 4.6 (Hutchinson *et al.*, 1987). Cette variation interspécifique se retrouve également au niveau des doses testées.

Pour conclure, l'aluminium, présent en concentration de  $0.5 \mu g.l^{-1}$ , ne semble provoquer aucun effet sur la régulation ionique des larves de *Dinocras cephalotes*, lorsqu'il est combiné à un pH de 6.6 et à une minéralisation élevée, et, cela pour une exposition de 21 jours.

#### \* Effets dus aux différentes combinaisons de deux facteurs

Dans les trois paragraphes précédents, il apparaît que chacun des paramètres physico-chimiques principalement impliqués dans les problèmes d'acidification des eaux douces ont un effet spécifique sur les larves de *Dinocras cephalotes*. Il est intéressant de connaître leur mode d'action lorsqu'ils sont combinés deux à deux.

Trois combinaisons de deux paramètres sont testées dans cette expérience :

- forte concentration en protons et en aluminium,
- forte concentration en protons et faible minéralisation,
- faible minéralisation et forte concentration en aluminium.

Dans la littérature, la combinaison pH acide et forte concentration en aluminium est la plus testée des trois. Si les résultats, quant aux effets d'une forte concentration en protons sont bien connus, c'est à dire qu'ils perturbent la régulation ionique des individus acido-sensibles, les conclusions sur les effets de l'aluminium dans la combinaison pH acide - concentration en aluminium élevée ne sont pas définitivement établies.

Certaines études mettent en évidence un effet positif de l'aluminium. Ainsi, les effets induits par la forte concentration en protons sont réduits, l'aluminium semblant améliorer partiellement les effets du faible pH sur la capacité régulatrice des ions. En effet, l'addition d'aluminium (0.5 et 2.0 mg.l<sup>-1</sup>) à pH 4.0 réduit de 50 % les pertes de sodium provoquées par un pH de 4.0 sur les larves des Ephémères *Ephemera danica* et *Heptagenia sulphurea* (Frick, 1990).

Toutefois, la majorité des études conclut à une amplification de la perte ionique provoquée par les protons, ainsi que l'a montré le résultat de cette expérience réalisée au laboratoire. Une perturbation marquée de la régulation ionique est également observée pour les larves de l'Odonate *Libellula julia* exposées pendant 96 heures à un milieu de pH acide avec une concentration en aluminium élevée, notamment pour la combinaison pH 2.3 et 30 mg.l<sup>-1</sup> d'aluminium (Rockwood et Coler, 1991). Hermann (1987) a également mis en évidence une baisse significative dans le contenu en sodium corporel des Ephémères *Heptagenia sulphurea* exposées à des concentrations élevées en aluminium combinées avec des pH 4 et 4.8.

D'autres organismes répondent de façon similaire à de telles combinaisons "pH acide - forte concentration en aluminium". Entre les mues, l'adulte d'écrevisse montre une perte nette des ions de l'hémolymphe à des niveaux de pH inférieur à 5.0. Cette perte est augmentée en présence d'aluminium (Appelberg, 1987). Des diminutions des concentrations en chlorures et en sodium sont mesurées également chez *Daphnia middendorffiana*, *Diaptomus arcticus* et *Branchinecta paludosa* exposées à un milieu combinant pH acide et concentration en aluminium élevée (Havas et Hutchinson, 1983).

Wood *et al.* (1988) ont mis en évidence que les effets mesurés sur des poissons exposés à un pH acide combiné à une forte concentration en aluminium sont plus marqués que ceux provoqués par le pH acide seul. La mortalité et les pertes ioniques sont beaucoup plus élevées. L'effet amplificateur de l'aluminium sur les pertes ioniques de l'hémolymphe est donc mis en évidence dans de nombreuses études et s'applique pour de nombreux organismes. Toutefois, si le mode d'action des protons est bien défini lorsque le milieu est acide, les effets dus à l'aluminium sont plus difficiles à déterminer.

Chez les poissons, Hutchinson *et al.* (1989) concluent que la distribution des ces organismes est contrôlée principalement par les protons avec une petite influence de la concentration en aluminium. La branchie semble être l'organe cible pour l'action toxique de cet élément (Rosseland, 1980). En plus de l'inhibition du prélèvement actif de sodium et de chlorures par les branchies (Playle *et al.*, 1989), il provoque également des inflammations, des gonflements cellulaires ainsi que des distorsions dans l'épithélium branchial. De même, une production excessive de mucus interférant avec le transfert d'oxygène peut être observée (McCahon *et al.*, 1987).

Pour les insectes, seuls des dépôts de précipités d'aluminium ont été mis en évidence sur tout le corps (McCahon *et al.*, 1987). Ils peuvent interférer avec la respiration et la régulation ionique. Vangenechten et Van de Borght (1980) ont montré que chez *Corixa punctata*, le mode d'action de l'aluminium était une diminution accrue du flux entrant de sodium.

Il est difficile de trancher pour les effets de l'aluminium dans la combinaison pH acide - forte concentration en aluminium pour les mêmes raisons que celles détaillées dans la partie discutant les effets d'une forte concentration en aluminium seule. En effet, la spéciation de l'aluminium est fonction du pH et de la composition du milieu et sa toxicité est fonction de sa spéciation et de sa concentration. De plus, la sensibilité de l'espèce testée intervient nettement dans la réponse. Havens (1992) a testé différentes combinaisons de concentrations en protons et en aluminium sur *Daphnia galeata*. Pour certaines, l'aluminium a des effets négatifs. Une forte mortalité et une baisse en sodium dans l'organismes est mesurée. Par contre, à pH 4.5 et concentration en aluminium de 200  $\mu\text{g.l}^{-1}$ , une augmentation des concentrations en protons et une prolongation de la survie sont constatées. L'aluminium apparaît dans ce cas avoir un effet améliorateur.

Suite aux résultats obtenus dans cette expérience et à la comparaison avec d'autres travaux, il apparaît que les pertes ioniques mesurées dans l'hémolymphe de *Dinocras cephalotes* provoquées par un pH acide de 4.6 sont amplifiées lorsque 0.5  $\text{mg.l}^{-1}$  d'aluminium est ajouté dans le milieu. Cela est probablement dû à un dépôt de précipités d'aluminium aux niveaux notamment des zones spécialisées pour le prélèvement ionique.

L'exposition des larves de *Dinocras cephalotes* à un milieu ayant un pH acide et une faible minéralisation entraîne une réponse marquée. D'une part, les pertes ioniques sont très importantes (> 50 %) et d'autre part, la mortalité est élevée et beaucoup plus rapide (> 50 %). Cette combinaison réunit les effets observés pour les deux facteurs pris séparément et les amplifie.

Les larves réagissent de façon beaucoup plus forte au pH acide lorsque de surcroît le milieu est peu minéralisé. Ces résultats rejoignent ceux de Havas (1981) et Okland et Okland (1986) qui ont montré que la qualité de l'eau, c'est à dire le milieu externe dans lequel vit l'animal est très importante car la toxicité des protons varie en fonction du contenu ionique de l'eau. En effet, tous les organismes sont d'autant plus sensibles à l'acidification que la force ionique de l'eau diminue (Havas et Advokaat, 1995). L'étude de Hutchinson *et al.* (1987) montrent que les poissons habitant dans une eau diluée sont sensibles à l'acidification et que la sensibilité augmente lorsque la force ionique diminue.

La mesure de la conductivité de l'eau ou l'évaluation de la minéralisation totale apparaissent donc aussi essentielle à déterminer que celle des cations spécifiques. En effet, la toxicité des éléments du milieu est liée au contenu global dans l'eau.

En ce qui concerne la combinaison "faible minéralisation et forte concentration en aluminium", aucune étude similaire ne permet la comparaison des résultats. Dans le cadre de notre expérience, l'aluminium exacerbe la réponse initialement provoquée par la faible minéralisation. Ainsi, la mortalité est plus élevée et plus rapide. L'aluminium semblant avoir un effet essentiellement au niveau de la

respiration chez les poissons, la diminution de la consommation en oxygène observée pour *Dinocras cephalotes* lors de l'exposition en milieu acidifié peut donc également être due à la présence de l'aluminium (cf. chapitre IV, effets sur la respiration). La baisse du taux respiratoire s'accompagne d'une diminution de la quantité d'énergie disponible pour lutter contre les effets négatifs du milieu. Cette baisse supplémentaire se rajoute à celle entraînée par la faible minéralisation et explique ainsi la mortalité plus élevée.

\* Effets dus à la combinaison des trois facteurs

Ce milieu correspond à la situation rencontrée sur le terrain. Les insectes exposés à cette combinaison ne survivent pas plus de 14 jours. Les pertes ioniques dépassent 60 % dès le 7<sup>ème</sup> jour et s'amplifient pendant la semaine suivante. La mortalité associée est très élevée. Il apparaît que plus le nombre de facteurs combinés est élevé et plus les insectes ont du mal à faire face.

La combinaison des paramètres dans un même milieu provoque la combinaison des réponses observées pour chacun d'eux pris séparément. Les causes de ces dérèglements sont détaillées dans les autres paragraphes de cette discussion. La partie IV de ce travail présente des études similaires réalisées avec ce type de milieu, ainsi que d'autres effets dus à une telle exposition.

## V.5. SYNTHÈSE

Lors d'une exposition à un milieu acidifié, les larves de *Dinocras cephalotes* présentent une diminution des concentrations en chlorures et en sodium dans leur hémolymphe, ce qui traduit une perturbation de la régulation ionique. Une forte mortalité accompagne ce dérèglement.

En fait, le milieu acidifié correspond à l'action conjuguée de trois paramètres spécifiques, un pH acide, une faible minéralisation et une forte concentration en aluminium. Il apparaît donc difficile dans ces conditions de déterminer les effets respectifs de chacun de ces facteurs.

L'expérience réalisée au laboratoire a permis de répondre à cette question.

Son principe repose sur la création de milieux dont la physico-chimie est déterminée par trois critères de base, le pH, la minéralisation et la concentration en aluminium. Chacun de ces trois facteurs est représenté par deux niveaux :

- le premier, caractéristique de cours d'eau vosgien non acidifié, tel que le site de prélèvement des larves de Plécoptères,
- le deuxième, caractéristique de cours d'eau vosgien acidifié, tel que le Rouge-Rupt (description dans la partie III).

Ces trois facteurs, avec leurs niveaux respectifs ont permis de réaliser huit milieux différents permettant ainsi de mettre en évidence les effets de chaque paramètre spécifique de l'acidification seul ou en combinaison pendant une exposition de 21 jours.

Les milieux ainsi réalisés ne représentent pas toujours des situations observables sur le terrain, ce qui justifie la réalisation d'une telle expérience en laboratoire. Toutefois, les valeurs testées des différents paramètres sont pertinentes avec des données de terrain.

Les conclusions tirées de cette expérience sont les suivantes :

- une forte concentration en protons entraîne une perturbation de la régulation ionique,
- dans les milieux faiblement minéralisés, une forte mortalité se produit,
- une forte concentration en aluminium, dans nos conditions expérimentales, ne provoque pas d'effets marqués sur les critères choisis,
- dans les milieux combinant une faible minéralisation et un pH acide, les effets observés sont ceux de chacun des facteurs pris séparément,
- l'aluminium combiné à une forte concentration en protons ou à une faible minéralisation amplifie les effets mesurés avec le facteur considéré pris seul. Lorsqu'il est associé à un pH acide, les pertes ioniques mesurées après un temps donné d'exposition correspondent à la somme des pertes mesurées après une exposition pendant un temps similaire à chacun de ces facteurs pris séparément. Ces deux paramètres sont donc additifs. A l'opposé, les pertes provoquées par une exposition à la combinaison aluminium et faible minéralisation sont supérieures à la somme de celles obtenues pour chacun des facteurs considérés seuls. Dans ce cas, l'effet de la combinaison est synergique,
- pour un même temps d'exposition, la combinaison pH acide - faible minéralisation entraîne des pertes ioniques supérieures à celles induites par chacun de ces deux facteurs pris séparément,
- plus le nombre de facteurs combinés est important, plus les insectes ont des difficultés à lutter. Les pertes ioniques et la mortalité sont très élevées.

La concentration en protons et la faible minéralisation sont les deux facteurs primordiaux à considérer lors de l'acidification d'un cours d'eau.

Les protons perturbent physiquement l'insecte en altérant sa régulation ionique suite à la perturbation des mécanismes physiologiques fondamentaux (prélèvement d'ions, excrétion) impliqués dans le maintien de l'homéostasie. Cette baisse des concentrations hémolymphatique ne provoquent pas dans une certaine limite de mortalité.

La faible minéralisation provoque la mort de l'insecte (par épuisement probablement) suite à la lutte coûteuse en énergie engendrée par les différences de concentration entre le milieu externe et interne à l'insecte. La faible minéralisation étant létale pour les larves de *D. cephalotes*, ce paramètre

est fondamental dans le cadre des études de l'acidification. Il convient donc d'être rigoureux sur les conditions expérimentales afin d'éviter des variations trop importantes des concentrations ioniques dans les milieux d'exposition et surtout de les préciser.

Toutefois, la minéralisation est un paramètre global qui regroupe un certain nombre de données, entre autres, les concentrations en cations. Tous peuvent avoir une action spécifique et plus ou moins importante dans le contexte de l'acidification. La partie VI., (notamment VI.2.) a pour objectif de répondre à cette question.



## CHAPITRE VI. : PERSPECTIVES CURATIVES

### VI.1. MISE EN EVIDENCE DE LA CAPACITE DE RECUPERATION DES LARVES DE *DINOCRAS CEPHALOTES* SOUMISES PREALABLEMENT A UN STRESS ACIDE

#### VI.1.1. Objectifs

Le chapitre IV a mis en évidence les perturbations physiologiques se produisant pour des larves de *Dinocras cephalotes* exposées à un milieu acidifié. La principale perturbation observée est caractérisée par une diminution des concentrations en sodium (et en chlorures) dans l'hémolymphe. Ce dérèglement de la régulation ionique traduit un déséquilibre de l'homéostasie de l'individu pouvant conduire à sa mort.

Le chapitre V a montré qu'une faible minéralisation entraîne une forte mortalité et que les pertes ioniques sont essentiellement provoquées par une concentration en protons élevée dans le milieu d'exposition. Ainsi, lorsque des larves sont exposées à un milieu sans aluminium dont le pH est acide, mais dont la minéralisation est élevée (relativement à nos conditions d'expérience), il se produit une réduction significative des concentrations en ions de l'hémolymphe par rapport aux concentrations ioniques des lots témoins. Une faible mortalité est observée. Lorsque le milieu ayant un pH acide est de surcroît faiblement minéralisé, une forte mortalité se produit et les pertes ioniques sont plus prononcées.

Afin de savoir si les perturbations de la régulation ionique sont réversibles, des insectes sont exposés à un milieu acidifié (4.6PMAI) pendant huit jours, puis transférés dans un milieu contrôle (pH proche de la neutralité et minéralisation "normale" ; 6.6M).

La mortalité ainsi que les concentrations en chlorures et en sodium dans l'hémolymphe des larves sont suivies pour évaluer la réponse physiologique.

#### VI.1.2. Protocole expérimental

Dans cette partie, les milieux expérimentaux, ainsi que les différentes techniques employées ne sont décrites que de façon succincte, les détails ayant été donnés dans le chapitre II.

### VI.1.2.1. Milieux expérimentaux

Deux types de milieux sont utilisés dans cette expérience :

- un milieu acidifié, peu minéralisé et enrichi en aluminium, 4.6PMAI,
- un milieu contrôle dont les caractéristiques physico-chimiques sont proches de celles du milieu d'origine des larves, 6.6M.

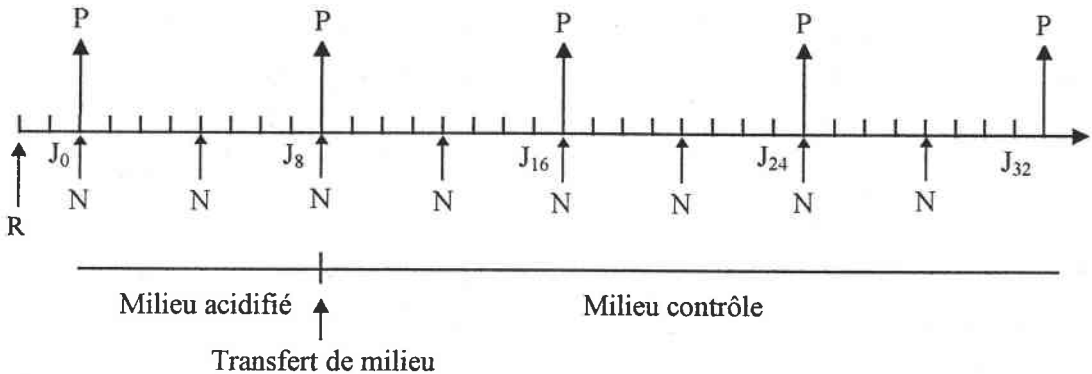
Leurs principales caractéristiques sont données dans le tableau XXVIII.

Tableau XXVIII : Concentrations nominales pour les principales caractéristiques des deux milieux expérimentaux : contrôle (6.6M) et acidifié (4.6PMAI).

Paramètre	Unités	Milieu contrôle 6.6M	Milieu acidifié 4.6PMAI
pH		6.6	4.6
Minéralisation	mg.l <sup>-1</sup>	82	25
Aluminium total	mg.l <sup>-1</sup>	0.01	0.54

### VI.1.2.2. Protocole de prélèvement

Les larves de *Dinocras cephalotes* (70 individus) sont prélevées dans la rivière "La Plaine". Après acclimatation de 48 heures, elles sont exposées à partir de J<sub>0</sub> au milieu acidifié (4.6PMAI) pendant huit jours. Elles sont ensuite transférées dans le milieu contrôle (6.6M), et suivies pendant 24 jours (Figure 50).



P : Prélèvement d'hémolymphe    R : Récolte des larves    N : Nutrition des larves

Figure 50 : Déroulement de l'expérience au laboratoire.

Les prélèvements d'hémolymphe sont réalisés tous les huit jours :

- à  $J_0$ , pour déterminer les concentrations initiales (5 individus),
- à  $J_8$ , pour déterminer les niveaux en chlorures et en sodium atteints dans l'hémolymphe des larves exposées au milieu acidifié pendant huit jours (7 individus),
- à  $J_{16}$ ,  $J_{24}$  et  $J_{32}$ , pour évaluer l'évolution des concentrations en chlorures et en sodium dans l'hémolymphe des larves transférées (7 individus pour chaque temps).

### VI.1.3. Résultats

#### VI.1.3.1. Milieux d'exposition

Les résultats du suivi physico-chimique des milieux expérimentaux sont donnés dans le tableau XXIX.

Tableau XXIX : Résultats des contrôles physico-chimiques (concentration moyenne  $\pm$  écart-type) réalisés dans les deux milieux d'exposition, 6.6M et 4.6PMAI. (n = nombre de mesures)

	Unités	Milieu contrôle / 6.6M		Milieu acidifié / 4.6PMAI	
pH		6.61 $\pm$ 0.06	n = 96	4.65 $\pm$ 0.1	n = 32
T°C	°C	15.1 $\pm$ 0.6	n = 96	14.7 $\pm$ 0.6	n = 32
Conductivité	$\mu\text{S.cm}^{-1}$	88.6 $\pm$ 2.2	n = 96	21.9 $\pm$ 1.2	n = 32
Minéralisation*	$\text{mg.l}^{-1}$	84.0 $\pm$ 2.1	n = 96	29.9 $\pm$ 1.6	n = 32
Sodium	$\text{mg.l}^{-1}$	6.9 $\pm$ 0.2	n = 16	0.7 $\pm$ 0.1	n = 10
Calcium	$\text{mg.l}^{-1}$	5.0 $\pm$ 0.2	n = 16	0.6 $\pm$ 0.06	n = 10
Potassium	$\text{mg.l}^{-1}$	3.9 $\pm$ 0.7	n = 16	0.3 $\pm$ 0.1	n = 10
Magnésium	$\text{mg.l}^{-1}$	2.0 $\pm$ 0.05	n = 16	0.2 $\pm$ 0.02	n = 10
Chlorures	$\text{mg.l}^{-1}$	8.1 $\pm$ 1.2	n = 16	1.0 $\pm$ 0.2	n = 10
Nitrates	$\text{mg.l}^{-1}$	6.1 $\pm$ 0.8	n = 16	6.5 $\pm$ 0.4	n = 10
Sulfates	$\text{mg.l}^{-1}$	14.4 $\pm$ 2.1	n = 16	1.6 $\pm$ 0.1	n = 10
Aluminium total	$\text{mg.l}^{-1}$	0.01 $\pm$ 0.001	n = 16	0.60 $\pm$ 0.04	n = 10
Alcalinité	$\text{meq.l}^{-1}$	0.09 $\pm$ 0.03	n = 6	-0.06 $\pm$ 0.02	n = 3

\* la minéralisation est calculée à partir des données de conductivité selon les formules données dans le § II.5.3.

La composition physico-chimique des deux milieux d'exposition est proche de celle définie pour chacun des milieux lors des expériences précédentes. La concentration en aluminium du milieu

acidifié (4.6PMAI) de  $0.60 \text{ mg.l}^{-1}$  est, toutefois, légèrement supérieure aux concentrations précédemment expérimentées ( $0.50$  et  $0.43 \text{ mg.l}^{-1}$ ).

### VI.1.3.2. Mortalité

La mortalité commence dès le 2<sup>ème</sup> jour de l'expérience (Figure 51) . D'abord faible, elle devient élevée à partir du 4<sup>ème</sup> jour, atteignant le nombre de 7 morts à J<sub>5</sub> ; elle se poursuit jusqu'au jour du transfert pour atteindre 25 larves mortes à J<sub>7</sub>.

Après avoir été transférées dans le milieu témoin, un taux de mortalité semblable à celui des jours précédents (5 morts) est relevé le premier jour du transfert (J<sub>8</sub>). Trois larves sont trouvées mortes le lendemain (J<sub>9</sub>). Une seule larve est retrouvée morte le 10<sup>ème</sup>, ainsi que le 11<sup>ème</sup> et 23<sup>ème</sup> jour de l'expérience. Pendant les 24 jours suivant le transfert des larves du milieu acidifié vers le milieu contrôle, 11 individus sont morts dont 8 pendant les deux premiers jours suivant le transfert.

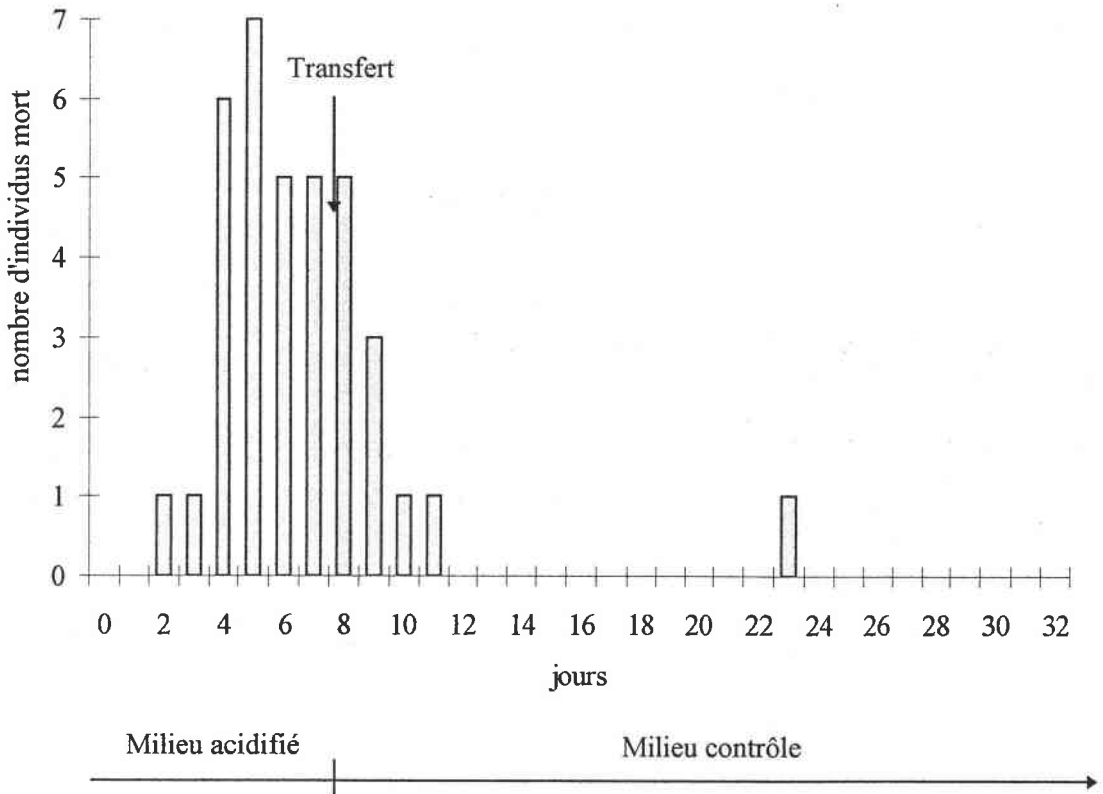


Figure 51 : Mortalité relevée pendant les 32 jours d'expérience.

### VI.1.3.3. Concentrations en chlorures et en sodium dans l'hémolymphe

Les concentrations moyennes en chlorures et en sodium dans l'hémolymphe des larves du lot témoin sont respectivement de  $94$  et de  $114 \text{ mmol.l}^{-1}$  (Figures 52 a et b).

Après sept jours d'exposition dans le milieu acidifié, une diminution très significative de ces teneurs est constatée. La concentration moyenne en chlorures est alors de 20 mmol.l<sup>-1</sup>, ce qui représente une perte de 80 % avec pour certaines larves de ce lot, des minima de concentration en chlorures inférieurs à 15 mmol.l<sup>-1</sup> (Figure 52 a). Bien que significative, la perte en ions sodium est proportionnellement moins marquée que celle observée pour les ions chlorures ; elle est de 74 %, soit 6 % de moins que pour les ions chlorures (Figure 52 b).

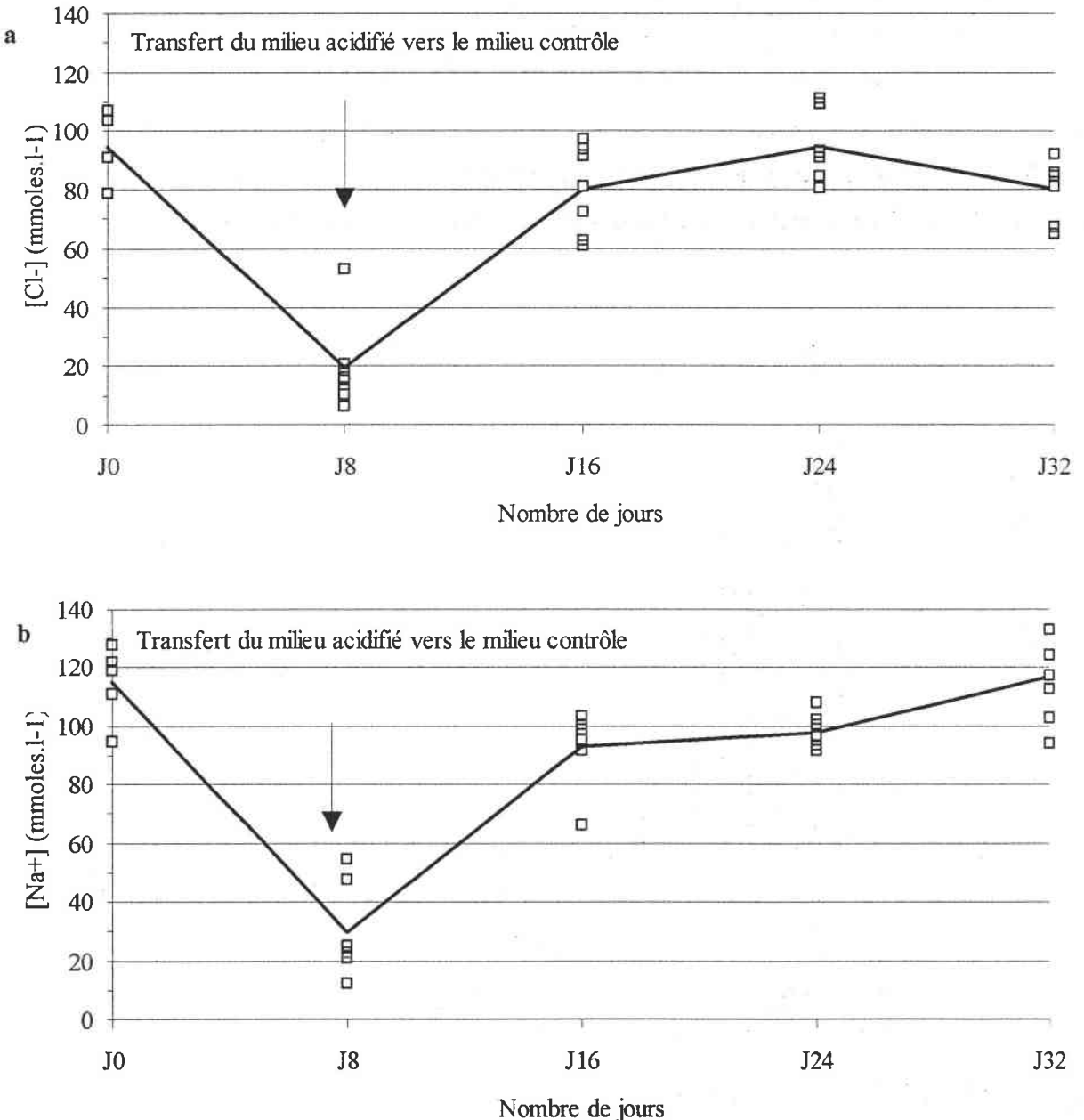


Figure 52 : Concentrations moyennes en chlorures (a) et en sodium (b) dans l'hémolymphe des larves avant (J<sub>0</sub>) et après exposition au milieu acidifié (4,6PMAI / J<sub>8</sub>) et transfert dans le milieu contrôle (6.6M / J<sub>16</sub>, J<sub>24</sub>, J<sub>32</sub>). Les traits noirs représentent l'évolution des concentrations moyennes, les carrés les valeurs individuelles.

Une semaine après le transfert ( $J_{16}$ ) vers le milieu contrôle, les concentrations moyennes en chlorures mesurées dans l'hémolymphe ont augmenté de façon significative. Elles n'ont, toutefois, pas atteint le niveau initial déterminé pour les larves du lot témoin. En moyenne, elles sont quatre fois plus élevées que celles obtenues avant le transfert à  $J_8$ . Dans le lot, les larves récupèrent plus ou moins vite. Ainsi, certaines présentent des concentrations en chlorures et en sodium similaires à celles mesurées dans l'hémolymphe des larves témoins. D'autres montrent une augmentation significative dans la teneur en ion sodium alors que le niveau des chlorures est toujours inférieur au niveau initial. D'autres, enfin, ont des concentrations en ces deux ions inférieures à celles mesurées à  $J_0$ . Les pertes en sodium paraissent plus facilement compensées que celles en chlorures.

Deux semaines après le transfert ( $J_{24}$ ), la concentration moyenne en chlorures dans l'hémolymphe est équivalente à celle déterminée initialement. Les concentrations moyennes en sodium continuent à augmenter et cela, pour toutes les larves comme en témoigne l'écart-type très faible dans ce lot.

A l'issue des trois semaines suivant le transfert vers le milieu contrôle ( $J_{32}$ ), la concentration en chlorures accuse encore une baisse significative, mais, reste élevée (environ 80 mmol.l<sup>-1</sup>). La concentration en sodium est très significativement supérieure à celle mesurée la semaine précédente. Le niveau atteint ne présente aucune différence significative avec celui déterminé pour les larves du lot témoin.

Lorsque l'hémolymphe est prélevée sur des larves témoins ou ayant été exposées en laboratoire à des milieux n'entraînant pas d'effets marqués, un volume de 5 µl d'hémolymphe environ est aisément récupéré. A l'opposé, lorsque les conditions d'exposition produisent un stress chez la larve, le prélèvement est difficile à réaliser car l'hémolymphe plus visqueuse obstrue le tube capillaire utilisé pour cette fonction ; un prélèvement n'a pas été possible sur une des larves dans le lot pris à  $J_8$ .

Les facteurs de dilution avant l'analyse ionique correspondent au rapport suivant :

$$Fd = \frac{\text{Volume d'hémolymphe prélevé} + \text{volume d'eau nanopure (5000}\mu\text{l)}}{\text{volume d'hémolymphe prélevé}}$$

et sont un bon reflet de la diminution du volume d'hémolymphe prélevé. Plus Fd est élevé, moins le volume d'hémolymphe prélevé est important.

Le facteur de dilution moyen calculé pour le lot de larves exposées au milieu acidifié pendant huit jours est très significativement plus élevé que celui déterminé pour le lot des larves témoins (Tableau XXX). Après 8 jours de transfert vers le milieu contrôle ( $J_{16}$ ), la valeur du facteur de dilution moyen a diminué par rapport à  $J_8$ , mais elle reste plus élevée que celle du lot témoin, même si la différence n'est pas significative.

Au 24<sup>ème</sup> jour d'expérience, soit après 16 jours d'exposition au milieu contrôle, le facteur de dilution présente une valeur qui n'est pas significativement différente de celle calculée pour le lot témoin. A la fin de l'expérience, le facteur de dilution retrouve une valeur équivalente à celle mesurée à  $J_0$ .

Tableau XXX : Facteur de dilution moyen calculé pour chaque série de prélèvement d'hémolymphe des larves témoins ( $J_0$ ), exposées au milieu acidifié pendant huit jours (4.6PMAI /  $J_8$ ), puis transférées dans le milieu contrôle (6.6M /  $J_{16}$ ,  $J_{24}$ ,  $J_{32}$ ). (moyenne  $\pm$  écart-type ; n = nombre d'individus échantillonnés ; \* : valeur significativement différente par rapport à celle du témoin,  $J_0$  ;  $p < 0.05$ ).

Milieu	4.6PMAI		6.6M		
Jour d'expérience	$J_0$	$J_8$	$J_{16}$	$J_{24}$	$J_{32}$
Facteur de dilution	1016 $\pm$ 108 n = 5	3522 $\pm$ 1461* n = 7	1788 $\pm$ 922 n = 7	1399 $\pm$ 660 n = 7	1173 $\pm$ 294 n = 7

Cette expérience montre que la perte en ions chlorures et sodium mesurée dans l'hémolymphe des larves de *Dinocras cephalotes* exposées à un milieu acidifié est un phénomène réversible. L'insecte, lorsqu'il survit à une exposition de 8 jours dans un milieu acide, peu minéralisé et riche en aluminium, a la capacité de récupérer les ions perdus lorsqu'il est transféré dans un milieu avec un pH proche de la neutralité et une minéralisation élevée. Dans ces conditions, le prélèvement actif des ions dans le milieu extérieur est facilité. D'une part, le sodium n'est plus en compétition avec les protons et, d'autre part, tous les ions sont présents en quantité suffisante dans le milieu extérieur pour être prélevés par la larve. L'influence de l'aluminium, dont la spéciation est modifiée par le changement de pH, est également supprimée par ce transfert.

## **VI.2. EVALUATION DE L'IMPACT DES CATIONS CALCIUM, SODIUM, POTASSIUM ET MAGNESIUM SUR LA REGULATION IONIQUE DES LARVES EXPOSEES A UN MILIEU ACIDIFIE**

### **VI.2.1. Objectifs**

Plusieurs questions découlent de l'expérience précédente :

- tous les ions étant en quantité élevée dans le milieu contrôle (6.6M) où sont transférées les larves préalablement stressées dans un milieu acidifié (4.6PMAl), il n'est donc pas possible de dégager l'importance respective de chacun d'eux dans le phénomène de récupération ionique observé.
- de plus, le changement de pH du milieu d'exposition des larves lors du transfert a supprimé les effets des protons et de l'aluminium sur les concentrations hémolympatiques. La récupération se serait-elle produite dans le cas contraire ?

L'objectif de cette expérience est donc de mettre en évidence les effets d'une concentration élevée en un cation donné (calcium, sodium, potassium ou magnésium) face à une concentration en protons et en aluminium élevée. Pour cela, des larves de *Dinocras cephalotes* sont exposées à un milieu de type acidifié (pH acide, faible minéralisation et forte concentration en aluminium), mais, auquel est ajoutée une quantité déterminée d'un cation donné.

### **VI.2.2. Protocole expérimental**

Les protocoles rappelés dans ce paragraphe ont été décrits plus en détail dans le chapitre II (matériel et méthodes).

#### **VI.2.2.1. Milieux expérimentaux**

Dix milieux sont constitués pour cette expérience :

- un milieu contrôle (6.6M),
- un milieu acidifié (4.6PMAl),
- huit milieux (4.6PM1Al à 4.6PM8Al). Ces milieux ont en commun le de type acidifié : un pH de 4.6, une concentration en aluminium total de  $0.54 \text{ mg.l}^{-1}$  et une faible minéralisation générale. Ils se différencient par la concentration en un cation donné (Tableau XXXI).



Tableau XXXI : Composition nominale en cations pour les dix milieux utilisés au cours de l'expérience.

Cation ajouté	Code du milieu	Calcium mg.l <sup>-1</sup>	Sodium mg.l <sup>-1</sup>	Potassium mg.l <sup>-1</sup>	Magnésium mg.l <sup>-1</sup>
	6.6M	5.0	7.0	2.0	2.0
	4.6PMAI	0.6	1.0	0.4	0.2
Calcium	4.6PM1A1	5.0	1.0	0.4	0.2
	4.6PM2A1	5.0	1.0	0.4	0.2
Sodium	4.6PM3A1	0.6	7.0	0.4	0.2
	4.6PM4A1	0.6	7.0	0.4	0.2
Potassium	4.6PM5A1	0.6	1.0	2.0	0.2
	4.6PM6A1	0.6	1.0	2.0	0.2
Magnésium	4.6PM7A1	0.6	1.0	0.4	2.0
	4.6PM8A1	0.6	1.0	0.4	2.0

Ainsi, 4.6PM1A1 et 4.6PM2A1 sont plus riches en calcium, 4.6PM3A1 et 4.6PM4A1 plus riches en sodium, 4.6PM5A1 et 4.6PM6A1 plus riches en potassium et 4.6PM7A1 et 4.6PM8A1 plus riches en magnésium.

Pour chaque milieu, la concentration du cation déterminé pour être plus élevée est fixée au même niveau que celle du milieu contrôle ; celles des trois autres cations étant du même ordre que celles fixées pour le milieu acidifié.

Chaque cation est ajouté au milieu sous forme de sels, sulfates ou chlorures (Tableau XXXII).

Tableau XXXII : Liste des différents sels ajoutés dans chaque milieu pour obtenir les concentrations en cations.

Code du milieu	Cation ajouté	Sel utilisé
4.6PM1A1	Ca <sup>++</sup>	CaCl <sub>2</sub>
4.6PM2A1	Ca <sup>++</sup>	CaSO <sub>4</sub>
4.6PM3A1	Na <sup>+</sup>	NaCl
4.6PM4A1	Na <sup>+</sup>	Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>
4.6PM5A1	K <sup>+</sup>	KCl
4.6PM6A1	K <sup>+</sup>	K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>
4.6PM7A1	Mg <sup>++</sup>	MgCl <sub>2</sub>
4.6PM8A1	Mg <sup>++</sup>	MgSO <sub>4</sub>

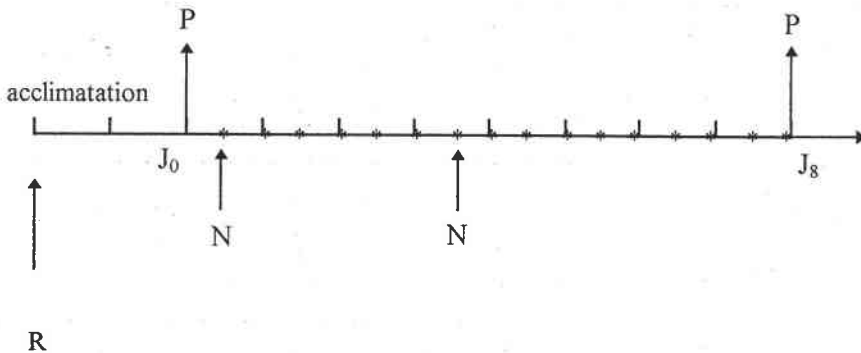
Les sulfates sont utilisés en raison de leur prédominance dans les problèmes d'acidification des eaux de surface. Les sels à base de chlorures sont également utilisés car, ces anions sont des constituants essentiels de l'hémolymphe.

### VI.2.2.2. Protocole de prélèvement

Les larves (110 individus) sont prélevées dans la rivière "La Plaine", deux jours avant le début de l'expérience qui dure huit jours (Figure 53). Quatre d'entre elles sont mortes pendant la période d'acclimatation.

A  $J_0$ , les concentrations initiales en chlorures et en sodium de l'hémolymphe sont mesurées sur un lot de six larves. Les autres larves sont séparées en dix lots de 10 individus dont chacun est exposé à un milieu différent. Après huit jours, l'hémolymphe est prélevée sur les larves restantes de chaque milieu.

Pendant la durée de l'expérience, les paramètres pH, conductivité et température sont mesurés à chaque renouvellement de milieu. Des prélèvements sont effectués régulièrement pour contrôler les autres paramètres physico-chimiques.



R : Récolte des larves ; P : Prélèvement d'hémolymphe ; \* : Renouvellement des milieux ; N : Nutrition

Figure 53 : Protocole suivi pendant l'expérience.

## VI.2.3. Résultats

### VI.2.3.1. Milieux d'exposition

Les pH mesurés correspondent à ceux fixés par le protocole. De plus, vis à vis de ce facteur, aucune différence significative n'est observée entre tous les milieux ayant un pH acide (Tableau XXXIII).

Tableau XXXIII : Caractéristiques physico-chimiques mesurées pendant les huit jours d'expérience dans les dix milieux expérimentaux différents. (moyenne  $\pm$  écart-type ; n = nombre de mesures).

Paramètres	Unités	n	6.6M	4.6PMAI	4.6PM1AI + CaCl <sub>2</sub>	4.6PM2AI + CaSO <sub>4</sub>	4.6PM3AI + NaCl	4.6PM4AI + Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	4.6PM5AI + KCl	4.6PM6AI + K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	4.6PM7AI + MgCl <sub>2</sub>	4.6PM8AI + MgSO <sub>4</sub>
pH		36	6.61 $\pm$ 0.05	4.67 $\pm$ 0.1	4.71 $\pm$ 0.1	4.67 $\pm$ 0.1	4.68 $\pm$ 0.1	4.68 $\pm$ 0.1	4.67 $\pm$ 0.1	4.66 $\pm$ 0.1	4.66 $\pm$ 0.1	4.67 $\pm$ 0.1
Conductivité	$\mu\text{s.cm}^{-1}$	36	87.1 $\pm$ 1.5	23.8 $\pm$ 1.4	51.6 $\pm$ 1.8	53.1 $\pm$ 1.6	53.4 $\pm$ 1.8	54.1 $\pm$ 1.7	33.8 $\pm$ 1.9	33.4 $\pm$ 1.6	44.7 $\pm$ 2.0	46.5 $\pm$ 2.3
Minéralisation	$\text{mg.l}^{-1}$	36	82.5 $\pm$ 1.4	32.5 $\pm$ 1.9	48.9 $\pm$ 1.7	50.3 $\pm$ 1.5	50.6 $\pm$ 1.7	51.3 $\pm$ 1.6	46.1 $\pm$ 2.6	45.6 $\pm$ 2.2	61.0 $\pm$ 2.7	63.5 $\pm$ 3.1
Calcium	$\text{mg.l}^{-1}$	8	5.0 $\pm$ 0.1	0.6 $\pm$ 0.04	5.1 $\pm$ 0.3	5.1 $\pm$ 0.3	0.8 $\pm$ 0.06	0.8 $\pm$ 0.06	0.7 $\pm$ 0.08	0.8 $\pm$ 0.06	0.8 $\pm$ 0.07	0.8 $\pm$ 0.05
Sodium	$\text{mg.l}^{-1}$	8	7.2 $\pm$ 0.3	1.0 $\pm$ 0.06	0.3 $\pm$ 0.1	1.2 $\pm$ 0.08	6.7 $\pm$ 0.5	7.0 $\pm$ 0.4	1.2 $\pm$ 0.1	1.2 $\pm$ 0.1	1.2 $\pm$ 0.1	1.2 $\pm$ 0.1
Potassium	$\text{mg.l}^{-1}$	8	4.5 $\pm$ 1.3	0.4 $\pm$ 0.1	0.4 $\pm$ 0.1	0.4 $\pm$ 0.1	0.4 $\pm$ 0.1	0.5 $\pm$ 0.1	1.7 $\pm$ 0.2	1.8 $\pm$ 0.3	0.5 $\pm$ 0.1	0.3 $\pm$ 0.1
Magnésium	$\text{mg.l}^{-1}$	8	2.0 $\pm$ 0.05	0.2 $\pm$ 0.02	0.2 $\pm$ 0.01	0.2 $\pm$ 0.02	0.2 $\pm$ 0.02	0.2 $\pm$ 0.02	0.3 $\pm$ 0.02	0.2 $\pm$ 0.02	1.9 $\pm$ 0.1	2.0 $\pm$ 0.2
Aluminium	$\text{mg.l}^{-1}$	8	11 $\pm$ 2	523 $\pm$ 51	479 $\pm$ 62	517 $\pm$ 82	530 $\pm$ 40	476 $\pm$ 55	450 $\pm$ 121	472 $\pm$ 57	540 $\pm$ 45	520 $\pm$ 21
Chlorures	$\text{mg.l}^{-1}$	8	10.5 $\pm$ 0.2	1.6 $\pm$ 0.2	9.8 $\pm$ 0.5	1.9 $\pm$ 0.2	10.3 $\pm$ 0.5	1.8 $\pm$ 0.1	3.1 $\pm$ 0.3	2.1 $\pm$ 0.5	7.4 $\pm$ 0.4	1.9 $\pm$ 0.2
Nitrates	$\text{mg.l}^{-1}$	8	6.4 $\pm$ 0.2	5.7 $\pm$ 0.3	6.3 $\pm$ 0.4	6.1 $\pm$ 0.3	6.0 $\pm$ 0.3	6.0 $\pm$ 0.2	5.8 $\pm$ 0.3	5.9 $\pm$ 0.5	5.9 $\pm$ 0.3	6.2 $\pm$ 0.4
Sulfates	$\text{mg.l}^{-1}$	8	19.3 $\pm$ 0.5	2.1 $\pm$ 0.1	2.8 $\pm$ 0.3	13.5 $\pm$ 0.9	2.7 $\pm$ 0.2	15.3 $\pm$ 1.2	3.0 $\pm$ 0.3	4.3 $\pm$ 0.3	2.5 $\pm$ 0.1	10.5 $\pm$ 0.7
Alcalinité	$\text{meq.l}^{-1}$	4	0.06 $\pm$ 0.03	-0.02 $\pm$ 0.01	-0.03 $\pm$ 0.01	-0.04 $\pm$ 0.02	-0.02 $\pm$ 0.01	-0.03 $\pm$ 0.01	-0.02 $\pm$ 0.01	-0.02 $\pm$ 0.01	-0.02 $\pm$ 0.01	-0.02 $\pm$ 0.01
Température	$^{\circ}\text{C}$	36	14.0 $\pm$ 0.9	14.0 $\pm$ 0.9	14.1 $\pm$ 0.91	14.1 $\pm$ 0.9	14.2 $\pm$ 0.9	14.2 $\pm$ 0.9	14.2 $\pm$ 0.9	14.3 $\pm$ 0.9	14.4 $\pm$ 1.0	14.3 $\pm$ 1.0

La minéralisation calculée pour les milieux contrôle (6.6M) et acidifié (4.6PMAI) est similaire à celle obtenue pour ces mêmes types de milieu dans les précédentes expériences. Tous les autres milieux (de 4.6PM1AI à 4.6PM8AI) utilisés pendant cette expérience sont des milieux initialement acidifiés ayant été enrichis avec un sel. De ce fait, leur minéralisation est supérieure à celle mesurée pour le milieu acidifié 4.6PMAI.

Les concentrations moyennes en calcium, sodium, et magnésium mesurées dans chaque milieu enrichi en un de ces cations correspondent aux concentrations nominales et à celles du milieu contrôle. Pour le potassium, la concentration moyenne mesurée dans les milieux 4.6PM5AI et 4.6PM6AI correspond à celle attendue dans le protocole. Toutefois, elle est inférieure à celle mesurée dans le milieu contrôle. Comme pour les expériences précédentes, le potassium apporté par l'hydroxyde de potassium utilisé pour ajuster le pH n'est pas pris en compte dans les concentrations nominales.

Quand les sels ajoutés sont à base de chlorures, les concentrations moyennes en cet ion dans les milieux 4.6PM1AI et 4.6PM3AI sont proches de celles mesurées dans le milieu 6.6M tandis que, les concentrations moyennes en chlorures des milieux 4.6PM5AI et 4.6PM7AI sont plus faibles.

Dans les milieux n'ayant pas eu de sels de chlorures ajoutés, les concentrations moyennes mesurées pour cet anion sont comparables à celles du milieu acidifié (4.6PMAI).

Malgré l'ajout de sels de sulfates dans certains milieux, les concentrations en sulfates obtenues sont significativement plus faibles que celles obtenues dans le milieu contrôle.

Toutes les autres concentrations moyennes en cations et anions non modifiées par l'ajout des différents sels dans les milieux sont similaires à celles du milieu acidifié.

### **VI.2.3.2. Effets sur les larves**

#### **VI.2.3.2.1. Mortalité**

Aucune mortalité ne se produit dans le milieu contrôle (Figure 54). Dans le milieu acidifié, 6 larves sont mortes, dont trois le deuxième jour ( $J_2$ ). Pour tous les autres milieux, la mortalité la moins élevée est observée pour les deux milieux ayant une concentration en calcium élevée (4.6PM1AI et 4.6PM2AI), tandis que les milieux 4.6PM5AI (avec KCl ajouté) et 4.6PM3AI (avec NaCl ajouté) présentent à huit jours la même mortalité que le milieu acidifié.

#### **VI.2.3.2.2. Concentrations en chlorures et en sodium dans l'hémolymphe**

Les concentrations moyennes initiales en chlorures et sodium mesurées dans l'hémolymphe des larves du lot témoin ( $J_0$ ) sont égales chacune à 104 mmol.L<sup>-1</sup> (Figure 55).

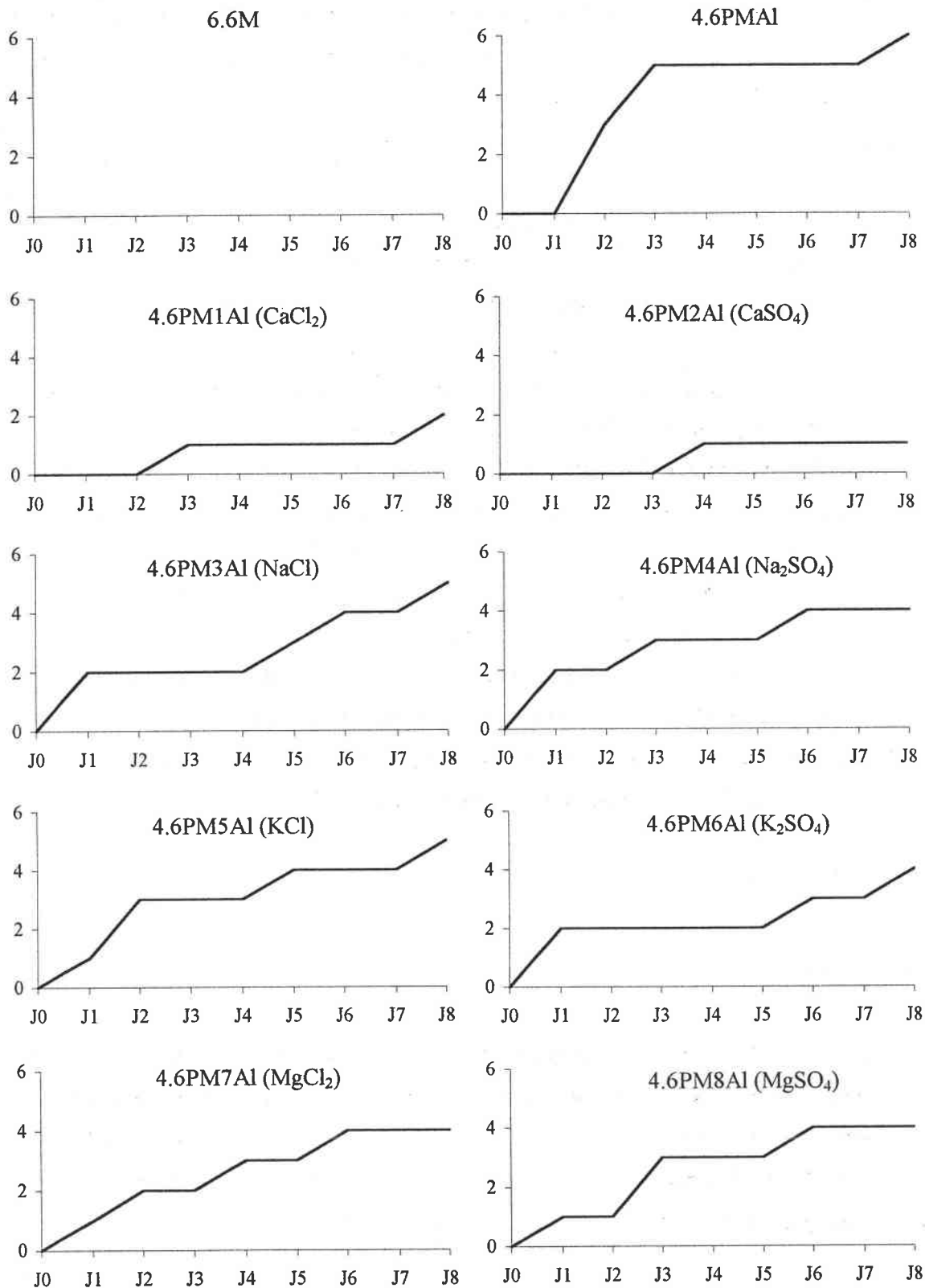


Figure 54 : Mortalité cumulée dans les dix milieux d'exposition en fonction de la durée d'expérience.

Aucune différence significative n'est mesurée entre les concentrations ioniques mesurées dans l'hémolymphe des larves du lot témoin et celles du lot exposé huit jours au milieu contrôle (6.6M).

Les concentrations en chlorures et en sodium hémolympatiques déterminées pour les larves ayant été exposées au milieu acidifié (4.6PMAI) pendant huit jours montrent une diminution très significative ( $p < 0.01$ ) par rapport aux concentrations initiales. Toutefois, la perte mesurée au cours de cette expérience n'atteint pas les niveaux obtenus lors des expériences précédentes utilisant ce type de milieu. La baisse mesurée dans ce cas, représente une diminution de 34 et 29 %, respectivement en chlorures et en sodium par rapport aux concentrations initiales.

Les concentrations moyennes en chlorures et en sodium mesurées dans l'hémolymphe des larves exposées aux deux milieux enrichis en calcium (4.6PM1Al et 4.6PM2Al) sont significativement plus faibles ( $p < 0.05$ ) que celles mesurées pour le lot témoin tandis qu'elles ne montrent aucune différence significative avec celles du lot exposé au milieu acidifié (4.6PMAI) (Figure 55). Ainsi, une perte en ces deux ions s'est produite malgré la concentration en calcium plus élevée. Un prélèvement n'a pas été possible sur une des larves exposées dans le milieu 4.6PM2Al.

Les diminutions observées sont du même ordre pour les deux milieux considérés. La nature du sel ajouté (chlorure de calcium ou sulfate de calcium) ne semble pas avoir eu d'influence spécifique supplémentaire.

Aucune différence significative n'apparaît entre les concentrations moyennes mesurées dans le lot témoin et celles des lots exposés aux milieux enrichis en sodium (4.6PM3Al et 4.6PM4Al) (Figure 55). Entre ces deux derniers milieux, les concentrations en chlorures et en sodium hémolympatiques ne sont pas significativement différentes quelque soit le sel de sodium ajouté (sulfates ou chlorures). Toutefois, celles mesurées dans le milieu 4.6PM3Al enrichi en chlorures de sodium sont respectivement de 90 et 96 mmol.l<sup>-1</sup> tandis que dans celui avec du sulfate de sodium, elles sont un peu plus élevées atteignant respectivement 94 et 100 mmol.l<sup>-1</sup>. Le sulfate de sodium semble donc avoir un effet bénéfique légèrement plus marqué que le chlorure de sodium, même si cette différence n'est pas significative.

L'exposition de larves à un milieu acidifié enrichi en potassium met en évidence une diminution significative ( $p < 0.05$ ) des concentrations en chlorures et en sodium dans leur hémolymphe par rapport à celles mesurées à J<sub>0</sub> (Figure 55). Une forte variation interindividuelle, caractérisée par un coefficient de variation de 50 % pour les chlorures et de 35 % pour le sodium apparaît dans les lots d'individus exposés à ces deux milieux.

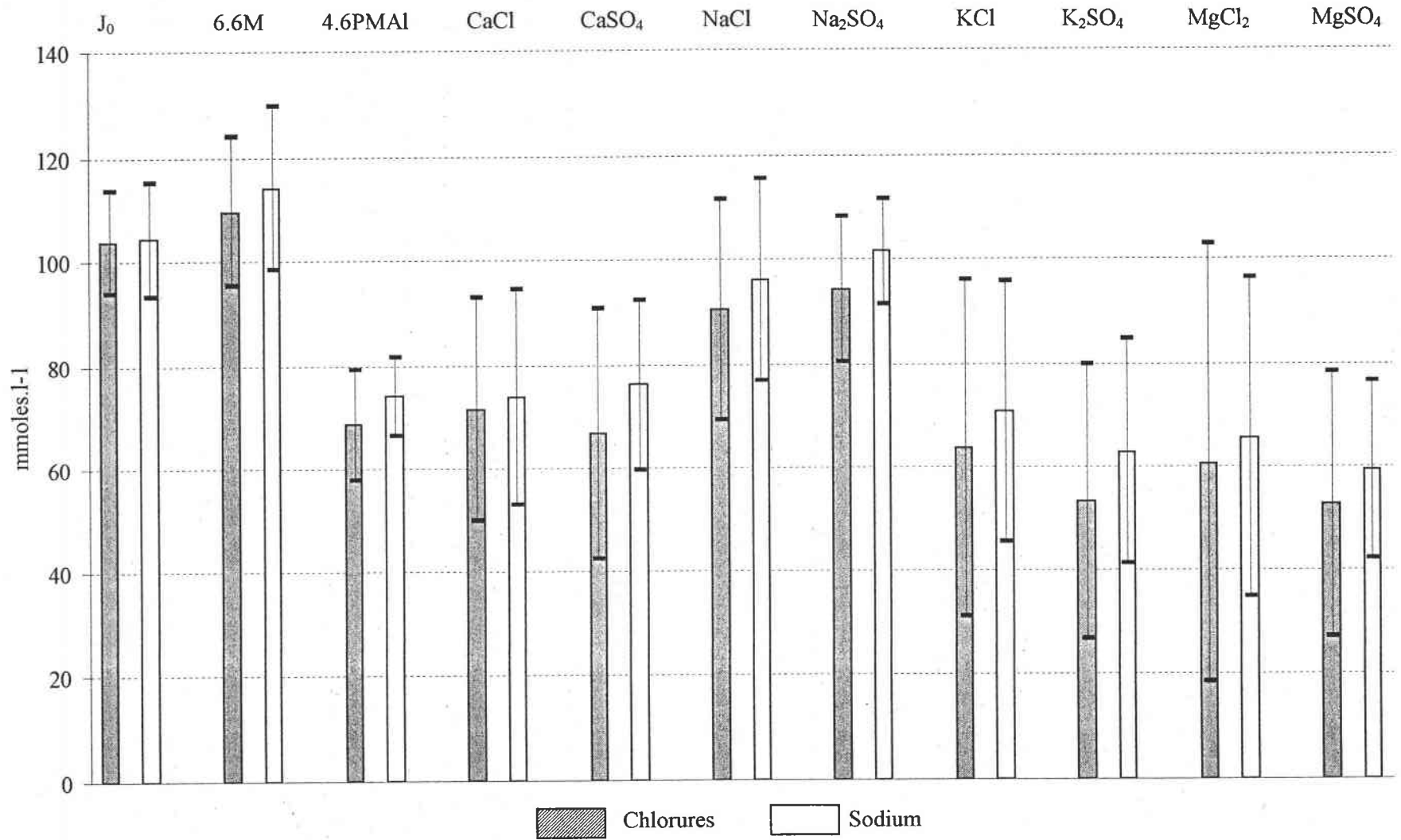


Figure 55 : Concentrations en chlorures et en sodium mesurées dans l'hémolymphe des larves des lots témoin ( $J_0$ ) et après 8 jours d'exposition dans les dix milieux différents. Les barres verticales représentent l'écart-type sur la moyenne des mesures.

Les pertes en chlorures et en sodium sont plus élevées dans l'hémolymphe des larves exposées au milieu enrichi en potassium par du sulfate de potassium par rapport à celui enrichi par du chlorure de potassium. Cette différence n'est toutefois pas significative. Comparées aux résultats obtenus pour les concentrations des larves exposées au milieu acidifié, les pertes observées dans les deux milieux enrichis en potassium sont significativement plus élevées.

Ces remarques sont identiques pour les milieux enrichis en magnésium. Les concentrations moyennes en chlorures et en sodium diminuent significativement par rapport aux concentrations initiales et à celles mesurées dans le milieu acidifié. Un prélèvement a été impossible pour une des larves du milieu enrichi en  $MgCl_2$ . Les pertes ioniques mesurées sont plus nettes dans le milieu additionné de sulfate de magnésium, que dans celui enrichi en chlorures de magnésium. La différence n'est toutefois pas significative.

Suite à cette expérience, le sodium apparaît être le cation ayant l'effet le plus marqué sur la régulation ionique des larves de *Dinocras cephalotes*. Ainsi, dans les lots de larves exposés aux deux milieux enrichis en sodium (4.6PM3Al et 4.6 PM4Al), aucune perte significative en chlorures et en sodium de l'hémolymphe n'a été mesurée. Toutefois, la mortalité évaluée dans ces lots est élevée.

### **VI.3. EFFETS DES CARBONATES DE SODIUM ET DE CALCIUM SUR DES LARVES DE *DINOCRAS CEPHALOTES***

#### **VI.3.1. Objectifs**

Les deux produits les plus employés dans la lutte contre l'acidification des cours d'eau sont le carbonate de sodium ( $Na_2CO_3$ ) et le carbonate de calcium ( $CaCO_3$ ) (cf. § 1.2.2.2.1.). Ajoutés à un milieu acidifié, ils entraînent d'une façon générale une amélioration de la qualité de l'eau mise en évidence, notamment par l'augmentation du pH et de l'alcalinité. De plus, selon le produit utilisé, l'eau est enrichie en ions sodium ou en ions calcium.

Une expérience est réalisée en laboratoire afin de tester l'effet de ces deux sels carbonatés sur la régulation ionique de *Dinocras cephalotes*. Les critères d'évaluation de leurs effets sont la mortalité et les concentrations en chlorures et en sodium dans l'hémolymphe.



## VI.3.2. Protocole expérimental

Deux approches sont suivies :

- dans la première, des larves de *Dinocras cephalotes* sont exposées à des milieux initialement acidifiés dans lesquels sont ajoutés du carbonate de sodium ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ) ou du carbonate de calcium ( $\text{CaCO}_3$ ). L'évolution des concentrations ioniques dans l'hémolymphe des larves et celle des paramètres physico-chimiques dans les deux milieux d'exposition sont suivies pendant l'expérience,
- dans la deuxième, des larves préalablement stressées dans un milieu acidifié sont transférées dans les milieux enrichis en carbonates de sodium ou de calcium.

Tous les détails sur la composition des milieux, leur mode de préparation et les différentes techniques analytiques employées dans cette expérience ont été donnés dans le chapitre II.

### VI.3.2.1. Milieux expérimentaux

Quatre milieux sont préparés pour cette expérience :

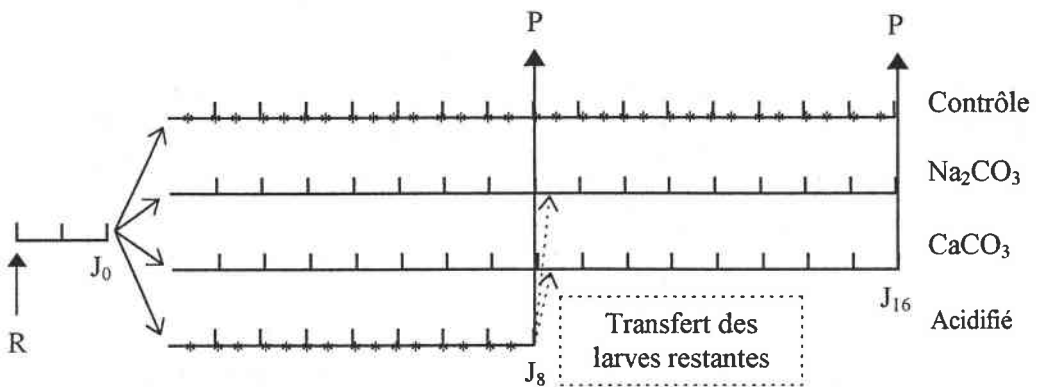
- un milieu contrôle 6.6M.
- un milieu acidifié 4.6PMAI
- deux milieux, initialement de type acidifié, modifiés par l'ajout de carbonate de sodium pour l'un ou de carbonate de calcium pour l'autre. Les quantités de sels apportées sont telles que les concentrations finales en sodium après l'ajout de carbonate de sodium ou en calcium après l'ajout de carbonate de calcium sont équivalentes à celles en ces deux ions dans le milieu contrôle (Tableau XXXIV).

Tableau XXXIV : Caractéristiques attendues pour les principaux paramètres des quatre milieux utilisés pendant l'expérience.

	Unités	6.6M	4.6PMAI	$\text{Na}_2\text{CO}_3^*$	$\text{CaCO}_3^*$
pH		6.6	4.6	évolue selon l'effet du produit ajouté	
Minéralisation	$\text{mg.l}^{-1}$	82	25	évolue selon l'effet du produit ajouté	
Aluminium	$\text{mg.l}^{-1}$	0.01	0.54	0.54	0.54
Sodium	$\text{mg.l}^{-1}$	7.0	0.6	7.0	0.6
Calcium	$\text{mg.l}^{-1}$	5.0	1.0	1.0	5.0

\* les milieux initialement acidifiés dans lesquels ont été ajoutés du carbonate de sodium ou de calcium sont notés respectivement  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  et  $\text{CaCO}_3$ .

### VI.3.2.2. Protocole de prélèvement



R : Récolte des larves ; P : Prélèvement d'hémolymphe ; \* : Renouvellement du milieu

Figure 56 : Protocole suivi pendant les 16 jours d'expérience.

Les larves (90 individus), prélevées dans la rivière "La Plaine", sont laissées ensuite deux jours dans leur milieu d'origine dans la salle d'expérimentation afin de les laisser récupérer du stress qu'elles viennent de subir et s'acclimater aux conditions de lumière et de température ambiantes (Figure 56). Deux larves sont mortes pendant cette phase (2.2 %).

Douze heures avant le début de l'expérience, deux milieux acidifiés sont préparés dans lesquels sont ajoutés un sel de carbonate (Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> ou CaCO<sub>3</sub>). Ils sont ensuite laissés 12 heures afin que leurs différents paramètres se stabilisent. Les variations du pH, par exemple, sont importantes pendant ce laps de temps. Elles passent de 4.6 à 6.9 pour le milieu modifié par du Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> et de 4.6 à 6.6 pour celui additionné de CaCO<sub>3</sub>.

A J<sub>0</sub>, 6 larves sont mises de côté au hasard pour prélever leur hémolymphe. Le reste des larves prélevées est ensuite divisé en quatre lots :

- un lot de 14 larves est exposé au milieu contrôle pendant 16 jours,
- un lot de 14 larves est mis dans le milieu acidifié ayant eu un ajout de carbonate de sodium pendant 16 jours,
- un lot de 14 larves est déposé dans le milieu acidifié ayant eu un ajout de carbonate de calcium pendant 16 jours,
- enfin, le dernier lot de larves (40 individus) est soumis au milieu acidifié pendant huit jours. Passé ce délai, les larves survivantes sont divisées en deux groupes ; l'un est transféré dans le milieu additionné par du carbonate de sodium et l'autre dans celui contenant du carbonate de calcium.

Des prélèvements d'hémolymphe sont réalisés tous les huit jours sur 6 larves de chaque lot à J<sub>8</sub> et sur les larves survivantes à J<sub>16</sub>.

Les milieux 6.6M et 4.6PMAl sont entièrement renouvelés toutes les douze heures. Leur pH, leur conductivité et leur température sont mesurés à chaque renouvellement. Des prélèvements sont effectués régulièrement pour évaluer l'alcalinité et les concentrations en cations, en anions et en aluminium.

Dans le protocole initial, les deux milieux contenant Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> et CaCO<sub>3</sub> ne doivent pas être renouvelés. Toutefois, le pH, la conductivité et la température sont mesurés deux fois par jour afin de suivre leur évolution. Un prélèvement est effectué quotidiennement pour l'analyse des autres paramètres physico-chimiques.

### **VI.3.3. Résultats**

#### **VI.3.3.1. Milieux d'exposition**

Le tableau XXXV donne les moyennes des résultats du suivi physico-chimique des différents milieux. Afin de montrer l'évolution des différents paramètres dans les milieux Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> et CaCO<sub>3</sub>, les minimum et maximum mesurés sont précisés.

Les résultats physico-chimiques obtenus pour le milieu contrôle et le milieu acidifié sont conformes à ceux obtenus pour ce même type de milieu pendant les précédentes expériences. La conductivité du milieu 4.6PMAl est légèrement plus élevée.

Le protocole ne prévoyait pas le renouvellement des deux milieux modifiés par l'ajout des sels de carbonate. Toutefois, une diminution de leur volume étant apparue suite aux prélèvements d'échantillons pour les analyses physico-chimiques, il a été décidé de les réajuster en ajoutant, le huitième jour de l'expérience (J<sub>8</sub>), une solution stabilisée, préparée identiquement aux milieux Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> et CaCO<sub>3</sub> d'origine.

Les figures 57, 58 et 59 représentent l'évolution journalière des différents paramètres dans les deux milieux modifiés par l'ajout de carbonate de sodium ou de calcium.

##### **\* Evolution du pH (Figure 57)**

Le pH du milieu enrichi par du Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> est stable pendant les huit premiers jours de l'expérience (pH = 6.9). Passé cette période, il augmente progressivement jusqu'à la fin de l'expérience pour atteindre finalement la valeur de 7.7.

Tableau XXXV : Valeurs moyennes ( $\pm$  écart-type) des paramètres physico-chimiques mesurés pour les quatre milieux d'exposition pendant les 16 jours d'expérience (n = nombre de mesures ; min. = minimum ; max. = maximum)

	Milieu contrôle		Milieu acidifié		Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>			CaCO <sub>3</sub>		
	moyenne $\pm$ s.d.	n	moyenne $\pm$ s.d.	n	moyenne $\pm$ s.d.	n	min. - max.	moyenne $\pm$ s.d.	n	min. - max.
pH	6.6 $\pm$ 0.1	64	4.6 $\pm$ 0.1	32	7.1 $\pm$ 0.2	33	6.9 - 7.7	7.1 $\pm$ 0.3	33	6.6 - 7.7
Température °C	14.6 $\pm$ 1.3	64	14.6 $\pm$ 1.3	32	15.6 $\pm$ 1.0	33	14 - 18	15.6 $\pm$ 1.0	33	14 - 18
Conductivité $\mu$ S.cm <sup>-1</sup>	88.3 $\pm$ 2.0	64	23.2 $\pm$ 1.6	32	58.2 $\pm$ 9.3	33	46.0 - 74.0	65.9 $\pm$ 8.4	33	54.0 - 80.0
Minéralisation mg.l <sup>-1</sup>	83.7 $\pm$ 1.9	64	31.7 $\pm$ 2.2	32	55.1 $\pm$ 8.8	33	43.6 - 70.1	51.2 $\pm$ 8.0	33	51.2 - 75.8
Sodium mg.l <sup>-1</sup>	6.9 $\pm$ 0.6	10	0.8 $\pm$ 0.06	8	7.7 $\pm$ 0.8	15	6.5 - 8.9	1.4 $\pm$ 0.4	15	0.8 - 2.2
Calcium mg.l <sup>-1</sup>	4.8 $\pm$ 0.4	10	0.6 $\pm$ 0.03	8	1.0 $\pm$ 0.3	15	0.6 - 1.4	6.6 $\pm$ 1.0	15	5.0 - 8.2
Potassium mg.l <sup>-1</sup>	4.5 $\pm$ 0.2	10	0.6 $\pm$ 0.3	8	1.9 $\pm$ 0.9	15	0.2 - 3.1	3.7 $\pm$ 0.7	15	2.4 - 4.3
Magnésium mg.l <sup>-1</sup>	2.0 $\pm$ 0.1	10	0.2 $\pm$ 0.01	8	0.2 $\pm$ 0.01	15	0.2 - 0.3	0.3 $\pm$ 0.1	15	0.2 - 0.4
Chlorures mg.l <sup>-1</sup>	9.7 $\pm$ 0.6	10	1.6 $\pm$ 0.3	8	3.1 $\pm$ 0.7	15	2.0 - 3.8	4.7 $\pm$ 0.6	15	3.7 - 5.9
Nitrates mg.l <sup>-1</sup>	7.1 $\pm$ 1.8	10	5.1 $\pm$ 0.5	8	5.5 $\pm$ 0.5	15	4.7 - 6.2	5.7 $\pm$ 0.6	15	4.6 - 6.4
Sulfates mg.l <sup>-1</sup>	16.9 $\pm$ 0.9	10	3.2 $\pm$ 0.9	8	4.4 $\pm$ 0.8	15	3.0 - 5.6	5.0 $\pm$ 0.1	15	3.3 - 6.2
Aluminium mg.l <sup>-1</sup>	0.01 $\pm$ 0.001	10	0.42 $\pm$ 0.09	8	0.30 $\pm$ 0.04	15	0.23 - 0.40	0.32 $\pm$ 0.05	15	0.24 - 0.44
Alcalinité meq.l <sup>-1</sup>	0.08 $\pm$ 0.01	5	-0.01 $\pm$ 0.02	4	0.3 $\pm$ 0.1	15	0.2 - 0.4	0.3 $\pm$ 0.1	15	0.2 - 0.4

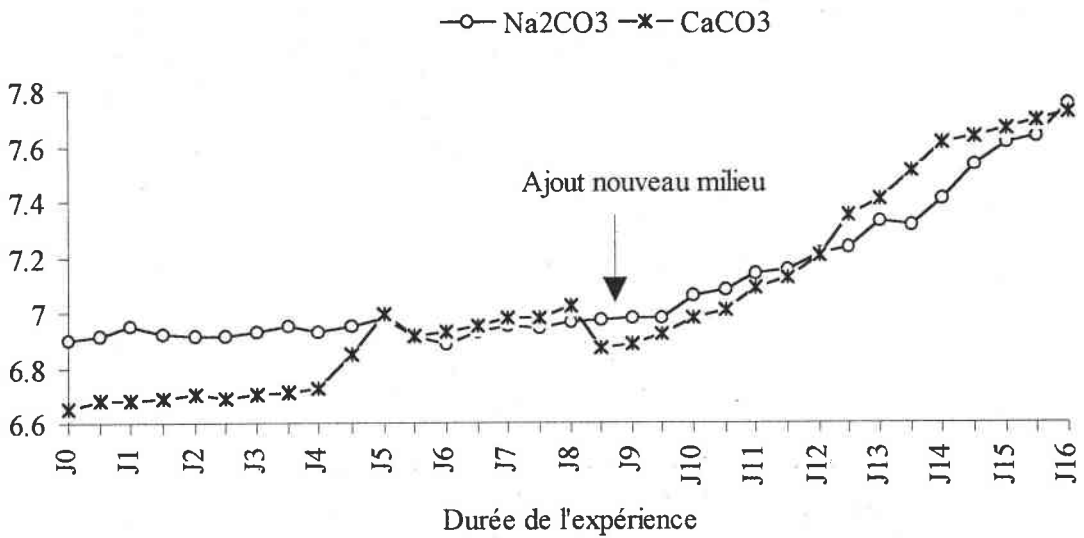


Figure 57 : Evolution du pH dans les milieux Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> et CaCO<sub>3</sub> pendant les 16 jours de l'expérience.

Le pH du milieu additionné de CaCO<sub>3</sub> est de 6.6 au début de l'expérience. Il ne varie pas pendant les quatre premiers jours, puis il augmente et se stabilise jusqu'au huitième jour. L'ajout de la nouvelle solution (J<sub>8</sub>) provoque une baisse de 0.2 unités pH pendant les douze heures qui suivent. Le pH évolue ensuite, avec une progression similaire à celle mesurée dans le milieu contenant du Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> pour atteindre la valeur de 7.7 le dernier jour de l'expérience.

\* Evolution de la conductivité (Figure 58)

La conductivité, plus élevée dans le milieu enrichi en CaCO<sub>3</sub>, suit une évolution similaire dans les deux milieux. D'une manière générale, elle augmente entre le début et la fin de l'expérience.

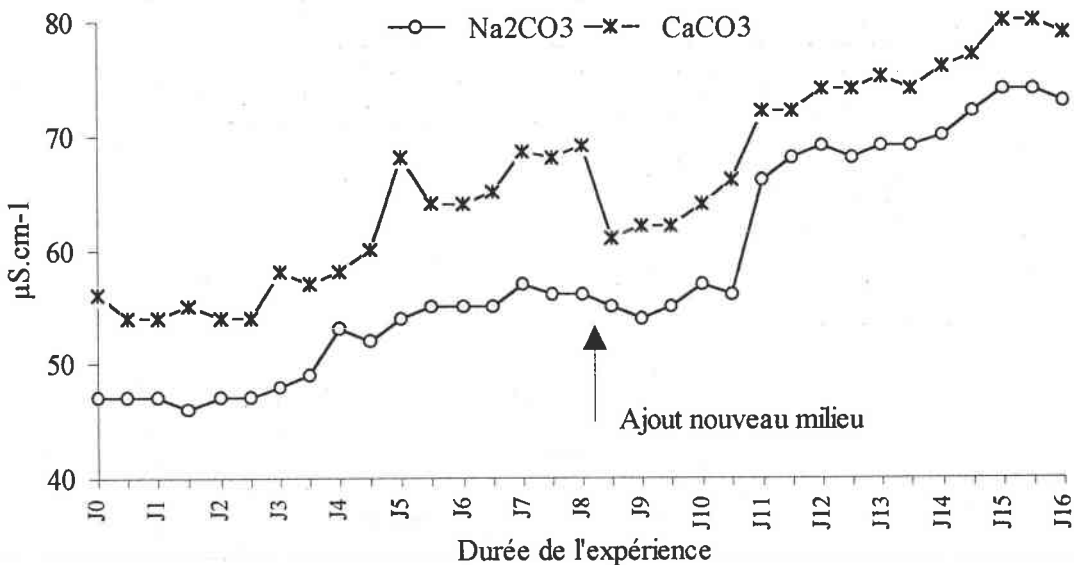


Figure 58 : Evolution de la conductivité dans les milieux Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> et CaCO<sub>3</sub> pendant les 16 jours de l'expérience.

\* Evolution des concentrations en calcium et en sodium (Figure 59)

Les concentrations en calcium du milieu acidifié modifié par l'ajout de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  et les concentrations en sodium du milieu enrichi en  $\text{CaCO}_3$  varient peu entre le début et la fin de l'expérience. Celles du calcium dans le milieu contenant du  $\text{CaCO}_3$  et du sodium dans le milieu contenant du  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  augmentent progressivement pendant les huit premiers jours de l'expérience. L'ajout de la nouvelle solution provoque une diminution de ces teneurs. Dès le dixième jour, l'augmentation reprend jusqu'à la fin de l'expérience.

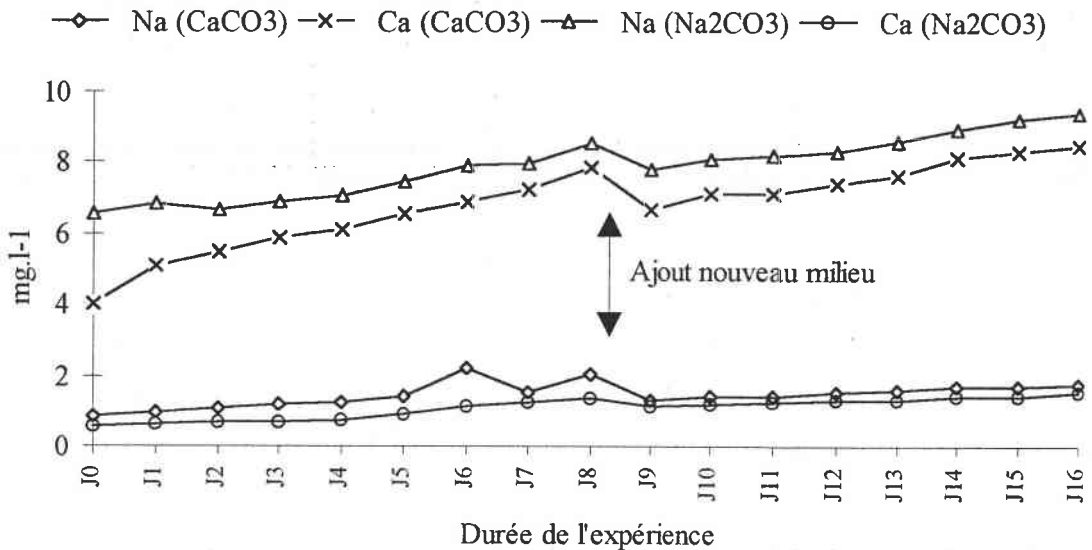


Figure 59 : Evolution des concentrations en sodium et calcium dans les milieux  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  et  $\text{CaCO}_3$  pendant les 16 jours de l'expérience.

### VI.3.3.2. Effets sur les larves

#### VI.3.3.2.1. Mortalité

Une mortalité plus élevée s'est produite dans le lot de larves exposé au milieu acidifié 4.6PMAI pendant huit jours (Tableau XXXVI). Les larves survivantes à cette exposition sont alors transférées dans les milieux enrichis en carbonates de sodium ou de calcium. Le taux de mortalité de ces individus transférés est alors très diminué. Une larve morte est observée le lendemain ( $J_9$ ), puis le surlendemain ( $J_{10}$ ) du transfert dans les deux milieux et le quinzième jour ( $J_{15}$ ) dans le milieu enrichi en carbonate de calcium.

Deux larves sont mortes dans le lot exposé au milieu contenant du carbonate de sodium et une seule dans celui exposé au milieu additionné de carbonate de calcium pendant les 16 jours d'expérience. Cette mortalité est inférieure à celle observée dans le lot de larves exposé au milieu contrôle (3 individus morts).

Tableau XXXVI: Mortalité dénombrée dans les différents milieux d'exposition pendant les seize jours d'expérience (n : nombre de morts ; n\* : nombre de larves stressées dans le milieu acidifié mortes après le transfert dans les milieux Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> et CaCO<sub>3</sub>).

Mortalité																		
Milieux	J0	J1	J2	J3	J4	J5	J6	J7	J8	J9	J10	J11	J12	J13	J14	J15	J16	Total
6.6M			1		1				1									3
4.6PMAI			3	1	3	2	5	2	Transfert de toutes les larves survivantes dans les deux milieux Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> et CaCO <sub>3</sub>								16	
Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	1					1				1*	1*							2/2*
CaCO <sub>3</sub>										1*	1*				1	1*		1/3*

#### VI.3.3.2.2. Concentrations en chlorures et en sodium dans l'hémolymphe

Les concentrations moyennes en chlorures et sodium mesurées dans l'hémolymphe des larves du lot témoin sont respectivement de 102 et 108 mmoles.l<sup>-1</sup> (Figures 60 et 61).

Aucune variation significative n'est mesurée dans les concentrations de ces ions dans l'hémolymphe des larves exposées pendant 16 jours au milieu contrôle (p < 0.05).

Les concentrations en chlorures et en sodium dans l'hémolymphe des larves exposées au milieu acidifié modifié par l'ajout de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> augmentent légèrement pendant la première semaine d'expérience. Toutefois, cette variation n'est pas significative par rapport aux concentrations initiales. Les teneurs mesurées à la fin de l'expérience (J<sub>16</sub>) pour les larves de ce lot ne montrent aucune différence significative avec celles obtenues la semaine précédente.

Lorsque *Dinocras cephalotes* est exposé à un milieu acidifié enrichi en carbonate de calcium, les concentrations moyennes en chlorures et sodium mesurées dans l'hémolymphe sont plus faibles que celles déterminées pour le lot témoin. Cette baisse n'est toutefois significative (p < 0.05) que le 16<sup>ème</sup> jour de l'expérience (J<sub>16</sub>). Deux prélèvements ont été impossibles à réaliser.

Les concentrations moyennes en chlorures et en sodium mesurées dans l'hémolymphe des larves exposées au milieu acidifié pendant huit jours sont très significativement diminuées (p < 0.01) par rapport à celles des larves du lot témoin et contrôle. Les pertes de ces deux ions sont, en moyenne, de 50 % par rapport aux données initiales.

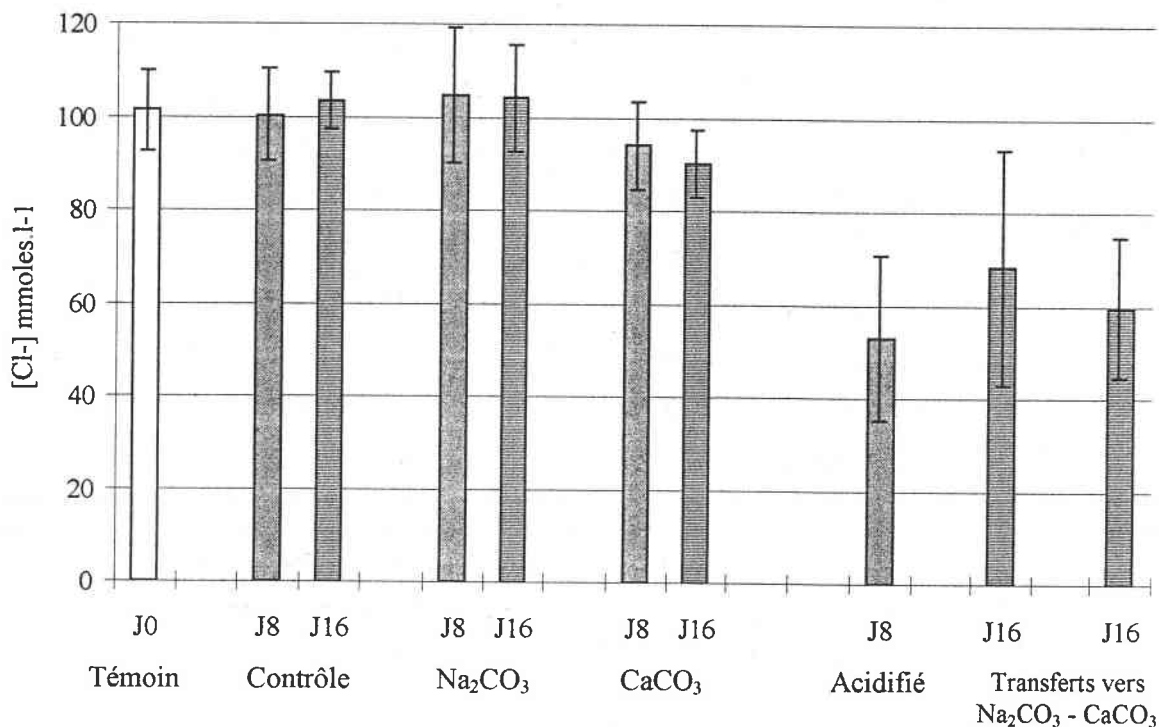


Figure 60 : Concentrations en chlorures mesurées dans l'hémolymphe des différents lots de larves. Les barres verticales représentent l'écart-type sur la moyenne des mesures.

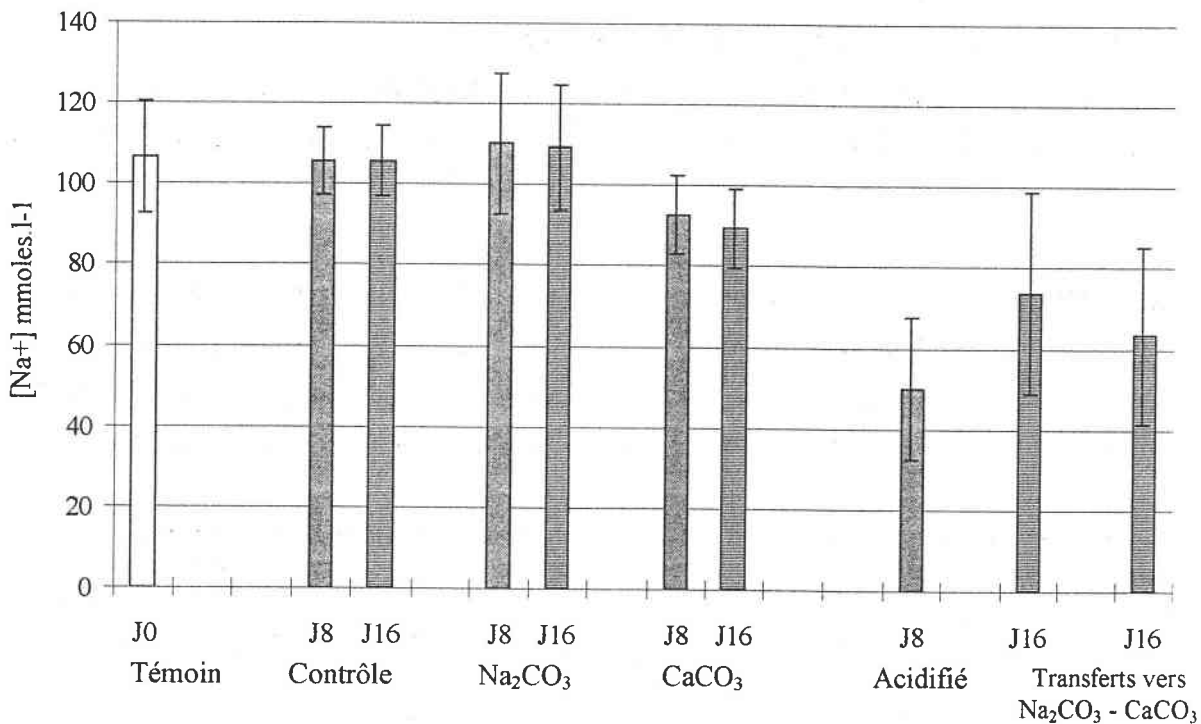


Figure 61 : Concentrations en sodium mesurées dans l'hémolymphe des différents lots de larves. Les barres verticales représentent l'écart-type sur la moyenne des mesures.



Une semaine après le transfert dans le milieu enrichi en  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ , les concentrations moyennes en chlorures et en sodium sont supérieures à celles mesurées la semaine précédente. Cette augmentation n'est toutefois pas significative pour les deux ions. Comparées aux concentrations ioniques déterminées pour le témoin, les concentrations en chlorures et sodium mesurées pour les individus préalablement stressés sont significativement inférieures ( $p < 0.05$ ) une semaine après leur transfert dans un milieu modifié par l'ajout de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ .

Ces remarques s'appliquent également au lot de larves préalablement stressées et remises dans le milieu avec  $\text{CaCO}_3$ . Les concentration moyennes mesurées à  $J_{16}$  ne sont toutefois pas significativement différentes de celles mesurées pour le lot transféré dans le milieu  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ , même si elles sont inférieures en moyenne de 10  $\text{mmoles.l}^{-1}$  pour chaque ion.

L'observation des résultats obtenus le 16<sup>ème</sup> jour pour chaque larve du lot transféré dans le milieu contenant du  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  met en évidence des différences interindividuelles. Sur les 7 larves du lot, quatre ont des concentrations en chlorures et sodium dans l'hémolymphe se rapprochant de celles obtenues pour les larves du lot témoin (moyenne : 102  $\text{mmoles.l}^{-1}$  pour les chlorures et 108  $\text{mmoles.l}^{-1}$  pour le sodium) (Tableau XXXVII). Deux larves ont des concentrations du même ordre que celles des individus exposés une semaine dans le milieu acidifié. Enfin, la dernière larve de ce groupe présente des concentrations très inférieures à toutes celles décrites précédemment. Trois groupes se dégagent donc dans ce lot :

- les larves ayant commencé à récupérer de leur stress passé,
- les larves se maintenant au niveau atteint pendant le stress et n'ayant pas récupéré,
- les larves ayant continué à perdre des ions de leur hémolymphe malgré un transfert dans un milieu plus favorable.

Tableau XXXVII : Facteurs de dilution (Fd) et concentrations en chlorures ( $\text{Cl}^-$ ) et en sodium ( $\text{Na}^+$ ) dans l'hémolymphe de chaque larve préalablement stressée, puis transférée dans des milieux initialement acidifiés modifiés par l'ajout de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  ou  $\text{CaCO}_3$  pendant huit jours (16<sup>ème</sup> jour d'expérience). (Pl. : identification de la larve de Plécoptère)

Milieu	$\text{Na}_2\text{CO}_3$							$\text{CaCO}_3$					
Larve	Pl.1	Pl.2	Pl.3	Pl.4	Pl.5	Pl.6	Pl.7	Pl.1	Pl.2	Pl.3	Pl.4	Pl.5	Pl.6
Fd	838	1151	1601	3637	3847	1505	4445	1494	1343	1251	1819	5883	2779
$\text{Cl}^-$	88.4	85.6	92.2	68.0	26.7	75.8	40.7	55.0	54.6	88.3	59.8	59.3	43.2
$\text{Na}^+$	97.3	90.1	92.7	64.9	38.5	91.0	42.5	56.5	68.9	102.3	65.7	48.6	38.7

Pour le lot de larves exposés au milieu  $\text{CaCO}_3$  après avoir été préalablement stressée dans un milieu acidifié, la distinction ci dessus se restreint à deux catégories uniquement avec une répartition des larves différente. Seule une larve semble avoir récupéré du stress causé par le milieu acidifié et présente des concentrations ioniques similaires à celles des larves du lot témoin. Toutes les autres (5) ont des concentrations proches de celles mesurées avant leur transfert.

## VI.4. DISCUSSION

L'exposition de larves de *Dinocras cephalotes* à un milieu acidifié (4.6PMAl) entraîne une diminution des concentrations en chlorures et en sodium dans leur hémolymphe, ce qui traduit une perturbation de la régulation ionique. Après une semaine d'exposition à cet environnement, les niveaux atteints par les chlorures et le sodium hémolympatiques représentent une perte de respectivement 80 et 74 % par rapport aux concentrations mesurées pour les larves du lot témoin. De plus, les prélèvements d'hémolymphe deviennent difficiles à réaliser suite à la réduction du volume de fluide extracellulaire et du changement dans sa viscosité. Toutes ces modifications sont accompagnées d'une forte mortalité. Lorsque les larves survivantes à cette exposition de huit jours sont remises dans un milieu ayant un pH proche de la neutralité, une minéralisation élevée et pas d'aluminium (milieu contrôle), la mortalité diminue très rapidement jusqu'à s'arrêter complètement. Corrélativement, les prélèvements d'hémolymphe deviennent plus faciles à réaliser et les dosages effectués montrent que les concentrations en chlorures et en sodium augmentent. Dès le 16<sup>ème</sup> jour suivant le changement de milieu, elles atteignent des niveaux similaires à ceux déterminés pour les larves du lot témoin.

Après le transfert dans le milieu contrôle, deux groupes de larves se différencient :

- les larves qui, malgré un milieu de qualité normale, meurent suite à leur exposition à un milieu acidifié,
- les larves dont les perturbations physiologiques provoquées par l'exposition au milieu acidifié disparaissent permettant ainsi le rétablissement de la concentration ionique à des niveaux similaires à ceux des larves du lot témoin.

Il semblerait que pour *Dinocras cephalotes*, il existe un seuil limite de perte en chlorures et en sodium. Toutefois, cet insecte semble supporter un niveau de perte ionique élevé car, à J<sub>8</sub>, les pertes mesurées pour les chlorures et le sodium sont respectivement de 80 et de 75 %. Avant le transfert, une forte mortalité est comptabilisée. Après le transfert dans le milieu 6.6M, une récupération physiologique est mise en évidence ainsi qu'un arrêt de la mortalité laissant ainsi supposer que le seuil limite de perte ionique toléré par *Dinocras cephalotes* se situe aux environs de 80 %. Au delà de cette

limite, la larve ne peut les compenser. Ces pertes ioniques importantes génèrent alors un gradient osmotique dans la larve qui cause un passage du fluide extracellulaire vers le milieu intracellulaire et déclenche une séquence de perturbations physiologiques qui entraînent la mort (cf. chapitre IV).

Chez les poissons, ce phénomène se produit dès que les pertes en sodium dépassent 50 % (Milligan et Wood, 1982 ; McDonald, 1983). Le seuil de perte toléré est toutefois variable et dépend de l'espèce. Ainsi, la truite arc en ciel (*Salmo gairdneri*) tolère une perte jusqu'à 60-70 % de chlorures et de sodium corporels après une exposition en milieu acide (Wood et McDonald, 1982). Chez les amphibiens *Rana castesbiana* et *Rana clamitans*, une perte de sodium corporel de 50 % est létal (Freda et Dunson, 1984 ; Gascon *et al.*, 1987). Les mollusques, notamment les Unionidés semblent supporter des seuils plus élevés. Ainsi, Mäkela et Oikari (1992) montrent qu'*Anodonta anatina* tolère une perte de 92 % des chlorures hémolympatiques. Ces résultats rejoignent ceux de Pynnönen (1991) pour qui les Unionidés survivent à des expositions acides entraînant des pertes en chlorures et en sodium hémolympatiques de 80 %.

Dans certains cas, la quantité ionique perdue n'est pas le seul élément intervenant. En effet, la cinétique de perte est importante à prendre en compte. Ainsi, Booth *et al.* (1987) ont montré que 90 % des individus de l'espèce *Salvelinus fontinalis* exposés à des milieux acidifiés meurent lorsqu'ils perdent plus de 4 % de leur teneur corporelle en sodium pendant les 24 premières heures d'exposition.

Les effets dus à une forte concentration en protons sur le flux du sodium sont reliés directement à la sensibilité des organismes vis à vis du pH. Ainsi, plus une espèce tolère une perte ionique importante et plus cette perte est lente à se produire, plus l'organisme résiste longtemps dans un milieu acidifié, donc, plus il apparaît acido-tolérant.

Suite à l'expérience réalisée, il apparaît que certaines larves de *Dinocras cephalotes* tolèrent des pertes en chlorures et en sodium élevées et peuvent ainsi supporter une exposition de huit jours en milieu acidifié. Malgré l'acido-sensibilité de cette espèce, il semblerait qu'elle puisse résister à un stress acide de courte durée survenant, par exemple, lors d'un orage ou d'événements pluvieux importants. Cette capacité ne serait toutefois probablement pas suffisante face à une acidification épisodique de cours d'eau due à la fonte des neiges, car, les modifications physico-chimiques sont plus longues en durée et plus importantes du point de vue diminution de pH et augmentation des concentrations en aluminium.

Lorsque les pertes ioniques n'ont pas atteint le seuil létal pour *Dinocras cephalotes*, les transferts des larves survivantes dans le milieu 6.6M leur permet de récupérer du stress physiologique induit par l'exposition au milieu acidifié. Ainsi, les paramètres ayant été perturbés présentent des niveaux similaires à ceux mesurés initialement. Les concentrations ioniques augmentent générant ainsi, une augmentation de la pression osmotique de l'hémolymphe qui entraîne un mouvement d'eau et

d'ions dans l'organisme aboutissant à la récupération du volume initial d'hémolymphe ; ces mouvements étant inverses de ceux proposés pendant l'exposition au milieu acide.

Les perturbations mises en évidence pendant un stress acide sont dans une certaine limite réversibles. La récupération peut être très rapide, mais cela est très variable selon les individus. Chez l'écrevisse, tous les effets physiologiques négatifs observés suite à une exposition de 5 jours sont inversés après une période de 5 jours de récupération (Wood et Rogano, 1986). De même, pour le Salmonidé *Salmo gairdneri* exposé pendant 21 jours à un pH de 4.76, la récupération est complète dans les 7 jours qui suivent le changement de milieu (Brown *et al.*, 1986). Pour d'autres espèces, la récupération est plus longue ; ainsi, les effets provoqués par l'exposition à un milieu acidifié pendant 21 jours sur des alevins de *Salvelinus fontinalis* persistent après 20 jours de changement de milieu (Wood *et al.*, 1990). Les espèces de mollusque, *Anodonta anatina* et *Unio tumidus* (Unionidés) peuvent aussi récupérer de leur stress physiologique dû à une exposition en milieu acidifié pendant huit jours (Pynnönen, 1994).

Les caractéristiques du milieu de transfert permettent à l'animal de retrouver des conditions physiologiques similaires à celles déterminées pour les larves du lot témoin. En effet, le changement de milieu de 4.6PMAI à 6.6M entraîne des modifications importantes dans l'environnement des larves :

- les protons ne sont plus en quantité importante, donc le flux entrant et le flux sortant de sodium redeviennent normaux suite à l'arrêt de la compétition entre ces deux éléments,
- la minéralisation élevée du milieu 6.6M permet à l'insecte de prélever sans difficulté les ions qui lui sont nécessaires dans le milieu extérieur,
- les précipités d'aluminium formés sur les branchies de l'insecte sont probablement déplacés suite au changement de pH de l'environnement qui entraîne des modifications dans sa spéciation. Les cellules à chlorures retrouvent leur pleine capacité.

A la fin de l'expérience, une légère rechute étant observée pour les chlorures, la récupération n'est peut être que provisoire.

Une des raisons majeures permettant d'expliquer la récupération observée lors de l'expérience précédente est le changement de minéralisation. Le nouvel environnement présentant une minéralisation plus élevée permet à l'insecte de prélever plus facilement, avec un minimum d'énergie, les ions qui lui sont nécessaires. Toutefois, le milieu de transfert 6.6M est caractérisé par des concentrations dans les différents cations toutes élevées ne permettant pas de déterminer l'influence exercée par chacun d'eux. Afin de répondre à cette question, des larves de *Dinocras cephalotes* ont été exposées à différents milieux acidifiés (pH acide, faible minéralisation et concentration en aluminium élevée), chacun étant enrichi en un cation donné (calcium, sodium, potassium ou magnésium) afin de

montrer les effets respectifs de chaque cation sur la survie et les concentrations en chlorures et en sodium dans l'hémolymphe.

Les concentrations moyennes en ions chlorures et sodium dans l'hémolymphe des larves exposées au milieu acidifié enrichi en calcium, sont significativement inférieures aux teneurs moyennes déterminées dans le lot de larves témoins. Les valeurs atteintes sont du même ordre que celles du lot de larves exposées au milieu acidifié classique, donc avec une faible concentration en calcium.

Dans ces conditions expérimentales, le calcium ne semble avoir eu aucun effet positif (limitation des pertes), ni négatif (augmentation des pertes).

Cependant, en général, cet élément est rapporté avoir un effet bénéfique marqué sur de nombreux organismes aquatiques allant du zooplancton aux poissons. Ainsi, Havas (1987) montre que le calcium prolonge temporairement la survie de *Daphnia magna* à pH 5 et 4.5. Chez les insectes l'effet positif du calcium est également rapporté ; Sutcliffe *et al.* (1987) notent la survie améliorée de *Baetis rhodani* (Ephéméroptère) à pH 5.0 dans des eaux à haute teneur en calcium. Il intervient également sur les amphibiens puisque l'augmentation du calcium externe dans les eaux à faible pH augmente le temps de survie des larves d'amphibiens tout en ralentissant les pertes de sodium (Freda et Dunson, 1984 ; Gascon *et al.*, 1987). Des poissons évoluant dans une eau diluée sont particulièrement sensibles à l'acidification, cela d'autant plus que les concentrations en calcium sont faibles dans le milieu.

La dureté de l'eau représentée par la concentration en calcium affecte donc significativement la distribution de certaines espèces et leur capacité à survivre dans des environnements acidifiés. En effet, les organismes deviennent particulièrement acido-sensibles dans les eaux faiblement minéralisées, mais peuvent ainsi être limités dans les eaux proches de la neutralité à des concentrations en calcium inférieures à 1 mg.l<sup>-1</sup> (Havas et Advocaat, 1995). Cela s'explique par le fait que cet ion peut atténuer la toxicité des protons en réduisant la perméabilité membranaire et en stimulant le prélèvement actif de sodium (Bornancin *et al.*, 1987).

Dans nos conditions expérimentales, l'effet bénéfique du calcium n'est pas apparu évident. Cette constatation peut être liée aux autres conditions physico-chimiques du milieu. En effet, le pH élevé et la forte concentration en aluminium jouent un rôle négatif marqué sur la régulation ionique de *Dinocras cephalotes*. De plus, même si le flux entrant de sodium était stimulé par la présence d'une plus forte concentration en calcium, la quantité de sodium présente dans le milieu est trop faible pour que cet élément puisse être prélevé suffisamment pour compenser les pertes. Cependant, le calcium a un effet plus marqué sur la régulation ionique que les cations potassium et magnésium. En effet, les pertes ioniques de l'hémolymphe sont significativement inférieures pour les larves exposées au milieu

enrichi en calcium par rapport à celles mesurées pour les larves exposées au milieu enrichi en potassium et magnésium.

Dans la majorité des études, les trois éléments : protons, calcium et aluminium sont considérés comme primordiaux pour la toxicité de l'eau acide pour la vie dans les eaux douces (Havas et Rosseland, 1995). Peu de travaux donnent la nature des autres éléments intervenant dans la composition physico-chimique des milieux testés. Or, l'expérience réalisée au laboratoire met en évidence un élément important ayant un effet bénéfique marqué sur la régulation ionique de *Dinocras cephalotes* : le sodium. En effet, les concentrations en chlorures et en sodium mesurées dans l'hémolymphe des larves exposées aux deux milieux acidifiés enrichis en sodium ne montrent pas de différence significative avec celles mesurées chez le témoin.

Peu de travaux ont mis en évidence cet effet bénéfique du sodium. Twitchen (1987) et Camargo (1995) citent plusieurs expériences réalisées sur les Gammare et les Plécoptères mettant en évidence que, à faible pH, la survie des invertébrés peut être augmentée en utilisant des concentrations en sodium plus élevées dans l'environnement aquatique. Dewith *et al.* (1989) ont mis en évidence que *Lymnea stagnalis* (Gastéropode) subit moins les effets de l'acidification lorsque la concentration en sodium du milieu externe augmente. De même, la survie, neuf jours après l'éclosion du poisson *Morone saxatilis*, est liée à la concentration externe en sodium (Grizzle et Mauldin, 1994). Dans tous ces exemples, la concentration en calcium n'apparaît pas être le facteur déterminant de la minéralisation.

Les milieux expérimentaux dans lesquels sont exposés les Plécoptères sont initialement des milieux acidifiés donc riches en protons et en aluminium. De ce fait, les concentrations hémolympatiques en chlorures et en sodium auraient dû être diminuées par rapport à celles des témoins. Toutefois, dans ces milieux, le sodium est présent en quantité élevée. De ce fait, d'une part la compétition avec les protons est réduite et, d'autre part, la larve peut prélever le sodium plus facilement dans le milieu ambiant. Ainsi, le flux entrant de sodium est certainement plus important dans le milieu acidifié enrichi en sodium que dans le milieu acidifié classique, c'est-à-dire faiblement minéralisé. Comme le flux entrant de sodium est plus élevé, les pertes ioniques sont réduites. Toutefois, cela s'applique pour une gamme de pH limitée. Ainsi, Brown (1981) a montré qu'un pH inférieur à 4 entraîne une inhibition complète du taux de prélèvement du sodium par *Salmo trutta* à partir du milieu extérieur. Pour *Astacus pallipes*, l'absorption du sodium est inhibée dès un pH de 6.0. En contrepartie, Mc Williams (1980) qui conclut aussi que le taux de prélèvement de sodium est fortement corrélé avec l'acidité du milieu montre que lorsque le prélèvement n'est pas totalement inhibé, l'augmentation dans les concentrations externes de cet ion peut améliorer son taux de prélèvement.

Si le milieu acidifié est enrichi en potassium ou en magnésium, des pertes significatives en chlorures et en sodium sont constatées dans l'hémolymphe des larves exposées à cet environnement par

rapport à celles des larves du lot témoin. Elles sont par ailleurs significativement plus importantes que celles notées pour les larves exposées au milieu acidifié de base, n'ayant eu aucun ajout de cations. De plus, la mortalité la plus forte est obtenue pour le lot de larves exposé au milieu enrichi en potassium suite à l'ajout de KCl. Le potassium et le magnésium ne semblent donc avoir aucun effet sur la régulation ionique des larves aquatiques. Cette conclusion s'accorde avec celle de Brown (1981).

Les anions chlorures et sulfates qui sont ajoutés corrélativement à la formulation des sels employés ne semblent avoir aucun effet sur les larves. En effet, les réponses pour un cation donné sont sensiblement les mêmes quelque soit l'anion associé. Ainsi, même si des larves sont exposées à un milieu acidifié riche en chlorures (surtout CaCl, KCl, MgCl<sub>2</sub>), les pertes de ce dernier dans l'hémolymphe ne sont pas limitées.

Lors de cette expérience, il est apparu que pour les larves de *Dinocras cephalotes*, c'est le sodium qui a le plus d'impact sur la régulation ionique. Selon la littérature, dans de nombreuses expériences portant sur les milieux acidifiés, le seul élément de la minéralisation de l'eau qui soit précisé est, très souvent le calcium alors que le sodium nous apparaît être un élément clé à prendre en considération. Toutefois, le calcium du milieu externe est important car il influe sur la perméabilité membranaire. Il est donc possible que l'effet bénéfique observé soit du à une réduction progressive dans le taux du flux sortant en sodium. De plus, en présence d'une concentration en sodium importante dans le milieu, lorsque le taux de prélèvement n'est pas totalement inhibé, le flux entrant de sodium peut augmenter par réduction de la compétition avec les protons. Cet effet combiné à celui du calcium explique que des organismes tels les poissons exposés à ce type de milieu puissent maintenir une balance ionique. Ces deux ions sont donc complémentaires et essentiels.

Dans la situation de terrain, il est évident que les concentrations en ions dans l'eau naturelle ne sont pas modifiés séparément. Ainsi, par exemple, lors d'un stress acide, elles baissent toutes en même temps lors de la fonte des neiges ou d'un épisode pluvieux. Hutchinson *et al.* (1989) ont montré que dans les eaux peu minéralisées, le calcium intervient sur la létalité induite par les protons et par l'aluminium, mais que le sodium lui aussi est important. Il montre également que ce dernier a peu d'effet en l'absence de calcium. Il semble donc que même si pris séparément, les différents cations sont plus ou moins protecteurs, ils sont néanmoins tous essentiels.

Les cations sodium et calcium montrant un effet plus marqué sur la régulation ionique que le potassium et le magnésium, et afin de confirmer ces résultats, ces deux ions ont été testés dans l'expérience décrite en partie VI.3 ; celle-ci permet, de plus, de tester en laboratoire deux des produits les plus utilisés *in situ* pour la lutte contre l'acidification.

L'évolution de la physico-chimie des milieux est conforme à celle observée lors des chaulages des lacs acidifiés. Le pH et l'alcalinité augmentent, ainsi que les concentrations en calcium et en sodium pour les milieux ayant eu un ajout de  $\text{CaCO}_3$  ou de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  (Burns, 1996 ; Lindmark, 1984 ; Newton *et al.*, 1996). En laboratoire, les concentrations en aluminium diminuent peu. Dans les expériences *in situ*, de plus grandes variations sont observées, mais, celles-ci sont dues principalement au fait que le chaulage réalisé sur un bassin versant entraîne une diminution du relargage de l'aluminium des sols en direction des lacs. (Borg *et al.*, 1995). Dans notre cas, seule la spéciation de l'aluminium est modifiée. Fjeld *et al.* (1988) constatent aussi une faible diminution des concentrations en aluminium total (de 280 à 250  $\mu\text{g.l}^{-1}$ ) dans un milieu acidifié chaulé en laboratoire.

Les réponses mesurées sur les insectes exposés aux différents milieux sont différentes selon que la physico-chimie du milieu initialement acidifiée ait été modifiée suite à un ajout de  $\text{CaCO}_3$  ou de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ .

Lorsque des insectes non stressés sont exposés au milieu ayant eu un ajout de carbonate de calcium, une diminution des concentrations en chlorures et en sodium est mesurée dans le lot ; elle devient significative le 16<sup>ème</sup> jour d'exposition. A l'inverse, celles mises dans un milieu amélioré par l'ajout de carbonate de sodium ne présentent aucune variation significative dans les teneurs ioniques hémolympatiques par rapport à celles mesurées dans les larves du lot témoin. Ces différences de réponses peuvent être liées à la composition des milieux. Or, dans les deux milieux, la physico-chimie évolue de façon similaire. Le pH et l'alcalinité ne présentent pas de différence significative. La conductivité et donc, la minéralisation, est plus élevée dans le milieu contenant du carbonate de calcium (test t ;  $p < 0.05$ ). La grande différence dans la composition de ces deux milieux est leurs concentrations respectives en sodium et en calcium. Il semblerait que, à l'instar de l'expérience précédente, la concentration en sodium plus élevée présente un effet positif plus marqué sur les concentrations hémolympatiques. Cet effet bénéfique ne s'applique pas pour la mortalité puisqu'aucune différence ne se produit entre les taux de mortalité des larves des deux lots.

La différence des effets du calcium et du sodium sur les concentrations en chlorures et en sodium dans l'hémolymphe des larves de *Dinocras cephalotes* se trouve confirmée par les résultats obtenus pour les lots de larves ayant été préalablement stressés par une exposition à un milieu acide et, transférées ensuite dans le milieu ayant eu un ajout de  $\text{CaCO}_3$  ou de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ . Pour celles remises dans le milieu enrichi en  $\text{CaCO}_3$ , une seule larve présente des concentrations en ions chlorures et sodium dans l'hémolymphe à des niveaux similaires à ceux mesurés chez les larves du lot témoin. Les autres maintiennent des niveaux semblables à ceux atteints pendant l'exposition au milieu acidifié sans présenter de récupération. Le calcium n'a donc, là encore, pas d'effet bénéfique. Par contre, il n'a pas non plus d'effets négatifs puisque les larves se maintiennent aux niveaux de concentration atteints au moment du transfert. A l'inverse, dans le lot de larves transférées dans le milieu enrichi en  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ , la



majorité des larves récupère et présente des concentrations similaires à celles du témoin. L'effet bénéfique du sodium est ainsi mis en évidence.

Dans ce lot, une larve présente un niveau d'ions hémolympatiques inférieur à celui atteint pendant le stress acide. Cela confirme l'existence du seuil limite en dessous duquel aucune récupération n'est possible. Il est évident toutefois que le laps de temps testé après le transfert (une semaine) ne représente qu'une situation à court terme. Cela ne permet pas de conclure quant aux effets à long terme.

Les différentes actions de chaulage *in situ*, quelque soit le produit utilisé, concluent que les espèces acido-sensibles qui avaient disparu finissent par réapparaître et par recoloniser les milieux (Anderson, 1995 ; Keller et Yan, 1994 ; Bradt, 1996). Dans ces cas là, le produit utilisé n'a probablement pas d'influence très importante puisque la physico-chimie du cours d'eau ou du lac concerné est rétablie progressivement. Ainsi, les organismes ne font que s'installer dans un environnement favorable. Par contre, le choix de tels produits pourrait s'avérer important lors d'un emploi pendant un stress acide. Ainsi, par exemple, au moment de la fonte des neiges, l'eau de certains cours d'eau s'acidifie et la population animale connaît une diminution importante de sa richesse. Certains organismes, tels que les poissons semblent plus réceptifs à une forte concentration en calcium pour lutter contre l'acidification tandis que d'autres, tels que les insectes *Dinocras cephalotes*, réagissent plus au sodium. L'utilisation de ces deux produits mélangés additionnerait les effets bénéfiques de chacun d'eux en touchant un plus grand nombre d'individus parmi les invertébrés et les vertébrés.

## CHAPITRE VII. : SYNTHESE GENERALE

En France, les Vosges sont particulièrement affectées par les problèmes d'acidification des eaux de surface. Dès les années 80, certains des cours d'eau de ce massif ont présenté une physico-chimie caractéristique des milieux aquatiques soumis au processus d'acidification, à savoir, un pH acide, une concentration en aluminium et en sulfates élevées (Massabuau, 1985, 1987). Ce problème mis en évidence a entraîné toute une série d'études. La plupart sont des constats d'une part, sur l'état d'acidification des cours d'eau vosgiens (Probst *et al.*, 1990), et d'autre part, sur les effets d'une eau acidifiée au niveau de différents compartiments biologiques tels que les algues (Dehbi-Zebboudj, 1989) et les macroinvertébrés (Guérol, 1992). Pour ces derniers, une baisse de la richesse spécifique se produit pour la majorité des espèces et est d'autant plus importante que le pH est acide. La classe des insectes est donc très affectée par l'acidification et il est primordial de connaître ce qui déclenche cette mortalité afin d'envisager sa prévention.

Pour les insectes, beaucoup de questions concernant les causes à l'origine de leur disparition des cours d'eau sont encore sans réponses définitives, notamment celles liées à la physiologie de l'insecte lui-même (quels processus sont altérés et pourquoi ?) et celles liées à la physico-chimie du milieu (quels paramètres interviennent et comment ?). Ces lacunes sont dues essentiellement au fait que la majorité des études sur les effets des eaux acidifiées sur la physiologie des insectes concernent en général des espèces et des mesures de critères physiologiques différentes, et cela pour des conditions d'exposition variées, pas toujours appropriées aux données de terrain, rendant impossible toute synthèse. Pour contribuer à résoudre ces problèmes, ce travail a été réalisé sur une unique espèce d'insecte *Dinocras cephalotes* et en laboratoire avec des milieux synthétiques renouvelés entièrement toutes les 12 heures afin d'éviter des variations trop importantes des différents paramètres physico-chimiques déterminés en fonction des données recueillies dans le massif vosgien tout en ayant la connaissance des données de terrain.

Le choix des larves de *Dinocras cephalotes* pour estimer les effets d'une eau acidifiée s'est avéré très intéressant. En effet, cette espèce présente de nombreux avantages qui ont permis de pallier notre manque de connaissance actuel sur les différents mécanismes physiologiques mis en jeu lors d'une exposition à un milieu acidifié. L'atout principal de cette espèce est sa sensibilité à l'acidification. En effet, dans les Vosges, *Dinocras cephalotes* n'a pas été échantillonné dans les cours d'eau de pH inférieur à 6.3 (Guérol *et al.*, 1997). Elle fait partie de la catégorie des organismes ne tolérant pas un pH inférieur à 5.0 dans la classification établie par Raddum *et al.* (1988). Cette caractéristique permet de travailler en laboratoire avec des milieux dont les paramètres physico-chimiques testés correspondent à des données mesurées dans les cours d'eau du massif vosgien. Ainsi,

les réponses obtenues dans les différentes expériences sont représentatives de celles se produisant en situation réelle et ne sont pas provoquées uniquement par des conditions expérimentales aiguës.

Les larves de *Dinocras cephalotes* présentent d'autres atouts non négligeables dans le cadre de ce travail. Elles sont relativement abondantes dans certains cours d'eau vosgien non soumis au processus d'acidification. De plus, elles ont une grande résistance physique qui leur permet de supporter aisément diverses manipulations telles que le prélèvement au Surber, le confinement dans une cage ou dans un bac et le transport sur d'autres sites que celui du prélèvement (terrain, laboratoire). Leur taille est suffisamment grande pour faciliter le prélèvement d'hémolymphe avec un volume permettant d'effectuer le dosage de plusieurs ions après dilution. Ces avantages ont permis la réalisation d'expérience avec une seule et unique espèce dont les différentes réponses induites par une exposition à un milieu acidifié ont pu être reliées entre elles afin de déterminer l'enchaînement des perturbations de l'osmorégulation qui aboutit à la mortalité.

Lorsque les larves à l'hémolymphe hypertonique sont exposées à un environnement acidifié, elles se trouvent confrontées à des concentrations élevées en protons et en aluminium, ainsi qu'à une faible minéralisation. La mesure de critères spécifiques dans la physiologie de l'insecte conduit à l'établissement d'un enchaînement de perturbations lequel explique la mortalité observée. Cette exposition provoque une perte d'ions de l'organisme vers le milieu extérieur. Dans un premier temps, le cation le plus concentré dans l'hémolymphe, le sodium, est le plus affecté. Des pertes hémolympatiques hautement significatives sont mesurées. Elles entraînent ensuite des mouvements de sodium des organes vers l'hémolymphe, mais, ces derniers ne suffisent pas pour compenser les pertes vers le milieu extérieur qui se poursuivent. Ainsi, les concentrations en sodium dans l'hémolymphe et dans l'organisme entier diminuent très significativement. Ces pertes mesurées dans l'hémolymphe s'accompagnent d'une diminution de la pression osmotique d'autant plus marquée que les pertes sont importantes. A partir d'un certain seuil, l'insecte dispose de différents mécanismes pour lutter contre cette chute de pression osmotique. Des cations, tels que le potassium, passent des organes vers l'hémolymphe avec un effet compensateur. Simultanément, une partie de l'eau composant l'hémolymphe passe dans le compartiment intracellulaire avec concentration des solutés présents dans l'hémolymphe (tels que les protéines) et augmente ainsi la pression osmotique interne. Toutefois, les mécanismes utilisés pour lutter contre cette cascade de perturbations, demandent beaucoup d'énergie qui ne peut être fournie suite à la baisse significative de la quantité d'oxygène consommée par l'insecte en raison des précipités d'aluminium déposés sur les branchies et de l'écrasement des trachéoles (zone de diffusion des gaz) lié au mouvement d'eau intra-compartimental. L'insecte ne peut donc lutter efficacement contre cet enchaînement, qui est d'autant plus aggravé que des organes impliqués dans l'osmorégulation sont affectés. En effet, l'étude histologique a montré que le transport des matériaux dans les tubes de Malpighi est altéré contribuant également à la perturbation générale de l'organisme. D'autres auteurs (Kapoor, 1980 ; Lechleitner *et al.*, 1985 ; Guérold, 1995) ont mis en évidence que le

prélèvement d'ions au niveau des cellules à chlorures, sites spécialisés, est perturbé soit par des modifications ultrastructurales et biochimiques internes, soit par l'accumulation de précipités d'aluminium à leur surface. Cet enchaînement de mécanismes inévitables, les modifications du milieu intérieur de l'insecte qui en découlent et la baisse de la quantité d'énergie disponible pour lutter efficacement contre ces altérations font que l'insecte meurt avec, cependant une variabilité interindividuelle importante.

Parmi tous les paramètres physiologiques mesurés pour mettre en évidence les effets d'une eau acidifiée sur les larves de *Dinocras cephalotes*, il est apparu que la mortalité et la concentration en sodium dans l'hémolymphe sont les deux critères les plus faciles à déterminer et les plus fiables. De plus, ils sont représentatifs d'un stress lié à l'acidification car, aucune différence significative n'apparaît entre les différentes mesures réalisées pour les larves des lots témoins et contrôles alors qu'elles présentent des différences hautement significatives entre les lots de larves exposés au milieu acidifié et les deux autres.

La perte de sodium, qui finalement n'apparaît que chez les insectes exposés au milieu acidifié pourrait donc être utilisée comme critère de sensibilité à l'acidification en établissant une corrélation entre : "le niveau de perte mesuré - le pH à l'origine de cette perte - la capacité de l'insecte à la supporter (temps de survie)".

Une cascade de perturbations est à l'origine de la mortalité observée. Or, les causes qui provoquent cette cascade sont multiples puisqu'un milieu acidifié présente une combinaison de trois paramètres physico-chimiques essentiels (pH acide, faible minéralisation et concentration en aluminium élevée). En reconstituant en laboratoire des milieux spécifiques, il est apparu que ces trois facteurs agissent et interagissent entre eux avec une certaine hiérarchie et de la façon suivante :

- une forte concentration en protons agit sur les larves de *Dinocras cephalotes* en induisant une perte significative des ions sodium et chlorures hémolympatiques qui traduit une perturbation de la régulation ionique. Ces pertes sont dues essentiellement à des modifications dans les flux ioniques. Ainsi, une baisse du flux d'ions entrant associée à une augmentation du flux d'ions sortant conduisent à un dérèglement de la balance ionique en faveur d'une perte. La diminution du flux de sodium entrant est causée par une compétition entre le sodium et les protons du milieu extérieur (Twitchen, 1990 ; Camargo, 1995), une réduction de l'activité enzymatique (Kapoor, 1980) fournissant l'énergie pour le transport du sodium et les perturbations de l'excrétion à partir des tubes de Malpighi et de la réabsorption rectale. Ces deux dernières peuvent être également à l'origine de l'augmentation du flux sortant.
- une faible minéralisation ne semble pas entraîner un dérèglement de la régulation ionique, mais provoque une mortalité élevée. Celle-ci est probablement liée à un affaiblissement général provoqué par une demande en énergie importante de l'organisme pour pouvoir lutter contre la fuite d'ions se

produisant de la larve vers le milieu extérieur. En effet, les deux mécanismes physiologiques employés avec comme conséquence une réduction de la perte ionique (activité accrue au niveau des cellules spécialisées dans l'absorption d'ions et production d'une urine diluée) demande de l'énergie.

- une forte concentration en aluminium ne semble pas affecter significativement les critères suivis (concentration en sodium et chlorures dans l'hémolymphe et mortalité) mais agit au niveau de la respiration par un effet prédominant de colmatage des trachéobranchies.
- lorsque une forte concentration en protons et une faible minéralisation sont combinées, les effets mis en évidence sont ceux de chacun de ces facteurs pris séparément, l'aluminium amplifiant les effets mesurés du facteur avec lequel il est combiné.
- la combinaison la plus létale est celle qui correspond au milieu acidifié.

Toutefois, même si un environnement acidifié déclenche une perturbation de la régulation ionique et une forte mortalité, celles-ci disparaissent lorsque les larves survivantes sont transférées dans un environnement plus clément. Cette observation traduit deux faits fondamentaux pour l'étude des milieux acidifiés et les stratégies curatives à envisager :

- il existe un seuil de pertes en chlorures et en sodium au delà duquel la larve meurt. Ce seuil est relativement élevé comparé à celui d'autres espèces. Il semble, en effet, que *Dinocras cephalotes* puisse supporter des pertes de 80 % en chlorures et 75 % en sodium hémolympatiques alors que d'autres espèces meurent dès qu'elles atteignent des pertes de 50 % (Milligan et Wood, 1982 ; Freda et dunson, 1984).
- lorsque ce seuil n'est pas atteint, les concentrations ioniques mesurées chez les larves survivantes après le transfert dans le milieu plus clément présentent des niveaux similaires à ceux mesurés initialement. Cette récupération est provoquée par le changement de pH (6.6 au lieu de 4.6). En effet, les protons présents en faible quantité ne sont plus en compétition avec le sodium et ne perturbent plus le flux entrant et sortant d'ions. De plus, la minéralisation élevée du milieu de transfert permet à la larve de prélever les éléments qui lui sont nécessaires avec un minimum d'énergie. Dans le cas de *Dinocras cephalotes*, la récupération est bien établie dans les huit jours qui suivent le transfert et apparaît donc assez rapide. La vitesse est variable selon les organismes (Wood *et al.*, 1990 ; Pynnönen, 1992).

Toutefois, les cations considérés dans la minéralisation (sodium, calcium, potassium et magnésium) n'interviennent pas de la même façon. Le sodium, et à un moindre degré le calcium, aident au maintien de la régulation ionique. Cet effet bénéfique et significatif du sodium est confirmé en testant en laboratoire des produits utilisés pour le chaulage des eaux tels les carbonates de sodium et de calcium. Ces deux produits agissent sur deux niveaux de la physico-chimie du milieu. D'une part, les carbonates influent sur le pH et, agissent indirectement sur l'aluminium présent dans le milieu en

modifiant sa forme et donc sa toxicité et cela de façon similaire qu'ils soient issus du carbonate de calcium ou du carbonate de sodium. D'autre part, selon le produit testé, le milieu est enrichi en un cation spécifique. Les différences observées dans les réponses peuvent donc être imputées à cet apport de cations différents. Le carbonate de sodium limite plus les pertes que le carbonate de calcium, confirmant ainsi l'effet améliorant du sodium. Le calcium a des effets importants sur la physiologie, notamment des poissons (Havas et Rosseland, 1995), mais en ce qui concerne les insectes, tels que *Dinocras cephalotes*, le sodium est plus important. Ceci est rapporté pour d'autres invertébrés, par exemple *Lymnea stagnalis* (Gastéropode) et certains gammares (Twitchen, 1987 ; Dewith, 1989 ; Camargo, 1995).

A la variabilité interindividuelle à un instant donné, il convient d'ajouter la variabilité temporelle liée au cycle biologique de l'espèce. En effet, la comparaison des résultats obtenus sur les lots de larves exposés à des milieux similaires pendant des expériences différentes montre des réponses dont l'intensité varie pour une même durée d'exposition. Ainsi, par exemple, dans l'expérience présentée dans le chapitre V, les larves exposées au milieu acidifié (4.6PMAI) ont perdu environ 60 % des ions chlorures de l'hémolymphe et 70 % des ions sodium. Dans le milieu de composition similaire utilisé dans le chapitre VI.2., les pertes mesurées en chlorures et en sodium sont de 37 %. Ces différences se manifestent également pour la mortalité plus importante dans le milieu acidifié testé dans le chapitre V. (14 morts contre 5 à J<sub>7</sub>). En fait, la seule différence qui apparaît entre ces deux expériences est la période de l'année à laquelle elles ont été réalisées. La première (Chapitre V) s'est déroulée en août tandis que la seconde s'est déroulée fin avril. Il apparaît donc que les réponses varient en fonction de la saison d'étude. Cette constatation est aisément expliquée. En effet, en hiver et à la sortie de l'hiver, du fait du ralentissement de l'activité et du développement, les larves disposent de plus d'énergie qu'en été, période de forte mue et activité. D'autre part, des variations des teneurs en chlorures et sodium initiales peuvent également être mesurées selon la saison d'étude. Ce phénomène a été mis en évidence pour d'autres insectes. Rowe *et al.* (1988) a montré pour *Stenomema femoratum* de grandes variations saisonnières allant de 36 % pour les concentrations corporelles en chlorures à 45 % pour celles du sodium, et cela indépendamment de la taille du corps. Cette variation saisonnière est également rapportée pour les Corixidés par Vangenechten *et al.* (1979) et Needham (1990). Toutefois, même si des variations influent sur l'intensité des réponses, le sens de la réponse reste le même. Il faut cependant le prendre en compte, car cela pourrait éventuellement modifier l'interprétation du point de vue quantitatif.

Pour conclure :

- **au niveau des insectes.** Un enchaînement de dérèglements physiologiques initié par une perte de sodium de l'organisme vers le milieu extérieur conduit à la mort de la larve. Toutefois, tant qu'un certain seuil de perte n'est pas atteint, les mécanismes ne sont pas perturbés de façon irréversible.

*Dinocras cephalotes*, larve acido-sensible, peut par exemple tolérer une exposition en milieu acide de courte durée, et si le milieu environnant devient plus clément, les perturbations disparaissent. Toutefois, au delà du seuil de tolérance, la mort est inévitable.

- **au niveau des milieux.** Le pH, et surtout la minéralisation, apparaissent fondamentaux. Les protons perturbent la régulation ionique tandis que la faible minéralisation entraîne une mortalité élevée. Toutefois, tous les cations constituant la minéralisation du milieu n'ont pas la même influence. Le calcium et surtout le sodium, ont le plus d'impact sur la larve et sont nécessaires car ils favorisent le maintien de la régulation ionique.

Si ce travail a permis de répondre à différentes questions posées dans le cadre de l'écophysiologie d'une larve acido-sensible exposée à un milieu acidifié, des études supplémentaires s'avèrent nécessaires pour compléter les recherches en laboratoire dans ce domaine. Parmi les principales, il faut citer :

- la réalisation d'expériences ayant pour objectif de mesurer des critères physiologiques et biochimiques complémentaires à ceux déterminés dans ce travail, tels que le volume, le pH et l'osmolarité de l'hémolymphe...,
- l'étude histologique de larves exposées à un unique facteur caractéristique de l'acidification ou à leurs différentes combinaisons (comme dans le chapitre V) pour déterminer les effets dus à chacun d'eux,
- la mesure des flux d'ions entrant et sortant qui se produisent au niveau de sites spécifiques afin de définir leurs participations respectives dans la perte d'ions constatée,
- la réalisation d'expériences basées sur la création de milieux combinant des gammes de pH, de minéralisation et de concentration en aluminium plus étendues afin de confirmer la hiérarchie établie lors du présent travail,
- la définition d'une cinétique de perte ionique qui pourrait être utilisée comme indicateur de stress pour un niveau donné d'acidification.

Enfin, des études réalisées sur le terrain, essentiellement dans un objectif curatif, s'avèrent nécessaires pour l'amélioration de la physico-chimie des cours d'eau et la restauration des populations animales.

## Références bibliographiques

- ANDERSSON P., 1995. Liming strategies and effects : the Prästvallsbäcken stream case study. In "Liming of acidified waters". Eds. HENRIKSON, L. and BRODIN, Y.W. Spriger-Verlag Berlin. Chapter 15, 375-381.
- ANSTEE J.H. et BELL D.M., 1975. Relationship of Na<sup>+</sup> - K<sup>+</sup> activated ATPase to fluid production by malpighian tubules of *Locusta migratoria*. *Journal of Insect Physiology*, 21, 1779-1784.
- APPELBERG M., 1985. Changes in haemolymph ion concentrations of *Astacus astacus* L. and *Pacifastacus leniusculus* (Dana) after exposure to low pH and aluminum. *Hydrobiologia*, 121, 19-25.
- APPELBERG M., 1987. Some factors regulating the crayfish *Astacus astacus* L. in acid and neutralized waters. *Annales de la Société Royale Zoologique de Belgique*, 117, suppl.1 : Ecophysiology of acid stress in aquatic organisms (Eds. WITTERS H. and VANDERBORGHT O.), 167-179.
- AUBERT J., 1954. *Dinocras klapaleki* n. sp. et la répartition des *Dinocras* en Suisse et en Europe (Plécoptères, Perlidae). *Bulletin de la société entomologique suisse*, Band XXVII. Heft 4, 437-440.
- AUBERT J., 1959. Plecoptera. *Insecta helvetica Fauna*. Ed.: Société entomologique suisse.
- AUCLAIR J.C., FRENETTE J.J. et DODSON J., 1993. Zooplankton community structure in southwestern Québec lakes : the roles of acidity and predation. *Journal of Plankton Research*, 15(10), 1103-1128.
- BAKER J.P. et SCHOFIELD C.L., 1982. Aluminum toxicity to fish in acidic waters. *Water, Air and Soil Pollution*, 18, 289-309.
- BATTOE L.E. et LOWE E.F., 1992. Acidification of lake Annie, Highlands Co., Fl.. *Water, Air and Soil Pollution*, 65, 69-80.
- BEATTIE R.C. et TYLER-JONES R., 1992. The effects of low pH and aluminium on breeding success in the frog, *Rana temporaria*. *Journal of Herpetology*, 26(4), 353-360.
- BEAUMONT A., 1973. *Biologie animale : des protozoaires aux métazoaires épithélioneuriens*. Dunod Paris. Tome 2, Chapitre 21, 617-800.
- BELL H., 1971. Effect of low pH on the survival and emergence of aquatic insects. *Water Research*, 5, 313-319.
- BENEDETTO L., 1970. Observations on the oxygen needs of some species of european Plecoptera. *Internationale Revue der Gesamten Hydrobiologie*, 55, 505-510.
- BERRILL M., ROWE L., HOLLETT L. et HUDSON J., 1987. Response of some aquatic benthic arthropods to low pH. *Annales de la Société Royale Zoologique de Belgique*, 117, suppl.1 : Ecophysiology of acid stress in aquatic organisms (Eds. WITTERS H. and VANDERBORGHT O.), 117-128.
- BERRILL M., TAYLOR G. et SAVARD H., 1991. Are chloride cells involved in low pH tolerance and sensitivity ? The mayfly possibility. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 48, 1220-1225.
- BIRKS H.J.B., LINE J.M., JUGGINS S., STEVENSON A.C. et TER BRAAK C.J.F., 1990. Diatoms and pH reconstruction. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London*, B327, 263-278.
- BLOCK W. et VANIER G., 1994. What is ecophysiology ? Two perspectives. *Acta oecologica*, 15(1), 5-12
- BLOMQUIST P., BELL R.T., OLOFSSON H., STENSDOTTER U. et VREDE K., 1995. Plankton and water chemistry in lake Njupfatet before and after liming. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 52, 551-565.
- BOBBINK R. et ROELOFS J.G.M., 1995. Nitrogen critical loads for natural and semi-natural ecosystems : the empirical approach. *Water, Air and Soil Pollution*, 85, 2413-2418.



- BOOTH C.E., McDONALD D.G., SIMONS B.P. et WOOD C.M.**, 1988. Effects of aluminum and low pH on net ion fluxes and ion balance in the brook trout (*Salvelinus fontinalis*). *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 45(9), 1563-1574.
- BORG H., ANDERSSON P., NYBERG P. et OLOFSSON E.**, 1995. Influence of wetland liming on water chemistry of acidified mountain streams in Lofsdalen, central Sweden. *Water, Air and Soil Pollution*, 85, 907-912.
- BORNANCIN M., AVELLA M., GARDAIRE E., NANCE J-M., ISAIA J., MASONI M. et MAYER-GOSTAN N.**, 1987. Sodium and potassium influx in freshwater trout : the influence of acclimation to various freshwater environments on gill structure and sodium branchial uptake. *Annales de la Société Royale Zoologique de Belgique*, 117 suppl. 1 : Ecophysiology of acid stress in aquatic organisms (Eds. WITTERS H. and VANDERBORGHT O.), 21-31.
- BOUCHARD A.**, 1997. Recent lake acidification and recovery trends in southern Quebec, Canada. *Water, Air and Soil Pollution*, 94, 225-245.
- BOUDOT J.P., MERLET D., ROUILLER J., GUEROLD F., JACQUEMIN G. et VEIN D.**, 1996. Rapport d'étude N° 14/95 C. Convention relative à la réalisation d'une étude sur l'état de l'acidification des cours d'eau du département des Vosges. 39 pages.
- BOUSSARD J.F.**, 1980. Modifications de la prise d'oxygène des organismes d'une chaîne expérimentale dulçaquicole. Influence de la température et du cadmium, Doctorat de spécialité en écotoxicologie et en chimie de l'environnement, Univ. de Metz, 120 pages.
- BOUSSARD J.F. et PIHAN J.C.**, 1980. Méthode expérimentale adaptée à la mesure de la prise d'oxygène d'un poisson en activité spontanée. Application à l'effet de la température. *Cahiers du laboratoire de Montereau*, 10, 49-54.
- BRADFORD D.F., SWANSON C. et GORDON M.S.**, 1994. Effets of low pH and aluminium on amphibians at high elevation in the Sierra Nevada, California. *Canadian Journal of Zoology*, 72, 1272-1279.
- BRADLEY T.J., STUART A.M et SATIR P.**, 1982. The ultrastructure of the larval malpighian tubules of a saline-water mosquito. *Tissue and Cell*, 14(4), 759-773.
- BRADT P.T.**, 1996. Limestone to mitigate lake acidification : macrozoobenthos response in treated and reference in treated and reference lakes. *Hydrobiologia*, 317, 115-126.
- BRETT M.T.**, 1989. Zooplankton communities and acidification processes (a review). *Water, Air and Soil Pollution*, 44, 387-414.
- BRICKNELL I.R. et POTTS W.T.W.**, 1989. The distribution of the ion transporting cells of Plecoptera in relation to pH and the osmotic environment. *The Entomologist*, 108(3), 176-183.
- BRETTUM P.**, 1994. Acidification of the humic lake Skjervatjern ; effects on the volume and species composition of phytoplankton. *Environmental International*, 20(3), 313-319.
- BRICKER O.P. et RICE K.C.**, 1989. Acidic deposition to streams. A geology-based method predicts their sensitivity. *Environmental Science and Technology*, 379-385.
- BRICKER O.P. et RICE K.C.**, 1993. Acid rain. *Annual Revue of Earth Planetary Science*, 21, 151-174.
- BRINK P.**, 1949. Studies on swedish stoneflies (Plecoptera). *Opisto Entomology*, Lund, XI, 250 pages.
- BROWN D.J.A.**, 1981. The effects of various cations on the survival of brown trout, *Salmo trutta* at low pHs. *Journal of Fish Biology*, 18, 31-40.
- BROWN D.J.A.**, 1983. Effects of calcium and aluminium concentrations on the survival of brown trout (*Salmo trutta*) at low pH. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 30, 582-587.
- BUKAVECKAS P.A.**, 1988. Effects of lake liming on phytoplankton production in acidic Adirondack lakes. *Water, Air and Soil Pollution*, 41, 223-240.
- BUKAVECKAS P.A.**, 1989. Effects of calcite treatment on primary producers in acidified Adirondack lakes, II. Short-term response by phytoplankton communities. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 46, 352-359.
- BURNS D.A.**, 1996. The effects of liming an Adirondack lake watershed on downstream water chemistry. *Biogeochemistry*, 32, 339-362.

- CAMARGO J.A.**, 1995. Effect of body size on the intraspecific tolerance of aquatic insects to low pH : a laboratory study. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 54, 403-408.
- CANAVAN R.W. et SIVER P.A.**, 1994. Chemical and physical properties of Connecticut lakes, with emphasis on regional geology. *Lakes and Reservoirs Management*, 10(2), 175-188.
- CHAPMAN R.F.**, 1982. The insects : structure and function. Third edition. Cambridge : Harvard University Press. 919 pages.
- CHEN P.S. et LEVENBOOK L.**, 1966. Studies on the haemolymph proteins of the blowfly *Phormia regina* - I. Changes in ontogenetic patterns. *Journal of Insect Physiology*, 12, 1595-1609.
- CLARK K.L. et LAZERTE B.D.**, 1987. Intraspecific variation in hydrogen ion and aluminium toxicity in *Bufo americanus* and *Ambystoma maculatum*. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 44(9), 1622-1628.
- CLARKE A.G. et RADOJEVIC M.**, 1987. Oxidation of SO<sub>2</sub> in rainwater and its role in acid rain chemistry. *Atmospheric environment*, 21(5), 1115-1123.
- CLAYTON J.L. et MENENDEZ R.**, 1996. Macroinvertebrate responses to mitigative liming of Dogway Fork, West Virginia. *Restoration Ecology*, 4(3), 234-246.
- COLBY C.**, 1972. Salt and water balance in stonefly naiads, *Pteronarcys californica* Newport. *Comparative of Biochemistry and Physiology*, 41A, 851-860.
- COOPER P.D.**, 1994. Mechanisms of hemolymph acid-base regulation in aquatic insects. *Physiological Zoology*, 67, 1, 29-53.
- CORREA M., COLER R.A. et YIN C.M.**, 1985. Changes in oxygen consumption and nitrogen metabolism in the dragonfly *Somatochlora cingulata* exposed to aluminum in acid waters. *Hydrobiologia*, 121, 151-156.
- CORREA M., COLER R.A., YIN C.M. et KAUFMAN E.**, 1986. Oxygen consumption and ammonia excretion in the detritivore caddisfly *Limnephilus sp.* exposed to low pH and aluminum. *Hydrobiologia*, 140, 237-240.
- DAGET P. et GODRON M.**, 1974. Vocabulaire d'écologie. Ed. HACHETTE, Paris, 273 pages.
- DALZIEL T.R.K., MORRIS R. et BROWN D.J.A.**, 1986. The effects of low pH, low calcium concentrations on sodium fluxes in brown trout, *Salmo trutta* L.. *Water, Air and Soil Pollution*, 30, 569-577.
- DAVIS W.L., JONES R.G., KNIGHT J.P. et HAGLER H.K.**, 1982. An electron microscopic histochemical and X-ray microprobe study of spherites in a mussel. *Tissue and Cell*, 14(1), 61-67.
- DEHBI - ZEBBOUDJ A.**, 1989. Les algues dulcaquicoles et les pluies acides. Thèse de Doctorat, Université de Paris VI, 233 pages.
- DEJOURS P.**, 1994. La vie dans l'eau et dans l'air. In "Pour la science", Hors série : la vie dans les milieux extrêmes, octobre 1994.
- DE VRIES W.**, 1993. Average critical loads for nitrogen and sulfur and its use in acidification abatement policy in the Netherlands. *Water, Air and Soil Pollution*, 68, 399-434.
- DEWALLE D.R. et SWISTOCK B.R.**, 1994. Causes of episodic acidification in five Pennsylvania streams on the northern appalachian plateau. *Water Resources Research*, 30(7), 1955-1963.
- DEWITH N.D., KAMERIK G., SLOOTSTRA J.W., BERGEMA W.F. et VAN DER SCHORS R.C.**, 1989. The effects of external acidification on the ionic composition of the haemolymph, acid-base balance and sodium metabolism in the pulmonate freshwater snail, *Lymnaea stagnalis*. *Comparative of Biochemistry and Physiology*, 93A, 4, 833-837.
- DICKSON W.**, 1987. Practical preventive and curative measures for aquatic ecosystems. In "Air pollution and ecosystems ; Proceedings of an international symposium held in Grenoble, France". Ed. MATHY, P. 469-475.
- DICKSON W., BORG H., EKSTROM C., HORNSTROM E. et GRONLUND T.**, 1995. Reliming and reacidification effects of lakewater. *Water, Air and Soil Pollution*, 85, 919-924.
- DILLON P.J., YAN N.D. et HARVEY H.H.**, 1984. Acidic deposition : effects on aquatic ecosystems. *Critical reviews in Environmental Control*, 13(3), 167-194.
- DIXIT S.S., SMOL J.P., KINGSTOM J.C. et CHARLES D.F.**, 1992. Diatoms : powerful indicators of environmental change. *Environmental Science and Technology*, 26(1), 23-33.

- DRISCOLL C.T., BAKER J.P., BISOGNI J.J. et SCHOFIELD C.L.**, 1980. Effect of aluminium speciation on fish in delute acidified waters. *Nature*, 284, 161-164.
- DRISCOLL C.T., FORDHAM G.F., AYLING W.A. et OLIVER L.M.**, 1989a. Short-term changes in the chemistry of trace metals following calcium carbonate treatment of acidic lakes. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 46(2), 249-257.
- DRISCOLL C.T., AYLING W.A., FORDHAM G.F. et OLIVER L.M.**, 1989b. Chemical responses of lakes treated with CaCO<sub>3</sub> to reacidification. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 46(2), 249-257.
- DRISCOLL C.T. et VAN DREASON R.**, 1993. Seasonal and long-term temporal patterns in the chemistry of Adirondack lakes. *Water, Air and Soil Pollution*, 67, 319-344.
- EDWARDS H.A.**, 1982. *Aedes aegypti* : energetics of osmoregulation. *Journal of Experimental Biology*, 101, 135-141.
- EDWARDS H.A.**, 1982. Free amino acids as regulators of osmotic pressure in aquatic insect larvae. *Journal of Experimental Biology*, 101, 153-160.
- EGGLETON M.A., MORGAN E.L. et PENNINGTON W.L.**, 1996. Effects of liming on an acid-sensitive southern appalachian stream. *Restoration Ecology*, 4(3), 247-263.
- EK A., GRAHN O., HULTBERG H. et RENBERG I.**, 1995. Recovery from acidification in Lake Örvattnet, Sweden. *Water, Air and Soil Pollution*, 85, 1795-1800.
- ELLIOTT J.M.**, 1989. The effect of temperature on egg hatching for three populations of *Dinocras cephalotes* (Plecoptera: Perlidae). *Entomologist's gazette*, 40, 153-158.
- ENGBLOM E. et LINGBELL P.E.**, 1984. The mapping of short-term acidification with the help of biological indicators. Institute of Freshwater research, Drottingholm, report 61, 60-68.
- ERIKSEN C.H., RESH J.H., BALLING S.S. et LAMBERTI G.A.**, 1984. Aquatic insect respiration. In "An introduction to the aquatic insects of North america". Eds. MERRITT R.W. et CUMMINS K.W., 27-37.
- FILSHIE B.K. et CAMPBELL I.C.**, 1984. Design of an insect cuticle associated with osmoregulation : the porous plates of chloride cells in a mayfly nymph. *Tissue and Cell*, 16(5), 789-803.
- FJELD E., HESSEN D.O., ROOS N. et TAUGBOL T.**, 1988. Changes in gill ultrastructure and haemolymph chloride concentrations in the crayfish, *Astacus astacus*, exposed to de-acidified aluminium-rich water. *Aquaculture*, 72, 139-150.
- FJELLHEIM A. et RADDUM G.G.**, 1995. Benthic animal response after liming of three south norwegian rivers. *Water, Air and Soil Pollution*, 85, 931-936.
- FLORKIN M. et JEUNIAUX C.**, 1974. Hemolymph : composition. In "The physiology of insecta", Vol.5, Ed. ROCKSTEIN M., Academic Press, New-York.
- FORDHAM G.F. et DRISCOLL C.T.**, 1989. Short-term changes in the acid-base chemistry of two acidic lakes following calcium carbonate treatment. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 46(2), 306-314.
- FORSBERG C., MORLING G. et WETZEL R.G.**, 1985. Indications of the capacity for rapid reversibility of lake acidification. *Ambio*, 14(3), 164-166.
- FORSBERG C. et MORLING G.**, 1988. Examples of changes in water chemistry during lake acidification and "deacidification". *Verhandlungen der Internationalen Vereinigung für Limnologie*, 23, 193-199.
- FREDA J. et DUNSON W.A.**, 1984. Sodium balance of amphibian larvae exposed to low environmental pH. *Physiological Zoology*, 57(4), 435-443.
- FREDA J. et MCDONALD D.G.**, 1990. Effects of aluminum on the leopard frog, *Rana pipiens* : life stage comparisons and aluminum uptake. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 47, 210-216.
- FRICK K.G. et HERMANN J.**, 1989. Aluminium accumulation in a lotic mayfly at a low pH - A laboratory study. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 18.
- FRICK K.G.**, 1990. Effects of aluminium and pH on sodium ion regulation in two mayflies species. In "Ecophysiological effects of pH and aluminium on lotic mayflies" ISBN 91 - 7105 - 003 - 5. SE- Lunds / NBZE - 90 / 1049 + 48 pages. Grahn's Boktryckeri, Lund, Sweden, 1990.

- FRUTIGER A.**, 1987. Investigations on the life-history of the stonefly *Dinocras cephalotes* Curt. (Plecoptera, Perlidae). *Aquatic insects*, 9(1), 51-63.
- GAGEN C.J. et SHARPE W.E.**, 1987. Influence of acid runoff episodes on survival and net sodium balance of brook trout (*Salvelinus fontinalis*) confined in a mountain stream. *Annales de la Société Royale Zoologique de Belgique*, 117, suppl.1 : Ecophysiology of acid stress in aquatic organisms (Eds. WITTERS H. and VANDERBORGHT O.), 219-230.
- GAHNSTRÖM G, BLOMQVIST P. et FLEISCHER S.**, 1993. Are key nitrogen fluxes changed in the acidified aquatic ecosystem. *Ambio*, 22(5), 318-324.
- GALLE C.**, 1992. Comportement de l'aluminium dans l'organisme de deux variétés de poissons vivant en eaux périodiquement acidifiées. Thèse de doctorat, Université de Clermont Ferrand I, 149 pages.
- GALLOWAY J.N., HENDREY G.R., SCHOFIELD C.L., PETERS N.E. et JOHANNES A.H.**, 1987. Processes and causes of lake acidification during spring snowmelt in the West-Central adirondack mountains, New-York. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 44(9), 1595-1602.
- GALLOWAY J.N., DIANWU Z., THOMSON V.E. et CHANG L.H.**, 1996. Nitrogen mobilization in the United States of America and the people's of Republic of China. *Atmospheric Environment*, 30(10/11), 1551-1561.
- GASCON C. et PLANAS D.**, 1986. Spring pond water chemistry and the reproduction of the wood frog, *Rana sylvatica*. *Canadian Journal of Zoology*, 64, 543-550.
- GASCON, C., PLANAS, D. et MOREAU, G.**, 1987. The interaction of pH, calcium and aluminium concentrations on the survival and development of wood frog (*Rana sylvatica*) eggs and tadpoles. *Annales de la Société Royale Zoologique de Belgique*, 117, suppl.1 : Ecophysiology of acid stress in aquatic organisms (Eds. WITTERS H. and VANDERBORGHT O.), 189-199.
- GEE A.S. et STONER J.H.**, 1988. The effects of afforestation and acid deposition on the water quality and ecology of upland Wales. In "Ecological change in the upland", Eds. USHER M.B. et THOMPSON D.B.A., 7, 273-287.
- GERHARDT A.**, 1992. Acute toxicity of Cd in stream in vertebrates in relation to pH and test design. *Hydrobiologia*, 239, 93-100.
- GONZALEZ R.J. et DUNSON W.A.**, 1989. Mechanisms for tolerance of sodium loss during exposure to low pH of the acid-tolerant sunfish *Enneacanthus obesus*. *Physiological Zoology*, 62(6), 1219-1231.
- GORHAM E.**, 1994. Atmospheric chemistry : neutralizing acid rain. *Nature*, 367, 321.
- GOUGH C.A., BAILEY P.D., BIEWALD B., KUYLENSTIERNA J.C.I. et CHADWICK M.J.**, 1994. Environmentally targeted objectives for reducing acidification in Europe. *Energy Policy*, 22(12), 1055-1066.
- GRANT K.P. et LICHT L.E.**, 1993. Acid tolerance of anuran embryos and larvae from central Ontario. *Journal of Herpetology*, 27(1), 1-6.
- GRIFFITHS R.W. et KELLER W.**, 1992. Benthic macroinvertebrate changes in lakes near Sudbury, Ontario, following a reduction in acid emissions. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 49(1), 63-75.
- GRIZZLE J.M. et MAULDIN II A.C.**, 1994. Age - related changes in survival of larval and juvenile striped bass in different concentrations of calcium and sodium. *Transactions of the American Fisheries Society*, 123, 1002-1005.
- GUEROLD F.**, 1992. L'acidification des cours d'eau : impact sur les peuplements de macroinvertébrés benthiques : application au massif vosgien. Thèse de doctorat, Université de Metz, 251 pages.
- GUEROLD F., VEIN D., JACQUEMIN G. et MORETEAU J.C.**, 1993. Impact de l'acidification des ruisseaux vosgiens sur la biodiversité de la macrofaune benthique. *Comptes Rendus de l'Académie des Sciences*, 316, 1388-1892.
- GUEROLD F., GIAMBERINI L., TOURMANN J.L., PIHAN J.C. et KAUFMANN R.**, 1995. Occurrence of aluminium in chlorid cells of *Perla marginata* (Plecoptera) after exposure to low pH and elevated aluminium concentration. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 54, 620-625.

- GUEROLD F., BOUDOT J.P., MERLET D., ROUILLER J., VEIN D. et JACQUEMIN G.**, 1997. Evaluation de l'état d'acidification des cours d'eau du département des vosges. Rapport d'étude, Convention N° 14/95 C, 63 pages + annexes.
- GUNN J.M. et KELLER W.**, 1990. Biological recovery of an acid lake after reductions in industrial emissions of sulphur. *Nature*, 345 (6274), 431-433.
- HALL L.W.Jr, KILLEN W.D., FISCHER S.A., ZIEGENFUSS M.C., ANDERSON R.D. et KLAUDA R.J.**, 1994. The efficacy of a limestone doser to mitigate stream acidification in a maryland coastal plain stream: implications for migratory fish species. *Environmental Monitoring and Assessment*, 31, 233-257.
- HAMILTON S.J. et HAINES T.A.**, 1995. Influence of fluoride on aluminum toxicity to Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 52, 2432-2444.
- HARRICHAUX P., POIZOT A. et FREVILLE M.**, 1972. Mechanism of respiratory exchanges in aquatic environment. A general review including personal results, *Revue Internationale d'Océanographie Médicale*, XXVII, 71-84.
- HARRISON R.M.**, 1987. Atmospheric chemical processes relevant to acid rain problems. In "Scientific and technical advances". Eds. PERRY R., HARRISON R.M., BELL J.N.B. et LESTER J.N., 3-13.
- HAVAS M.**, 1981. Physiological response of aquatic animals to low pH. In "Effects of acidic precipitation on benthos". Ed. SINGER R., Springfield North American Benthological Society, 49-65.
- HAVAS M.**, 1987. Does hemoglobin enhance the acid-tolerance of *Daphnia* ? *Annales de la Société Royale Zoologique de Belgique*, 117, suppl.1 : Ecophysiology of acid stress in aquatic organisms (Eds. WITTERS H. and VANDERBORGHT O.), 151-164.
- HAVAS K.E. et HUTCHINSON T.C.**, 1982. Aquatic invertebrate from the smoking hills : effect of pH and metals on mortality. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 39, 890-903.
- HAVAS M. et HUTCHINSON T.C.**, 1983. Effects of low pH on the chemical composition of aquatic invertebrates from tundra ponds at the Smoking hills, N.W.T., Canada. *Canadian Journal of Zoology*, 61, 241-249.
- HAVAS M. et LIKENS G.E.**, 1985. Changes in <sup>22</sup>Na influx and outflux in *Daphnia magna* (Straus) as a function of elevated aluminum concentrations in soft water at low pH. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*, 82, 7345-7349.
- HAVAS M. et ADVOKAAT E.**, 1995. Can sodium regulation be used to predict the relative acid-sensitivity of various life-stages and different species of aquatic fauna ? *Water, Air and Soil Pollution*, 85, 865-870.
- HAVAS M. et ROSSELAND B.O.**, 1995. Response of zooplankton, benthos, and fish to acidification : an overview. *Water, Air and Soil Pollution*, 85, 51-62.
- HAVENS K.E.**, 1992. Acid and aluminum effects on sodium homeostasis and survival of acid sensitive and acid tolerant *Cladocera*. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 49(11), 2392-2398.
- HENRIKSEN A.**, 1985. Acid rain in Norway : effects on lake and river systems. Proceedings of "lake pollution and recovery", Rome, 15th-18th april. Eds. VISMARA R., MARFORIO R., MEZZANOTTE V. et CERNUSCHI S., 426-441.
- HENRIKSEN A., KAMARI J., POSCH M. et WILANDER A.**, 1992. Critical loads of acidity : Nordic surface waters. *Ambio*, 21(5), 356-363.
- HENRIKSON L. et BRODIN Y.W.**, 1995. Liming of acidified surface waters : a swedish synthesis. Ed. SPRINGER VERLAG, Berlin, 485 pages.
- HENRIKSON L., HINDAR A. et THORNELOF E.**, 1995. Freshwater liming. *Water, Air and Soil Pollution*, 85, 131-142.
- HERLIHY A.T., KAUFMANN P.R., CHURCH M.R., WIGINGTON P.J. Jr., WEBB J.R. et SALE M.J.**, 1993. The effects of acidic deposition on streams in the appalachian mountains and Piedmont region of the mid-Atlantic United States. *Water Resources Research*, 29(8), 2687-2703.

- HERRMANN J et ANDERSSON K.G.**, 1986. Aluminium impact on respiration of lotic mayflies at low pH. *Water, Air and Soil Pollution*, 30, 703-709.
- HERRMANN J.**, 1987. Sodium levels of lotic mayfly nymphs being exposed to aluminium at low pH. A preliminary report. *Annales de la Société Royale Zoologique de Belgique*, 117, suppl.1 : Ecophysiology of acid stress in aquatic organisms (Eds. WITTERS H. and VANDERBORGHT O.), 181-188.
- HETTELINGH J.P., DOWNING R.J. et De SMET P.A.M.**, 1992. The critical loads concept for the control of acidification. In "Acidification research. Evaluation and policy applications". Ed. SCHNEIDER T., Elsevier Science Publishers. B.V.
- HEVERT F.**, 1985. Water and salt relations. In "Environmental physiology and biochemistry of insects". Ed. HOFFMANN K.H., Springer - Verlag, Chapter 7, 184-205.
- HINDAR A., HENRIKSEN A., TORSETH K. et SEMB A.**, 1994. Acid water and fish death. *Nature*, 372(6504), 327-328.
- HINDAR A., KROGLUND F., LYDERSEN E., SKIPLE A. et HOGBERGET R.**, 1996. Liming of wetlands in the acidified lake Roynelandsvatn catchment in southern Norway : effects on stream water chemistry. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 53(5), 985-993.
- HOFFMANN J.**, 1960. Faune des plécoptères du Grand-Duché de Luxembourg. Extrait des "archives". Tome XXVII. Nouvelle série.
- HOLLETT L., BERRILL M., et ROWE L.**, 1986. Variation in major ion concentration of *Cambarus robustus* and *Oronectes rusticus* following exposure to low pH. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 43, 2040-2044.
- HORNE M.T. et DUNSON W.A.**, 1995. Effects of low pH, metals and water hardness on larval amphibians. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 29, 500-505.
- HORNUNG M. et REYNOLDS B.**, 1995. The effects of natural and anthropogenic environmental changes on ecosystem processes at the catchment scale. *Tree*, 10(11), 443-448.
- HOWELLS G.**, 1990. Acid rain and acid waters. Ed. HORWOOD E., Chichester, England, 215 pages.
- HUCKABEE J.W.**, 1989. An assessment of the ecological effects of acidic deposition. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 18, 3-27.
- HURU H.**, 1987. Occurrence and life cycle of *Dinocras cephalotes* (Curtis, 1827) (Plec.; Perlidae) in North Norway. *Fauna Norvegica, Ser. B.* 34, 14-18.
- HUTCHINSON N.J., HOLTZE K.E., MUNRO J.R. et PAWSON T.W.**, 1987. Lethal responses of salmonid early life stages to H<sup>+</sup> and Al in dilute waters. *Annales de la Société Royale Zoologique de Belgique*, 117, suppl.1 : Ecophysiology of acid stress in aquatic organisms (Eds. WITTERS H. and VANDERBORGHT O.), 201-217.
- HUTCHINSON N.J., HOLTZE K.E., MUNRO J.R. et PAWSON T.W.**, 1989. Modifying effects of life stage, ionic strength and post-exposure mortality on lethality of H<sup>+</sup> and Al to lake trout and brook trout. *Aquatic Toxicology*, 15, 1-26.
- HYNES H.B.N.**, 1976. Biology of Plecoptera. *Annual review of entomology*, 21, 135-153.
- ILLIES J.**, 1978. Limnofauna Europea. Ed. FISHER VERLAG. Plecoptera, 264-273.
- JARIAL M.S.**, 1995. Fine structure of anal papillae in larval chironomids, *Chironomus tentans* (Diptera) with reference to ionic and macromolecular transport. *Invertebrate Biology*, 114(4), 324-333.
- JEANTET A.Y., MARTOJA R. et TRUCHET M.**, 1974. Rôle des sphérocristaux de l'épithélium intestinal dans la résistance d'un insecte aux pollutions minérales : données expérimentales obtenues par utilisation de la microsonde électronique et du micro-analyseur par émission ionique secondaire. *Comptes Rendus de l'Académie des Sciences*, 278, 1441-1444.
- JEFFRIES D.S.**, 1990. Snowpack storage of pollutants, release during melting, and impact on receiving waters. In "acidic precipitation". Eds. NORTON S.A., LINDBERG S.E. et PAGE A.L., Springer Verlag, 4, 107-132.
- JENSEN F.B. et MALTE H.**, 1990. Acid-base and electrolyte regulation, and haemolymph gas transport in crayfish, *Astacus astacus*, exposed to soft, acid water with and without aluminium. *Journal of Comparative Physiology B.*, 160, 483-490.

- JEFFRIES D.S. et LAM D.C.L.**, 1993. Assessment of the effects of acidic deposition on canadian lakes : determination of critical loads for sulphate deposition. *Water Science and Technology*, 28(3-5), 183-187.
- JOHANNESSEN M., SKARTVEIT A. et WRIGHT R.F.**, 1980. Streamwater chemistry before, during and after snowmelt. *Proceedings of the International Conference on the Ecological Impact of Acid Precipitations*, Norway 1980, SNSF project, 224-225.
- JOHANNESSEN T.**, 1995. Acidification in Norway. The norwegian monitoring programme for long range transported air pollutants. *Water, Air and Soil Pollution*, 85, 617-621.
- JULIEN P., CORRIVAUT G.W. et PERRON J.M.**, 1977. Evolution comparative des protéines de l'hémolymphe et des corps gras de *Calliphora erythrocephala*. *Insect Biochemistry*, 7, 109-114.
- KAPPOR N.N.**, 1972. Oxygen consumption of *Paragnetina media* (Walker) : light-dark effects on the respiratory rates. *Experientia*, 28, 1311-1312.
- KAPOOR N.N.**, 1974. Some studies on the respiration of stonefly nymph, *Paragnetina media* (Walker). *Hydrobiologia*, 44(1), 37-41.
- KAPOOR N.N.**, 1978. Effect of salinity on the osmoregulatory cells in the tracheal gills of the stonefly nymph, *Paragnetina media* (Plecoptera, Perlidae). *Canadian Journal of Zoology*, 56, 2608-2616.
- KAPOOR N.N.**, 1979. Osmotic regulation and salinity tolerance of the Stonefly nymph, *Paragnetina media*. *Journal of Insect Physiology*, 25, 17-20.
- KAPPOR N.N.**, 1980. Relationship between gill  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  - activated ATPase activity and osmotic stress in the plecopteran nymph, *Paragnetina media*. *The Journal of Experimental Zoology*, 213, 213-218.
- KAPOOR N.N.**, 1994. A study of the malpighian tubules of the plecopteran nymph *Paragnetina media* (walker) (Plecoptera, Perlidae) by light, scanning electron and transmission electron microscopy. *Canadian Journal of Zoology*, 72, 1566-1575.
- KAPOOR N.N. et ZACHARIAH K.**, 1973a. Presence of specialized cellular complexes in the trachean gills of stonefly nymph, *Paragnetina media*. *Experientia*, 29, 848-850.
- KAPOOR N.N. et ZACHARIAH K.**, 1973b. A study of specialized cells of the trachean gills of *Paragnetina media* (Plecoptera). *Canadian Journal of Zoology*, 51, 983-986.
- KAPOOR N.N. et GRIFFITHS W.**, 1976. The effect of copper on the oxygen consumption rates of the stonefly nymph, *Phasganophora capitata* (Pictet) (Plecoptera). *Zoological Journal of the Linnean Society*, 59(2), 209-215.
- KARLSSON-NORRGREN L., DICKSON W., LJUNGBERG O. et RUNN P.**, 1986. Acid water and aluminium gill exposure : gill lesions and aluminium accumulation in farmed brown trout, *Salmo trutta* L. *Journal of Fish Diseases*, 9, 1-9.
- KELLER W. et PITBLADO J.R.**, 1984. Crustacean plankton in northeastern Ontario lakes subjected to acidic deposition. *Water, Air and Soil Pollution*, 23, 271-291.
- KELLER W. et YAN N.D.**, 1991. Recovery of crustacean zooplankton species richness in Sudbury area lakes following water quality improvements. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 48, 1634-1644.
- KELLER W., GUNN J.M. et YAN N.D.**, 1992a. Evidence of biological recovery in acid-stressed lakes near Sudbury, Canada. *Environmental Pollution*, 78, 79-85.
- KELLER W., YAN N.D., HOWELL T., MOLOT L.A. et TAYLOR W.D.**, 1992b. Changes in zooplankton during the experimental neutralization and early reacidification of Bowland lake near Sudbury, Ontario. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 49(suppl.1), 55-62.
- KOMNICK H.**, 1977. Chloride cells and chloride epithelia of aquatic insects. *International Revue of Cytology*, 49, 285-329.
- KOMNICK H., RHEES R.W. et ABEL J.H. Jr.**, 1972. The function of ephemeropterid chloride cells. Histochemical, autoradiographic and physiological studies with radioactive chloride on *Callibaetis*. *Cytobiology*, 5(1), 65-82.
- KOPACEK J. et STUHLIK E.**, 1994. Chemical characteristics of lakes in the high Tatra mountains, Slovakia. *Hydrobiologia*, 274, 49-56.

- KRATZ K.W., COOPER S.D. et MELACK J.M., 1994. Effects of single and repeated experimental acid pulses on invertebrates in a high altitude Sierra Nevada stream. *Freshwater Biology*, 32, 161-183.
- KUOPPAMÄKI K., 1993. Effects of liming on crustacean zooplankton in an acidified, artificially divided forest lake in Southern Finland. *Verhandlungen der Internationalen Vereinigung für Limnologie*, 25, 529-533.
- KURTZ D., EGGENBERGER U. et RIHM B., 1995. Evaluating critical loads of acidity for swiss forest soils : comparison of two calculation methods. *Water, Air and Soil Pollution*, 85, 2533-2538.
- LARSEN B.M. et HESTHAGEN T., 1995. The effects of liming on juvenile stocks of Atlantic salmon (*Salmo salar*) and brown trout (*Salmo trutta*) in a norwegian river. *Water, Air and Soil Pollution*, 85, 991-996.
- LECHLEITNER R., CHERRY D., CAIRNS J. et STETLER D., 1985. Ionoregulatory and toxicological responses of stonefly nymphs (Plecoptera) to acidic and alkaline pH. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 14, 179-185.
- LEE R.M., GERKING S.D. et JEZIERSKA B., 1983. Electrolyte balance and energy mobilization in acid stressed rainbow trout, *Salmo gairdneri*, and their relation to reproductive success. *Environmental Biology of Fishes*, 8, 115-123.
- LENFANT C., 1961. A method for measuring  $VO_2$  et  $VeO_2$  of very small sea animals. *Journal of Applied Physiology*, 63(5), 768-770.
- LEUVEN R.S.E.W., VAN DER VELDE G. et KERSTEN H.L.M., 1992. Interrelations between pH and other physico-chemical factors of Dutch soft waters. *Archives of Hydrobiology*, 126 (1), 27-51.
- LILLEHAMMER A., 1987. Egg development of the stoneflies *Siphonoperla burmeisteri* (Chloroperlidae) and *Dinocras cephalotes* (Perlidae). *Freshwater Biology*, 17, 35-39.
- LINDMARK G.K., 1984. Acidified lakes : ecosystem response following sediment treatment with sodium carbonate. *Verhandlungen der Internationalen Vereinigung für Limnologie*, 22, 772-779.
- LINDMARK G.K., 1990. Soda ash briquettes in lake sediments - a new approach in reclamation of acidified waters. *Verhandlungen der Internationalen Vereinigung für Limnologie*, 24, 173-178.
- LINDMARK G.K., 1993. Soda ash for mitigation in acidified waters. Long-term lake response and efficiency. *Verhandlungen der Internationalen Vereinigung für Limnologie*, 25, 494-499.
- LINGBELL P.E. et ENGBLOM E., 1995. Liming restores the benthic invertebrate community to "pristine" state. *Water, Air and Soil Pollution*, 85, 955-960.
- LOCKE A., SPRULES W.G., KELLER W. et PITBLADO J.R., 1994. Zooplankton communities and water chemistry of Sudbury area lakes: Changes related to pH recovery. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 51, 151-160.
- LUCY F., COSTELLO M.J. et GILLER P.S., 1990. Diet of *Dinocras cephalotes* and *Perla bipunctata* (Plecoptera, Perlidae) in a South-West Irish stream. *Aquatic Insects*, 12(4), 199-207.
- LYDERSEN E., 1990. The solubility and hydrolysis of aqueous aluminium hydroxides in dilute fresh waters at different temperatures. *Nordic Hydrology*, 21, 195-204.
- MADDRELL S.H.P., 1977. Insect malpighian tubules. In "Transport of ions and water in animals". Eds. GUPTA B.L., MORETON R.B., OSCHMAN J.L. et WALLS B.J. Academic press, New-York, 57-82.
- MÄKELA T.P. et OIKARI A.O.J., 1992. The effects of low water pH on the ionic balance in freshwater mussel *Anodonta anatina* L. *Annales Zoologici Fennici*, 29, 169-175.
- MALLEY D.F., 1980. Decreased survival and calcium uptake by the crayfish *Oronectes virilis* in low pH. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 37, 364-372.
- MALLEY D.F., HUEBNER J.D. et DONKERSLOOT K., 1988. Effects of ionic composition of blood and tissues of *Anodonta grandis grandis* (Bivalvia) of an addition of aluminum and acid to lake. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 17, 479-491.



- MANSUY D.**, 1992. Les granites et la couverture pédologique dans le bassin du Rouge-Rupt. Leurs participations au contrôle de l'acidification des eaux (Cornimont - Vosges méridionales). Thèse de doctorat, Université de Nancy, 211 pages.
- MARCHETTO A., MOSELLO R., PSENER R., BARBIERI A., BENEDETTA G., TAIT D. et TARTARI G.A.**, 1994. Evaluation of the level of acidification and the critical loads for alpine lakes. *Ambio*, 23(2), 150-154.
- MARMOREK D.R.**, 1984. Changes in the temporal behavior and size structure of plankton systems in acid lakes. In "Early biotic responses to advancing lake acidification", Acid Precipitation Series, Volume 6. Ed. HENDREY G.R., Chapitre II, 23-41.
- MARTOJA R. et MARTOJA J.**, 1967. Initiation aux techniques de l'histologie animale. Masson et Cie.
- MASON T.**, 1989. The causes and consequences of surface water acidification. In "Acid toxicity and aquatic animals". Eds. MORRIS R., TAYLOR E.W., BROWN D.J.A. et BROWN, J.A., 1-12.
- MASSABUAU J.C.**, 1985. Pluies acides et physiologie des animaux aquatiques. *Bulletin de la Société d'Ecophysiologie*, 10(2), 59-74.
- MASSABUAU J.C., FRITZ B. et BURTIN B.**, 1987. Mise en évidence de ruisseaux acides (pH  $\leq$  5) dans les Vosges. *Comptes Rendus de l'Académie des Sciences*, 305, 121-124.
- McCAHON C.P., PASCOE D. et McKAVANAGH C.**, 1987. Histochemical observations on the salmonids *Salmo salar* L. and *Salmo trutta* L. and the ephemeropterans *Baetis rhodani* (Pict.) and *Ecdyonurus venosus* (Fabr.) following a simulated episode of acidity in an upland stream. *Hydrobiologia*, 153, 3-12.
- McDONALD D.G.**, 1983. The effects of H<sup>+</sup> upon the gills of freshwater fish. *Canadian Journal of Zoology*, 61, 691-703.
- McDONALD D.G. et WOOD C.M.**, 1981. Branchial, renal acid and ion fluxes in the rainbow trout, *Salmo gairdneri* at low environmental pH. *Journal of Experimental Biology*, 93, 101-118.
- McDONALD D.G., OZOG J.L. et SIMONS B.P.**, 1984. The influence of low pH environments on ion regulation in the larval stages of the anuran amphibian, *Rana clamitans*. *Canadian Journal of Zoology*, 62, 2171-2177.
- McNICOL D.K. et MALLORY M.L.**, 1994. Trends in small lake water chemistry near Sudbury, Canada, 1983-1991. *Water, Air and Soil Pollution*, 73, 105-120.
- McWILLIAMS P.G.**, 1980. Effects of pH on sodium uptake in norwegian brown trout (*Salmo trutta*) from an acid river. *Journal of Experimental Biology*, 88, 259-267.
- MEEGAN S.K. et PERRY S.A.**, 1996. Periphyton communities in headwater streams of different chemistry in the central appalachian mountains. *Journal of Freshwater Ecology*, 11(3), 247-256.
- MENENDEZ R., CLAYTON J.L. et ZURBUCH P.E.**, 1996. Chemical and fishery responses to mitigative liming of an acidic stream, Dogway Fork, West Virginia. *Restoration Ecology*, 4(3), 220-223.
- MERRETT W.J., RUTT G.P., WEATHERLEY N.S., THOMAS S.P. et ORMEROD S.J.**, 1991. The response of macroinvertebrates to low pH and increased aluminium concentrations in Welsh streams: multiple episodes and chronic exposure. *Archives für Hydrobiologie*, 121, 115-125.
- MILL W.**, 1995. Critical loads mapping in Poland : lessons learned. *Water, Air and Soil Pollution*, 85, 2547-2552.
- MILLIGAN C.L. et WOOD C.M.**, 1982. Disturbances in hematology, fluid volume distribution and circulatory function associated with low environmental pH in the rainbow trout, *Salmo gairdneri*. *Journal of Experimental Biology*, 99, 397-415.
- MOISEENKO T.**, 1994. Acidification and critical loads in surface waters : Kola, Northern Russia. *Ambio*, 23(7), 418-424.
- MOHNEN V.A.**, 1988. The challenge of acid rain. *Scientific American*, 259, 30-38.
- MORGAN D.O. et McMAHON B.R.**, 1982. Acid tolerance and effects of sublethal acid exposure on iono-regulation and acid-base status in two crayfish *Procambarus clarki* and *Oreonectes rusticus*. *Journal of Experimental Biology*, 97, 241-252.

- MORLING G. et PEJLER B., 1990. Acidification and zooplankton development in some west-swedish lakes 1966-1983. *Limnologica*, 20(2), 307-318.
- MULHOLLAND P.J., DRISCOLL C.T., ELWOOD J.W., OSGOOD M.P., PALUMBO A.V., ROSEMOND A.D., SMITH M.E. et SCHOFIELD C., 1992. Relationships between stream acidity and bacteria, macroinvertebrates, and fish : a comparison of north temperate and south temperate mountain streams, USA. *Hydrobiologia*, 239, 7-24.
- MUNIZ I.P. et LEIVESTAD H., 1980. Toxic effects of aluminium on the brown trout, *Salmo trutta* L.. *Proceedings of the International Conference on the Ecological Impact of Acid Precipitation*, Norway, SNSF - project, 318-319.
- MURDOCH P.S. et STODDARD J.L., 1992. The role of nitrate in the acidification of streams in the Catskill mountains of New-York. *Water Resources Research*, 28(10), 2707-2720.
- NEEDHAM K.M., 1990. Specific and seasonal variation in survival and sodium balance at low pH in five species of waterboatman (Hemiptere ; Corixidae). Master of science, University of British Columbia, Vancouver, 86 pages.
- NEVILLE C.M., 1985. Physiological responses of juvenile rainbow trout, *Salmo gairdneri* to acid and aluminum - prediction of field responses from laboratory data. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 42, 2004-2019.
- NEWELL A.D. et SKJELKVALE B.L., 1997. Acidification trends in surface waters in the international program on acidification of rivers and lakes. *Water, Air and Soil Pollution*, 93, 27-57.
- NEWTON R.M., BURNS D.A., BLETTE V.L. et DRISCOLL C.T., 1996. Effect of whole catchment liming on the episodic acidification of two adirondack streams. *Biogeochemistry*, 32, 299-322.
- NICHOLLS S.P., 1983. Ultrastructural evidence for paracellular fluid flow in the malpighian tubules of a larval mayfly. *Tissue and Cell*, 15(4), 627-637.
- NICHOLLS K.H., NAKAMOTO L. et KELLER W., 1992. Phytoplankton of Sudbury area lakes (Ontario) and relationships with acidification status. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 49(1), 40-51.
- NIKOLAIDIS N.P., NIKOLAIDIS V.S. et OLEM H., 1989. Acidic deposition. *Journal of Water and Pollution Control Federation*, 61(6), 1109-1121.
- NISBET T.R., 1993. The effects of a pelletised limestone treatment on drainage water acidity within a forest catchment in mid-Wales. *Journal of Hydrology*, 150, 521-539.
- NYBERG, 1984. Effects of liming on fisheries. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London*, B305, 549-560.
- O'BRIEN A.K., RICE K.C., KENNEDY M.M. et BRICKER O.P., 1993. Comparison of episodic acidification of Mid-Atlantic upland and coastal plains streams. *Water Resources Research*, 29(9), 3029-3039.
- ODEN S., 1976. The acidity problem - an outline of concepts. *Water, Air and Soil Pollution*, 6, 137-166.
- OKLAND J. et OKLAND K., 1986. The effects of acid deposition on benthic animals in lakes and streams. *Experientia*, 42, 471-486.
- PACKER R.K., 1979. Acid-base balance and gas exchange in brook trout (*Salvelinus fontinalis*) exposed to acidic environments. *Journal of Experimental Biology*, 79, 127-134.
- PARENT L., ALLARD M., PLANAS D. et MOREAU G., 1986. The effects of short-term and continuous experimental acidification on biomass and productivity of running water periphytic algae. In "Impact of acid rain and deposition on aquatic biological systems". Eds. ISOM B.G., DENNIS S.D. et BATES J.M. American Society for Testing and Materials STP 928, Philadelphia, 28-41.
- PARTY J.P., PROBST A. et DAMBRINE E., 1993. Détermination et cartographie des charges critiques en polluants atmosphériques dans les Vosges. Agence de l'Eau Rhin - Meuse, N° 17571, 68 pages.
- PARTY J.P., PROBST A., DAMBRINE E. et THOMAS A.L., 1995. Critical loads of acidity to surface waters in the Vosges massif (Nord-Est of France). *Water, Air and Soil Pollution*, 85, 2407-2412.

- PINEL-ALLOUL B.**, 1987. Structure spatiale du zooplancton des lacs du Quebec : relation avec l'acidité. *Le Naturaliste Canadien*, 114, 295-305.
- PINKERTON J.F.**, 1993. Emissions of SO<sub>2</sub> and NO<sub>x</sub> from pulp and paper mills. *Air and Waste*, 43, 1404-1407.
- PLANAS D., LAPIERRE L., MOREAU G. et ALLARD M.**, 1989. Structural organization and species composition of a lotic periphyton community in response to experimental acidification. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 46(5), 827-835.
- PLANAS D.**, 1996. Acidification effects. *Algal Ecology*, 497-530.
- PLAYLE R.C., GOSS G.G. et WOOD C.M.**, 1989. Physiological disturbances in rainbow trout (*Salmo gairdneri*) during acid and aluminum exposures in soft water of two calcium concentrations. *Canadian Journal of Zoology*, 67, 314-324.
- POLEO A.B.S.**, 1995. Aluminium polymerization - a mechanism of acute toxicity of aqueous aluminium to fish. *Aquatic Toxicology*, 31, 347-356.
- POSCH M, KÄMÄRI J, FORSIUS M., HENRIKSEN A. et WILANDER A.**, 1997. Exceedance of critical loads for lakes in Finland, Norway, and Sweden : reduction requirements for acidifying nitrogen and sulfur deposition. *Environmental Management*, 21(2), 291-304.
- POTTS W.T.W.**, 1954. The energetics of osmotic regulation in brackish- and fresh-water animals. *Journal of Experimental Biology*, 31, 618-630.
- POTTS W.T.W. et FRYER G.**, 1979. The effects of pH and salt content on sodium balance in *Daphnia magna* and *Acantholeberis curvirostris* (Crustacea ; Cladocera). *Journal of Comparative Physiology*, 129B, 289-294.
- PREEST M.R.**, 1993. Mechanisms of growth rate reduction in acid-exposed larval salamanders, *Ambystoma maculatum*. *Physiological Zoology*, 66(5), 686-707.
- PROBST A., MASSABUAU J.C., PROBST J.L. et FRITZ B.**, 1990. Acidification des eaux de surface sous l'influence des précipitations acides : rôle de la végétation et du substratum ; conséquences pour les populations de truite. Le cas des ruisseaux des Vosges. *Comptes Rendus de l'Académie des Sciences*, 311, 405-411.
- PROBST A., PROBST J.L., MASSABUAU J.C. et FRITZ B.**, 1995. Surface water acidification in the Vosges mountains : relation to bedrock and vegetation cover. In "Forest decline and atmospheric deposition effects in the french mountains". Eds. LANDMANN G. et BONNEAU M., Springer Verlag, Berlin, 371-386.
- PSENNER R.**, 1994. Environmental impacts on freshwaters : acidification as a global problem. *The Science of the Total Environment*, 143, 53-61.
- PUIG M.A.**, 1984. Distribution and ecology of the stoneflies (Plecoptera) in Catalonian rivers (NE-Spain). *Annales de Limnologie*, 20(1-2), 75-80.
- PYNNÖNEN K.**, 1991. Influence of aluminum and H<sup>+</sup> on the electrolyte homeostasis in the Unionidae *Anodonta anatina* and *Unio pictorum* L. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 20, 218-225.
- PYNNÖNEN K.**, 1994. Hemolymph gases, acid - base status, and electrolyte concentrations in the freshwater clams *Anodonta anatina* and *Unio tumidus* during exposure to and recovery from acidic conditions. *Physiological Zoology*, 67(6), 1544-1559.
- QUENTIN L.B. et MICHEL T.J.**, 1983. Sealed respirometers for small invertebrates. In "Polaeographic Oxygen Sensors. Aquatic and Physiological Application". Eds. GNAIGER E. et FORSTNER H., Springer-Verlag, 185-189.
- RADDUM G.G. et FJELLHEIM A.**, 1984. Acidification and early warning organisms in freshwater in western Norway. *Verhandlungen der Internationalen Vereinigung für Limnologie*, 22, 1973-1980.
- RADDUM G.G., FJELLHEIM A., et HESTHAGEN T.**, 1988. Monitoring of acidification by the use of aquatic organisms. *Verhandlungen der Internationalen Vereinigung für Limnologie*, 23, 2291-2297.
- RADDUM G.R. et FJELLHEIM A.**, 1995. Effects of liming and acid surface water on the mayfly *Leptophlebia vespertina* in lake Hovvatn. *Water, Air and Soil Pollution*, 85, 961-966.
- RADOJEVIC M., TYLER B.J., HALL S. et PENDERGHEST N.**, 1995. Air oxydation of S(IV) in cloud-water samples. *Water, Air and Soil Pollution*, 85, 1985-1990.

- RASCHER C.M., DRISCOLL C.T. et PETERS N.E.**, 1987. Concentration and flux of solutes from snow and forest floor during snowmelt in the West-Central Adirondack region of New-York. *Biogeochemistry*, 3, 209-224.
- RASK M., RAITANIEMI J., MANNIO J., VUORENMAA J. et NYBERG K.**, 1995. Losses and recovery of fish populations in acidified lakes of southern Finland in the last decade. *Water, Air and Soil Pollution*, 85, 315-320.
- RAVERA O.**, 1987. Ecological effects of acid depositions. In "Encyclopedia Environmental Control technology", Vol.3, Chapitre16, Wastewater Treatment Technology. Ed. CHEREMISINOFF P.N. Gulf Publishing, Hasbrook Heights, N.J., U.S.A., 447-486.
- ROCKWOOD J.P., JONES D.S. et COLER R.A.**, 1990. The effect of aluminum in soft water at low pH on oxygen consumption by the dragonfly *Libellula julia* Uhler. *Hydrobiologia*, 190, 55-59.
- ROCKWOOD J.P. et COLER R.A.**, 1991. The effects of aluminum in soft water at low pH on water balance and hemolymph ionic and acid-base regulation in the dragonfly *Libellula julia* Uhler. *Hydrobiologia*, 215, 243-250.
- RODIER J., BAZIN C., BROUTIN J.P., CHAMBOR P., CHAMPSAUR H. et RODIER L.**, 1996. L'analyse de l'eau. Eaux naturelles, eaux résiduaires, eau de mer. Chimie, physico-chimie, microbiologie, biologie, interprétation des résultats. Ed. DUNOD, 63-66.
- ROELOFS J.G.M., BRANDRUD T.E. et SMOLDERS A.J.P.**, 1994. Massive expansion of *Juncus bulbosus* L. after liming of acidified SW Norwegian lakes. *Aquatic Botany*, 48, 187-202.
- ROSCISZEWSKA E.**, 1991. Ultrastructural and histochemical studies of the egg capsules of *Perla marginata* (Panzer, 1799) and *Dinocras cephalotes* (Curtis, 1827) (Plecoptera : Perlidae). *International Journal of Insect Morphology and Embryology*, 20(4/5), 189-203.
- ROSSELAND B.O.**, 1980. Physiological response to acid water in fish. 2. Effects of acid water on metabolism and gill ventilation in brown trout, *Salmo trutta* L. and brook trout, *Salvelinus fontinalis*. *Proceedings of the International Conference on the Ecological Impact of Acid Precipitation*, SNSF project, 348-349.
- ROSSELAND B.O. et STAURNES M.**, 1994. Physiological mechanisms for toxic effects and resistance to acidic water : an ecophysiological and ecotoxicological approach. In "Acidification of freshwater ecosystems : implications for the future". Eds. STEINBERG C.E.W. et WRIGHT R.F., Chapter 16, 227-246.
- ROWE L., BERRILL M. et HOLLETT L.**, 1988. The influence of season and pH on mortality, molting and whole-body ion concentrations in nymphs of the mayfly *Stenomena femoratum*. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 90A(3), 405-408.
- ROWE L., BERRILL M., HOLLETT L. et HALL R.J.**, 1989. The effects of short-term laboratory pH depressions on molting, mortality and major ion concentrations in the mayflies *Stenomena femoratum* and *Leptophlebia cupida*. *Hydrobiologia*, 184, 89-97.
- RYAN P.F., HORNBERGER G.M., COSBY B.J., GALLOWAY J.N., WEBB J.R. et RASTETTER E.B.**, 1989. Changes in the chemical composition of stream water in two catchments in the Shenandoah national park, Virginia, in response to atmospheric deposition of sulfur. *Water Resources Research*, 25(10), 2091-2099.
- RYERSE J.S.**, 1979. Developmental changes in malpighian tubule cell structure. *Tissue and Cell*, 11(3), 533-551.
- SAINI R.S.**, 1977. Ultrastructural observations on the tracheal gills of *Aeshna* (Anisoptera ; Odonata) larvae. *Journal of Submicroscopic Cytology*, 9, 4, 347-354.
- SAKSGARD R. et HESTHAGEN T.**, 1995. Differences in response to liming in a lake-dwelling fish community. *Water, Air and Soil Pollution*, 85, 973-978.
- SANCHEZ-ORTEGA A. et ALBA-TERCEDOR J.**, 1991. The life cycle of *Perla marginata* and *Dinocras cephalotes* in Sierra Nevada (Granada, Spain) (Plecoptera : Perlidae). In "Overview and strategies of Ephemeroptera and Plecoptera". Eds. ALBA-TERCEDOR J et SANCHEZ-ORTEGA A., Sandhill Crane Press, Gainesville, 493-501.
- SAYER M.D.J., READER J.P. et DALZIEL T.R.K.**, 1993. Freshwater acidification : effects on the early life stages of fish. *Reviews in Fish Biology and Fisheries*, 3, 95-132.

- SCHINDLER D.W., 1987. Recovery of canadian lakes from acidification. In "Reversibility of acidification". Ed. BARTH H., Elsevier Applied Science, 2-13.
- SCHINDLER D.W., FROST T.M., MILLS K.H., CHANG P.S.S., DAVIES I.J., FINDLAY L., MALLEY D.F., SHEARER J.A., TURNER M.A., GARRISON P.J., WATRAS C.J.K., GUNN J.M., BREZONIK P.L. et SWENSON W.A., 1991. Comparisons between experimentally - and atmospherically- acidified lakes during stress and recovery. *Proceedings of the Royal Society of Edinburgh*, 97B, 193-226.
- SCHINDLER D.W., 1997. Liming to restore acidified lakes and streams : a typical approach to restoring damages ecosystems ? *Restoration Ecology*, 5(1), 1-6.
- SCHOFFENIELS E., 1960. Rôle des acides aminés dans la régulation de la pression osmotique du milieu intérieur des insectes aquatiques. *Archives Internationales de Physiologie et de biochimie*, 68(3), 507-508.
- SCHMITZ M. et WICHARD W., 1975. Ionenabsorption an chloridepithelien von Köcherfliegenlarven (Trichoptera). *Entomologica Germanica*, 2(1), 30-34.
- SCHWANTES P.A. et SEIBOLD G., 1989. Ion adsorption by specialized epithelial regions in *Musca domestica* larvae. *Journal of Insect Physiology*, 35(11), 847-854.
- SEIP H.M., DIANWU Z., JILING X., DAWEI Z., LARSEN T., BOHAN L. et VOGT R.D., 1995. Acidic deposition and its effects in southern China. *Water, Air and Soil Pollution*, 85, 2301-2306.
- SHAW J., 1960. The absorption of sodium ions by the crayfish *Astacus pallipes* Lereboullet III. The effect of other cations in the external solution. *Journal of Experimental Biology*, 37, 548-556.
- SHAW J. et STOBART R.H., 1963. Osmotic and ionic regulation in insects. In "Advances in insect physiology". Eds. BEAMENT J.W.L., TREHERNE J.E. et WIGGLESWORTH V.B., Volume 1, 315-399.
- SIEGFRIED C.A., BLOOMFIELD J.A. et SUTHERLAND J.W., 1989. Planktonic rotifer community structure in Adirondack, New York, U.S.A. lakes in relation to acidity, trophic status and related water quality characteristics. *Hydrobiologia*, 175, 33-48.
- SIGG L., STUMM W. et BEHRA P., 1992. Chimie des milieux aquatiques : chimie des eaux naturelles et des interfaces dans l'environnement. Ed. MASSON, Paris, 391 pages.
- SIVIC I., STARK B.P. et UCHIDA S., 1988. Synopsis of the world genera of Perlinae (Plecoptera: Perlidae). *Scopelia*, 16, 1-66.
- SOHAL R.S., PETERS P.D. et HALL T.A., 1976. Fine structure and X-ray microanalysis of mineralized concretions in the malpighian tubules of the housefly, *Musca domestica*. *Tissue and Cell*, 8(3), 447-458.
- SOHAL R.S., PETERS P.D. et HALL T.A., 1977. Origin, structure, composition and age-dependence of mineralized dense bodies (concretions) in the midgut epithelium of the adult housefly, *Musca domestica*. *Tissue and Cell*, 9(1), 87-102.
- SOULSBY C., 1993. Extreme hydrochemical events: episodic acidification in upland catchments. *BHS 4th National Hydrology Symposium*, Cardiff, 7-13.
- SOULSBY C., 1995. Contrasts in storm event hydrochemistry in an acidic afforested catchment in upland Wales. *Journal of Hydrology*, 170, 159-179.
- SOULSBY C., TURNBULL D., LANGAN S.J., OWEN R. et HIRST D., 1995. Long-term trends in stream chemistry and biology in North-East Scotland: evidence for recovery. *Water, Air and Soil Pollution*, 85, 689-694.
- STOBART R.H. et SHAW J., 1974. Salt and water balance excretion. In "The physiology of insects", Vol.5, Ed. ROCKSTEIN M., Academic Press, New-York, 361-446.
- STODDARD J.L. et MURDOCH P.S., 1990. Catskill mountains. In "Acid deposition and aquatic ecosystems: regional case studies". Ed. CHARLES D.F., Springer-Verlag, New-York, 237-271.
- STODDARD J.L., 1995. Episodic acidification during snowmelt of high elevation lakes in the Sierra Nevada mountains of California. *Water, Air and Soil Pollution*, 85, 353-358.
- STOKES P.M., 1986. Ecological effects of acidification on primary producers in aquatic systems. *Water, Air and Soil Pollution*, 30, 421-438.

- STUMM W., SIGG L. et SCHNOOR J.L.**, 1987. Aquatic chemistry of acid deposition. *Environmental Science and Technology*, 21(1), 8-13.
- SULLIVAN T.J., EILERS J.M., COSBY B.J. et VACHE K.B.**, 1997. Increasing rôle of nitrogen in the acidification of surface waters in the Adirondack mountains, New-York. *Water, Air and Soil Pollution*, 95, 313-336.
- SUTCLIFFE D.W.**, 1962. The composition of haemolymph in aquatic insects. *Journal of Experimental Biology*, 39, 325-343.
- SUTCLIFFE D.W.**, 1963. The chemical composition of haemolymph in insects and some other arthropods, in relation to their phylogeny. *Comparative of Biochemistry and Physiology*, 9, 121-135.
- SUTCLIFFE D.W. et CARRICK T.R.**, 1973. Studies on mountains streams in the english lake district. I. PH, calcium and the distribution of the river Duddon. *Freshwater Biology*, 3, 437-462.
- SUTCLIFFE D.W. et HILDREW A.G.**, 1989. Invertebrate communities in acid streams. In "Acid toxicity and aquatic animals". Eds. MORRIS R., TAYLOR E.W., BROWN D.J.A. et BROWN J.A., 13-29.
- SVENSON T., DICKSON W., HELLBERG J., MOBERG G. et MUNTHE N.**, 1995. The swedish liming programme. *Water, Air and Soil Pollution*, 85, 1003-1008.
- THIES H.**, 1994. Chemical properties of an acidified humic headwater lake with respect to reducing acidic depositions and expected climate change. *Hydrobiologia*, 274, 143-154.
- TRANter M., BRIMBLECOMBE P., DAVIES T.D., VINCENT C.E., ABRAHAMS P.W. et BLACKWOOD I.**, 1986. The composition of snowfall, snowpack and meltwater in the scottish highlands - evidence for preferential elution. *Atmospheric Environment*, 20(3) : 517-525.
- TRANter M., DAVIES T.D., WIGINGTON P.J. et ESHLEMAN K.N.**, 1994. Episodic acidification of freshwater systems in Canada - physical and geochemical processes. *Water, Air and Soil Pollution*, 72, 19-39.
- TURNER M.A., ROBINSON G.G.C., TOWNSEND B.E., HANN B.J. et AMARAL J.A.**, 1995. Ecological effects of blooms of filamentous green algae in the littoral zone of an acid lake. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 52, 2264-2275.
- TURQUIER Y.**, 1994. L'organisme en équilibre dans son milieu. In "L'organisme dans son milieu", Précis de zoologie fonctionnelle. Ed. DOIN, Paris, Tome II, 334 pages.
- TWITCHEN I.D.**, 1987. The physiological basis of acid resistance in aquatic insect larvae. *Surface Water Acidification Programme*, Bergen (Norway).
- TWITCHEN I.D.**, 1990. The physiological bases of resistance to low pH among aquatic insect larvae. In "The surface waters acidification programme". Ed. MASON J., Cambridge University Press, 413-419.
- ULFSTRAND S.**, 1968. Life cycles of benthic insects in Lapland streams (Ephemeroptera, Plecoptera, Trichoptera, Diptera Simuliidae). *Oikos*, 19, 167-190.
- VANDERMEULEN H., JACKSON M.B., RODRIGUES A. et KELLER B.**, 1993. Filamentous algal communities in Sudbury area lakes : effects of variable lake acidity. *Cryptogamic Botany*, 3, 123-132.
- VANGENECHTEN J.H.D., VAN PUYMBROECK S. et VANDERBORGHT O.L.J.**, 1979. Effect of pH on the uptake of sodium in the waterbugs *Corixa dentipes* and *Corixa punctata* (Hemiptera ; Heteroptera). *Comparative of Biochemistry and Physiology*, 64, 509-521.
- VANGENECHTEN J. et VANDERBORGHT O.**, 1980. Effect of acid pH on sodium and chloride balance in an inhabitant of acid freshwaters : the waterbug *Corixa punctata* (Insecta ; Hemiptera). *Proceedings of the Ecological Impact of Acid Precipitation*, Norway, SNSF - project, 342-343.
- VANGENECHTEN J.H.D., WITTERS H., VAN PUYMBROECK S., VANDERBORGHT O.L.J. et CAMERON J.N.**, 1987. The acid - base and electrolyte balance during acid stress in two species of acid tolerant catfish : *Ictalurus nebulosus* and *I. punctatus*. *Annales de la Société Royale Zoologique de Belgique*, 117, suppl.1 : Ecophysiology of acid stress in aquatic organisms (Eds. WITTERS H. and VANDERBORGHT O.), 265-284.

- VANGENECHTEN J.H.D., WITTERS H. et VANDERBORGH T O.L.J.**, 1989. Laboratory studies on invertebrate survival and physiology in acid waters. In "Acid toxicity and aquatic animals". Eds. MORRIS R., TAYLOR E.W., BROWN D.J.A. et BROWN J.A., Cambridge University Press.
- VERNEAUX J.**, 1973. Cours d'eau de Franche-Comté (massif du Jura). Recherches écologiques sur le réseau hydrographique du Doubs : essai de biotopologie. Thèse d'état en Sciences Naturelles, Université de Besançon, 257 pages.
- VEZELY J.**, 1994. Effects of acidification on trace metal transport in fresh waters. In "Acidification of freshwater ecosystems : implications for future". Eds. STEINBERG C.E.W. et WRIGHT R.F., Chapitre X, 404 pages.
- WARD J.V.**, 1992. Aquatic insect ecology. 1. Biology and habitat. Eds. WILLEY and Sons. 438 pages.
- WARING C.P. et BROWN J.A.**, 1995. Ionoregulatory and respiratory responses of brown trout, *Salmo trutta*, exposed to lethal and sublethal aluminium acidic soft waters. *Fish Physiology and Biochemistry*, 14(1), 81-91.
- WEATHERLEY N.S.**, 1988. Liming to mitigate acidification in freshwater ecosystems: a review of the biological consequences. *Water, Air and Soil Pollution*, 39, 421-437.
- WEATHERLEY N.S., THOMAS S.P. et ORMEROD S.J.**, 1989. Chemical and biological effects of acid, aluminium and lime additions to a welsh hill-stream. *Environmental Pollution*, 56, 283-297.
- WICHARD W. et KOMNICK H.**, 1971. Electron microscopical and histochemical evidence of chloride cells in tracheal gill of mayfly larvae. *Cytobiologie*, 3, 215-228.
- WICHARD W., TSUI P.T.P. et KOMNICK H.**, 1973. Effect of different salinities on the coniform chloride cells of mayfly larvae. *Journal of Insect Physiology*, 19, 1825-1835.
- WICHARD W. et KOMNICK H.**, 1973. Feinstruktureller und histochemischer Nachweis von Chloridzellen bei Steinfliegenlarven. 1. Die coniformen Chloridzellen. *Cytobiologie*, 7, 297 - 314.
- WICHARD W. et KOMNICK H.**, 1974. Structure and function of the respiratory epithelium in the tracheal gills of stonefly larvae. *Journal of Insect Physiology*, 20, 2397-2406.
- WIGGLESWORTH V.B.**, 1953. Surface forces in the tracheal system of insects. *Quarterly Journal of Microscopical Science*, 94(4), 507 - 522.
- WIGGLESWORTH V.B.**, 1959. Physiologie des insectes. Ed. DUNOD, Paris, 139 pages.
- WIGGLESWORTH V.B.**, 1965. The principles of insect physiology. Ed. METHUEN, London, 6<sup>ème</sup> édition, 741 pages.
- WILLIAMS D.D. et FELMATE B.W.**, 1992. Aquatic insects. Wallingford : Edition CAB International. 358 pages.
- WOOD C.M. et McDONALD D.G.**, 1982. Physiological mechanisms of acid toxicity to fish. In "Acid rain / Fisheries". Ed. JOHNSON R.E., 197-226.
- WOOD C.M. et ROGANO M.S.**, 1986. Physiological responses to acid stress in crayfish (*Oronectes*) : haemolymph ions, acid-base status, and exchanges with the environment. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 43, 1017-1026.
- WOOD C.M., PLAYLE R.L., SIMONS B.P., GOSS G.G. et MCDONALD D.G.**, 1988. Blood gases, acid base status, ions and haematology in adult brook trout (*Salvelinus fontinalis*) under acid / aluminum exposure. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 45, 1575-1586.
- WOOD C.M., McDONALD D.G., INGERSOLL C.G., MOUNT C.R., JOHANSSON O.E., LANDSBERGER S. et BERGMAN H.L.**, 1990a. Effects of water acidity, calcium and aluminum on whole body ion of brook trout (*Salvelinus fontinalis*) continuously exposed from fertilization to swim up : a study by instrumental neutron activity analysis. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 47(8) : 1593-1603.

- WOOD C.M., McDONALD D.G., INGERSOLL C.G., MOUNT C.R., JOHANNSSON O.E., LANDSBERGER S. et BERGMAN H.L., 1990b.** Whole body ions of brook trout (*Salvelinus fontinalis*) alevins : responses of yolk-sac and swim-up stages to water acidity, calcium, and aluminium, and recovery effects. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 47(8) : 1604-1615.
- WOJTAN K. et GALAS J., 1994.** Acidification of small mountains lakes in the high Tatra mountains, Poland. *Hydrobiologia*, 274 : 179-182.
- WYATT G.R., 1961.** The biochemistry of insect hemolymph. *Annual Review of Entomology*, 6, 75-102.
- YOUSON J.H. et NEVILLE C.M., 1987.** Deposition of aluminum in the gill epithelium of rainbow trout (*Salmo gairdneri* Richardson) subjected to sublethal concentrations of the metal. *Canadian Journal of Zoology*, 65, 647-656.
- ZENG Y. et HOPKE P.K., 1994.** Comparison of the source locations and seasonal patterns for acidic species in precipitation and ambient particles in southern Ontario, Canada. *The Science of the Total Environment*, 143, 245-260.
- ZWICK P., 1996a.** Variable egg development of *Dinocras spp.* (Plecoptera, Perlidae) and the stonefly seed bank theory. *Freshwater Biology*, 35, 81-100.
- ZWICK P., 1996b.** Capacity of discontinuous egg development and its importance for the geographic distribution of the warm water stenotherm, *Dinocras cephalotes* (Insecta: Plecoptera: Perlidae). *Annales de Limnologie*, 32(3), 147-160.



## ANNEXE A

### CHAPITRE III

Tableau A-I : Concentrations (mmoles.l<sup>-1</sup>) en chlorures et en sodium mesurées dans l'hémolymphe des larves exposées à une eau non acidifiée (Plaine) et acidifiée (Rouge Rupt) pendant 11 jours (moyenne ± écart-type ; n = nombre d'individus).

	Concentrations en chlorures (mmoles.l <sup>-1</sup> )		Concentrations en sodium (mmoles.l <sup>-1</sup> )	
	Plaine	Rouge-Rupt	Plaine	Rouge-Rupt
J0	82.1 ± 8.2 n = 5		114.0 ± 19.0 n = 5	
J4	83.8 ± 5.1 n = 5	50.3 ± 15.3 n = 5	113.3 ± 7.9 n = 5	70.8 ± 24.7
J8	84.7 ± 8.9 n = 5	38.1 ± 6.6 n = 3	108.2 ± 9.2 n = 5	71.8 ± 12.2 n = 3
J11	81.4 ± 12.1 n = 5	*	116.4 ± 11.0 n = 5	*

\* : aucune mesure n'est réalisée dans ce lot en raison de la forte mortalité survenue pendant l'expérience.

## ANNEXE B

### CHAPITRE IV

Tableau B-I : Moyennes et écart-types des concentrations en sodium, potassium, calcium et magnésium (mmoles.l<sup>-1</sup>) mesurées dans l'hémolymphe des larves de *Dinocras cephalotes* avant (lot témoin : T) et après exposition de 8 jours à un milieu contrôlé (lot C) et acidifié (lot A).

	Lot	Moyenne	Ecart-type	Nombre de larves
Sodium	T	97.1	12.9	7
	C	117.3	21.8	7
	A	44.1	15.5	7
Potassium	T	11.1	6.0	7
	C	12.6	4.7	7
	A	19.5	6.3	7
Calcium	T	8.7	6.3	7
	C	9.7	8.7	7
	A	25.8	24.7	7
Magnésium	T	7.1	4.0	7
	C	7.4	4.5	7
	A	16.5	8.8	7

Tableau B-II : Moyennes et écart-types des concentrations en cations (mmoles.g<sup>-1</sup> poids frais) mesurées dans l'organisme des larves de *Dinocras cephalotes* à J0 (lot témoin ; T) et après exposition à un milieu contrôle (lot C) et acidifié (lot A) pendant 8 jours.

	Lot	Moyenne	Ecart-type	Nombre de larves
Sodium	T	0.0425	0.0046	11
	C	0.0468	0.0051	11
	A	0.0203	0.0057	8
Potassium	T	0.0583	0.0071	11
	C	0.0502	0.0047	11
	A	0.0467	0.0047	8
Calcium	T	0.0114	0.0111	11
	C	0.0215	0.0105	11
	A	0.0212	0.0086	8
Magnésium	T	0.0200	0.0106	11
	C	0.0265	0.0076	11
	A	0.0231	0.0051	8

Tableau B - III : Moyennes et écart-types des concentrations en cations (mmoles.g<sup>-1</sup> poids sec) mesurées dans l'organisme des larves de *Dinocras cephalotes* à J0 (lot témoin : T) et après exposition à un milieu contrôle (lot C) et acidifié (lot A) pendant 8 jours.

	Lot	Moyenne	Ecart-type	Nombre de larves
Sodium	T	0.2020	0.0341	11
	C	0.2132	0.0441	11
	A	0.0919	0.0277	8
Potassium	T	0.2819	0.0694	11
	C	0.2260	0.0283	11
	A	0.2123	0.0309	8
Calcium	T	0.0464	0.0413	11
	C	0.0945	0.0452	11
	A	0.0917	0.0304	8
Magnésium	T	0.0872	0.0324	11
	C	0.1180	0.0317	11
	A	0.1025	0.0142	8

## ANNEXE C

### CHAPITRE V

Tableau C-I : Concentrations moyennes en chlorures et en sodium mesurées à J0, J7, J14 et J21 dans l'hémolymphe des larves exposées à huit milieux différents. (moyenne  $\pm$  écart - type ; n = nombre d'individus).

Milieu d'exposition	Jour du prélèvement	Nombre d'individus	Concentrations en chlorures (mmoles.l <sup>-1</sup> )	Concentrations en sodium (mmoles.l <sup>-1</sup> )
	J0	n = 6	99.5 $\pm$ 7.8	99.8 $\pm$ 5.0
6.6M	J7	n = 6	102.7 $\pm$ 10.1	99.2 $\pm$ 14.5
6.6M	J14	n = 6	96.4 $\pm$ 6.5	100.3 $\pm$ 10.1
6.6M	J21	n = 6	97.5 $\pm$ 11.7	95.5 $\pm$ 6.4
6.6MAI	J7	n = 6	112.0 $\pm$ 7.7	113.0 $\pm$ 10.0
6.6MAI	J14	n = 6	85.4 $\pm$ 13.7	88.4 $\pm$ 16.0
6.6MAI	J21	n = 6	79.6 $\pm$ 24.4	85.7 $\pm$ 22.5
6.6PM	J7	n = 6	81.5 $\pm$ 19.5	84.7 $\pm$ 20.1
6.6PM	J14	n = 6	80.7 $\pm$ 8.3	92.7 $\pm$ 5.3
6.6PM	J21	n = 5	88.6 $\pm$ 10.7	92.2 $\pm$ 11.7
6.6PMAI	J7	n = 6	59.1 $\pm$ 17.7	60.0 $\pm$ 13.6
6.6PMAI	J14	n = 6	57.4 $\pm$ 7.3	67.5 $\pm$ 19.0
6.6PMAI	J21	n = 0 // 2*		
4.6M	J7	n = 6	62.6 $\pm$ 14.6	65.8 $\pm$ 16.6
4.6M	J14	n = 6	61.8 $\pm$ 28.0	73.8 $\pm$ 17.7
4.6M	J21	n = 6	49.1 $\pm$ 30.0	49.8 $\pm$ 31.3
4.6MAI	J7	n = 6	62.5 $\pm$ 33.6	57.3 $\pm$ 31.0
4.6MAI	J14	n = 6	51.5 $\pm$ 14.3	61.5 $\pm$ 18.4
4.6MAI	J21	n = 2	23.2 $\pm$ 17.4	38.6 $\pm$ 34.7
4.6PM	J7	n = 6	41.0 $\pm$ 15.3	28.7 $\pm$ 13.6
4.6PM	J14	n = 5	22.2 $\pm$ 12.8	21.7 $\pm$ 12.5
4.6PM	J21	n = 0		
4.6PMAI	J7	n = 6	39.5 $\pm$ 14.1	28.2 $\pm$ 13.5
4.6PMAI	J14	n = 2 // 1*	25.7 $\pm$ 2.4	14.1 $\pm$ 7.6
4.6PMAI	J21	n = 0		

☐ : Aucune mesure n'est réalisée dans ce lot en raison de la forte mortalité survenue pendant l'expérience

// n\* : nombre de larves dont le prélèvement d'hémolymphe était impossible.

## ANNEXE D

### CHAPITRE VI

Tableau D-I : Résultats des concentrations en chlorures et en sodium dans l'hémolymphe des larves du lot témoin (J0) et des lots exposés au milieu 4.6PMAI (J8) et 6.6M (J16, J24, J32) (moyenne  $\pm$  écartype).

Jour de prélèvement	Nombre d'individus	Concentrations en chlorures mmoles.l <sup>-1</sup>	Concentrations en sodium mmoles.l <sup>-1</sup>
J0	n = 5	94.3 $\pm$ 11.2	114.9 $\pm$ 12.9
J8	n = 7	19.7 $\pm$ 15.4	29.7 $\pm$ 15.4
J16	n = 7	80.1 $\pm$ 14.9	92.9 $\pm$ 12.5
J24	n = 7	94.6 $\pm$ 11.6	97.7 $\pm$ 6.2
J32	n = 7	80.1 $\pm$ 10.1	116.8 $\pm$ 14.8

Tableau D-II : Résultats des concentrations en chlorures et en sodium dans l'hémolymphe des larves du lot témoin (J0) et des lots exposés aux 10 milieux différents pendant huit jours (moyenne  $\pm$  écartype).

	Milieu	Nombre de larves	Concentrations en chlorures mmoles.l <sup>-1</sup>	Concentrations en sodium mmoles.l <sup>-1</sup>
J0		n = 6	103.8 $\pm$ 10.0	104.4 $\pm$ 10.9
J8	6.6M	n = 7	109.6 $\pm$ 14.1	114.0 $\pm$ 15.5
	4.6PMAI	n = 4	68.5 $\pm$ 10.7	74.2 $\pm$ 7.6
	CaCl	n = 8	71.5 $\pm$ 21.6	73.8 $\pm$ 20.7
	CaSO <sub>4</sub>	n = 8	66.6 $\pm$ 24.1	76.2 $\pm$ 16.3
	NaCl	n = 5	90.4 $\pm$ 21.1	96.1 $\pm$ 19.4
	Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	n = 6	94.4 $\pm$ 13.8	101.5 $\pm$ 10.0
	KCl	n = 5	63.7 $\pm$ 32.4	70.6 $\pm$ 25.0
	K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	n = 6	53.4 $\pm$ 26.5	63.0 $\pm$ 21.7
	MgCl <sub>2</sub>	n = 5	60.7 $\pm$ 42.1	65.6 $\pm$ 30.8
	MgSO <sub>4</sub>	n = 6	52.8 $\pm$ 25.6	59.4 $\pm$ 17.2

Tableau D-III : Résultats des concentrations en chlorures et en sodium dans l'hémolymphe des larves exposés aux différents milieux pendant les 16 jours d'expérience (moyenne  $\pm$  écartype).

	Milieu	Nombre de larves	Concentrations en chlorures mmoles.l <sup>-1</sup>	Concentrations en sodium mmoles.l <sup>-1</sup>
J0		n = 6	101.3 $\pm$ 8.7	106.6 $\pm$ 14.0
J8	6.6M	n = 6	100.3 $\pm$ 9.8	105.8 $\pm$ 8.3
	4.6PMAI	n = 6	52.9 $\pm$ 17.7	50.1 $\pm$ 17.6
	Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	n = 6	104.6 $\pm$ 14.4	110.1 $\pm$ 17.3
	CaCO <sub>3</sub>	n = 5	93.9 $\pm$ 9.5	92.7 $\pm$ 9.6
J16	6.6M	n = 5	103.4 $\pm$ 6.0	105.8 $\pm$ 8.8
	Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	n = 6	104.2 $\pm$ 11.5	109.3 $\pm$ 15.4
	CaCO <sub>3</sub>	n = 6	90.2 $\pm$ 7.3	89.3 $\pm$ 9.7
	Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> *	n = 7	68.2 $\pm$ 25.2	73.8 $\pm$ 25.1
	CaCO <sub>3</sub> *	n = 6	59.5 $\pm$ 15.2	63.5 $\pm$ 22.0

\* lots des larves préalablement stressées pendant 8 jours dans le milieu acidifié, et transférées dans le milieu Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> ou CaCO<sub>3</sub> depuis 8 jours.

# EFFECTS OF FRESHWATER ACIDIFICATION ON THE IONIC REGULATION OF *DINOCRAS CEPHALOTES* (PLECOPTERA; PERLIDAE)

CORINNE FAVREL

Equipe d'Ecotoxicologie, Centre de Recherches Ecologiques, Université de Metz  
B.P. 4116, 57040 Metz Cedex 01 - France

Larvae of the acid-sensitive plecopteran species *Dinocras cephalotes* were exposed to eight treatments for 21 days using a combination of three environmentally relevant parameters in water acidification: low pH, poor mineralisation and elevated aluminium concentration. Mortality and hemolymph Cl<sup>-</sup> and Na<sup>+</sup> concentrations were determined to assess the effects of each treatment. Low pH substantially disturbed the osmoregulatory system leading to a decrease in hemolymph ion concentrations. High mortality was observed in larvae exposed to poorly mineralised water. Aluminium caused a slight decrease in hemolymph Cl<sup>-</sup> and Na<sup>+</sup> concentrations. Each factor induced a specific response, although all three seemed to be inter-dependant. Maximum toxicity was observed in the treatment with the three combined parameters.

## INTRODUCTION

Acid precipitation is a widespread ecological problem adversely affecting both terrestrial and aquatic ecosystems. The principal cause of acid deposition is the combustion of fossil fuel which releases sulphur dioxide and nitrogen oxides into the atmosphere (ODEN, 1976). These products are transported for long distances and transformed into sulphuric and nitric acids which return to terrestrial and aquatic ecosystems either directly in gaseous or particulate form (dry deposition), or after incorporation in clouds or raindrops (wet deposition) (STUMM *et al.*, 1987). Such phenomena affect the aquatic ecosystem directly through deposition on lake and stream surfaces, and indirectly, through the mobilisation of metals and other materials from the terrestrial to the aquatic environment (WRIGHT & GJESSING, 1976). Therefore, soil and bedrock of the watershed play an important role in determining the sensitivity of an aquatic ecosystem to acid precipitation as well as its chemical composition (WRIGHT & GJESSING, 1976). It is a result of this process that acidified water is mainly characterised by an acid pH, a poor mineralisation and an elevated aluminium concentration.

The acidification of surface waters has been found to affect all aquatic trophic levels. Field studies on phytoplankton (STOKES, 1986), zooplankton (BRETT, 1989), macroinvertebrates (RADDUM & FJELLHEIM, 1984), fish (RASK *et al.*, 1995) and amphibians (DUNSON *et al.*, 1992) showed a decrease of species richness in all of these communities.

The physiological perturbations of aquatic organisms caused by acid stress have mainly been studied on teleost fish, especially salmonids (WOOD, 1989) and on decapoda crustaceans (McMAHON & STUART, 1989). These studies showed that low pH disturbed the acid-base homeostasis and the osmoregulatory system, leading to a decrease in blood Cl<sup>-</sup> and Na<sup>+</sup> concentrations. The mechanisms affected and the relative degree of disruptions depend on the interaction between the pH of the water and the environmental chemistry such aluminium and calcium concentrations (PLAYLE *et al.*, 1989).

Aquatic macroinvertebrates are affected by acid stress inducing a decrease in their diversity and in their abundance correlated with increasing acidity of the water (SUTCLIFFE & HILDREW, 1989). Such decreases have been previously observed in the Vosges mountains (GUEROLD, 1992), the main area subjected to atmospheric acid deposition in France (PIHAN, 1987). Preliminary investigations on the effect of acidified water on the physiology of insects revealed a decrease in the whole-body Cl<sup>-</sup> and Na<sup>+</sup> concentrations (ROWE *et al.*, 1989) and some failures in the respiratory system (ROCKWOOD *et al.*, 1990).

The aim of this study was to determine the effects of environmentally relevant low pH, low mineralisation and elevated aluminium concentrations, either alone or combined, on larvae of an acid-sensitive Plecoptera, *Dinocras cephalotes* CURTIS. The hemolymph Cl<sup>-</sup> and Na<sup>+</sup> concentrations and mortality were used as test criteria.

# THESE DE DOCTORAT DE L'UNIVERSITE DE METZ

---

Auteur : Corinne FAVREL

Année : 1998

---

Écophysiologie de la larve de *Dinocras cephalotes* (Plécoptère, Perlidé) exposée à un milieu acidifié (pH acide, faible minéralisation et forte concentration en aluminium).

---

## Résumé

L'objectif de ce travail est d'étudier l'écophysiologie d'un insecte exposé à un environnement perturbé. Après une étude de terrain, l'organisme choisi est *Dinocras cephalotes* (Plécoptère ; Perlidé) et la perturbation étudiée l'acidification des cours d'eau, avec comme représentation *in situ*, le cas du massif vosgien.

Du point de vue écophysiologique, la question-clé est d'identifier les perturbations biochimiques et physiologiques qui contribuent à la disparition de cette espèce des cours d'eau acidifiés tout en déterminant les facteurs physico-chimiques du milieu qui sont à l'origine de ces perturbations. En complément, une partie de ce travail est réalisée dans une perspective curative visant à réduire la mortalité de *Dinocras cephalotes*. Pour cela, les larves sont exposées en laboratoire à des milieux constitués par les différentes combinaisons obtenues avec les principaux facteurs caractéristiques des cours d'eau acidifiés : pH, minéralisation et concentration en aluminium.

Un enchaînement de dérèglements physiologiques et de modifications histologiques initié par une perte de sodium de l'organisme vers le milieu extérieur conduit à la mort de la larve. Toutefois, tant qu'un certain seuil de perte n'est pas atteint, les mécanismes ne sont pas perturbés de façon irréversible ; au delà, la mort est inévitable. Les perturbations observées sont provoquées par le pH, et surtout la minéralisation du milieu. Une forte concentration en protons perturbe la régulation ionique tandis qu'une faible minéralisation entraîne une mortalité élevée. Tous les cations constituant la minéralisation du milieu n'ont pas la même influence ; certains ayant un effet plus bénéfiques pour la survie des larves.

---

**Mots clés :** *Dinocras cephalotes*, écophysiologie, milieu acidifié, pH, minéralisation, aluminium, osmorégulation, histopathologie.