ParisTech
INSTITUT DES SCIENCES ET TECHNOLOGIES
PARIS INSTITUTE OF TECHNOLOGY

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

irstea

GRN

ONEMA
Office national de l'eau
et des milieux aquatiques

Doctorat ParisTech

Ecole Doctorale : Géosciences, Ressources Naturelles et Environnement (GRN)

T H È S E

pour obtenir le grade de docteur délivré par

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

(AgroParisTech)

Spécialité : Ecotoxicologie et Chimie de l'eau

présentée et soutenue publiquement par

Violaine Emourgeon

5 mars 2014

Estimation de la biodisponibilité des métaux particulaires : approches en laboratoire et *in situ* avec *Dreissena*

Directrices de thèse : **Marie-Hélène TUSSEAU-VUILLEMIN et Catherine GOURLAY-FRANCE**
Co-encadrante : **Sophie AYRAULT**

Jury

Mme Carole COSSU-LEGUILLE, Maître de Conférences-HDR, LIEBE, Université de Metz	Rapporteur
M Gilles VARRAULT, Maître de Conférences, LEESU, Université Paris-Est Créteil (UPEC)	Rapporteur
Mme Valérie CAMEL, Maître de conférences, AgroParisTech	**Président du Jury/**Examinateur
M Didier PONT, Directeur de recherche, IRSTEA	Examinateur
Mme Marie-Hélène TUSSEAU-VUILLEMIN, Directrice Scientifique, IFREMER	Directrice
Mme Catherine GOURLAY-FRANCE, Chargé d'équipes, l'ANSES	Co-directrice
Mme Sophie AYRAULT, Ingénieur-Chercheur, LSCE, CEA	Co-encadrante

AgroParisTech
Equipe : BELCA Unité : Hydrosystèmes et Bioprocédés (HBAN)
IRSTEA, Antony

Estimation de la biodisponibilité des métaux particulaires : approches en laboratoire et *in situ* avec *Dreissena Polymorpha*, moule d'eau douce

Estimation of bioavailability of particulate metals: laboratory and *in situ* approaches with *Dreissena Polymorpha*, freshwater mussel

Mémoire de doctorat

Violaine Emourgeon

Remerciements

Je voudrais tout d'abord remercier Marie-Hélène Tusseau-Vuillemin et Catherine Gourlay-Francé mes directrices de thèse de m'avoir choisie pour ce sujet. Je les remercie également pour leurs encouragements et leur soutien sans faille aussi bien professionnel que personnel, notamment durant toute la dernière année de thèse, et ce malgré leur très grosse charge de travail.
Je voudrais également remercier Sophie Ayrault, mon encadrante au LSCE, sans qui cette thèse n'aurait pas vu le jour. Sophie, merci du fond du cœur je te décerne le rôle de « Maman de thèse ». Tu as su être là quand j'en avais le plus besoin. Merci pour ta patience et pour ta sensibilité, tu as su m'écouter et me donner le courage de persévérer.

Je remercie les rapporteurs Carole Cossu-Leguille et Gilles Varrault et les examinateurs Didier Pont et Valérie Camel d'avoir bien voulu faire partie de mon jury. Je remercie tout spécialement Claude Vasseur et Alain Geffard d'avoir également pris le temps de relire mon manuscrit.
Je voudrais aussi remercier les différents chefs d'unité d'HBAN de m'avoir accueillie pour réaliser cette thèse Cécile Loumagne puis Didier Pont.
Je remercie aussi Nathalie du fond du cœur pour sa relecture appliquée de ma thèse et…tellement plus encore, et Elizabeth pour sa gentillesse et son efficacité.

Je remercie bien sur mon équipe, les Belcates et les Belcatons : Lise pour ses sages conseils, Jérémie pour ses « Salut ça va ?! » quotidiens durant 3 ans et surtout pour son soutien qui m'a touchée, Emma pour son expérience en chimie analytique et pour ses discussions lors des pauses thé et Aurélie pour son soutien technique. Je n'oublie pas Marine pour sa gentillesse et bien plus encore. Je souhaite plein de bonheur à la famille Dufour qui s'est agrandit en cette année 2014.
Je remercie aussi mes collègues et amis de Belca qui sont partis trop tôt vers d'autres horizons comme Amélie, Françoise, Messika et Matthieu. Mess je te souhaite plein de courage pour ta thèse canadienne et Matthieu je te souhaite plein de réussite dans ta nouvelle aventure. Je remercie également Irène nouvellement arrivée et Juliette.
Enfin, merci à mes thésardes Belcates préférées Armelle et Nastassia, courage pour la fin de vos thèses. Ma petite Nass : merci pour tout !!

Je remercie aussi les hydrologues, cette grande famille accueillante guidée par le discret mais exceptionnel Charles et le charismatique Vazken, à qui je décerne le rôle de « Papa de thèse ». Merci également à Maria-Hélèna pour sa gentillesse et pour avoir choisi Louise comme thésarde.
Merci à Florent et François, mes acolytes de thèse, de m'avoir fait découvrir les joies du frisbee et des soirées chez Mamane, merci également à Pierre (Nicole) mais aussi aux anciens : mon petit Damien et à Pierre-Yves.
Merci aux nouvelles recrues hydrologues, qui ont agrandit la joyeuse bande, d'avoir ensoleillé mon printemps et mon automne 2013 : Carina, ne change pas tu es super, Julie…non tu ne t'appelles pas Gertrude : résiste, Laurent merci pour les pauses thé et Pierre (Brigodeau ;-)) : ne change plus rien, tu as déjà coupé ta barbe :) Merci également à Carine, Guillaume et David pour leur gentillesse.

Remerciements spéciaux à mon bureau d'hydrologues préférées, j'ai nommé Laure et Louise, surtout ne changez rien !! Merci les filles pour votre amitié et merde pour vos thèses respectives.
Spécial dédicace à ma choucroute préférée : Laetitia, si j'ai réussi, tu réussiras. Je te souhaite tout ce que tu sais pour ta thèse et surtout encore plus pour tout le reste.
Enfin merci aux inclassables du rer C, du terrain de frisbee et de la salsa : Simon et Adrien, à quand le prochain Frog ?, Simon président qui me suivrait jusque dans la boue avec le sourire, Sylvain et Camillo toujours prêts à charrier, Cuca et Roya mes rayons de soleil, Michaël LE sportif, Marine LA sportive à qui je souhaite une belle thèse, mes collègues de la DSPE Cécile, Dominique mais aussi Delphine et Corentin.
Je n'oublie pas non plus de remercier l'équipe de choc de l'ASSCR avec Corinne le Roy et les deux sœurs Laura et Lucia ainsi que la capitaine Valérie. Par votre charisme et votre implication vous rendez la vie sociale à IRSTEA riche en couleurs, merci à vous.
Je n'oublie pas mes collègues d'HBAN Rémi, Pierrot, Nina, Nadine, Amandine et Nicolas pour nos discussions de couloirs et surtout mes thésards et post-docs préférés que je n'aie pas encore cités… Caro, Nelly, Séb, Greg, Gonzalo, Raphaël et Nadège!!

Enfin je remercie ceux qui m'ont guidée professionnellement et m'ont donné l'idée folle de faire une thèse et surtout de la terminer, un grand merci à Poppy et Bertrand (de Suède) et surtout Thierry de Paris, et Violaine Augustin (de Dav ;-)).

Je remercie mes brunettes de choc pour leur amitié : Didou, Didi, Wilh, Chacha, So et Ophélia.

Je dédicace cette thèse à ma famille : ma maman, mon papa et mon frérot qui seront toujours là !!

Merci également à Damien et Céline pour nos soirées jeux et tout le reste.

Ma profonde gratitude va vers toi : Pierre-Alain. Je ne te remercierai jamais assez pour tout ce que tu m'apportes au quotidien.

Je voudrais terminer sur cette citation qui résume assez bien mon parcours scolaire, professionnel et mon caractère :

« Soyons réaliste, exigeons l'impossible ! ». El Che

Résumé

Dans le contexte de la Directive européenne Cadre sur l'Eau, il est nécessaire de comprendre l'impact de la contamination métallique particulaire sur les organismes aquatiques, afin de déterminer l'état écologique des masses d'eau. Le biomonitoring est un outil qui repose sur l'utilisation d'organismes et qui permet de faire le lien entre la contamination des milieux et celle des organismes.

L'outil biomonitoring étudiant, en particulier la bioaccumulation des métaux, nécessite l'évaluation de la biodisponibilité des métaux. Or, ce facteur est difficile à mesurer car il dépend des paramètres du milieu et des organismes.

Ce travail a pour but d'étudier la biodisponibilité des métaux particulaires en travaillant avec une moule zébrée. Une approche en laboratoire et une approche sur le terrain ont été couplées. Ces approches se sont appuyées sur le formalisme du modèle cinétique de bioaccumulation : le modèle biodynamique. L'approche laboratoire a utilisé la technique du pulse-chase feeding couplée aux isotopes stables de 5 métaux : cadmium, cuivre, chrome, nickel et zinc. L'évaluation de l'efficacité d'assimilation et du taux d'ingestion, qui matérialisent la biodisponibilité particulaire n'a cependant pas été concluante. Cette technique innovante n'est pas adaptée aux bivalves d'eau douce et une autre approche a été proposée.

Afin d'évaluer la biodisponibilité particulaire *in situ* et de mesurer le taux de filtration, une transplantation de dreissènes sur 14 jours et sur six sites en Ile-de-France (4 sur la Seine et 2 sur l'Orge) a été réalisée. Ce paramètre physiologique influence la biodisponibilité des métaux. Cette approche a permis d'évaluer un taux de filtration *ex situ* mais n'a pas permis d'évaluer la biodisponibilité des métaux particulaires *in situ*. L'approche a cependant permis d'identifier certaines des limites du modèle biodynamique (comme la nécessité d'évaluer les paramètres du modèle *in situ*) et de relier la contamination des milieux à celle des organismes.

Mots clés : Biodisponibilité, Métaux particulaires, Algues contaminées, *Dreissena polymorpha*, Bioaccumulation, Modèle Biodynamique, Transplantation vs laboratoire

Abstract

Within the context of the European Water Framework Directive, it is necessary to understand the impact of particulate metal contamination on aquatic organisms, in order to determine the ecological state of aquatic systems. Biomonitoring is a tool, which is based on the use of aquatic organisms, and which makes links between freshwater contamination and aquatic organisms' contamination. In particular, the tool biomonitoring studying metals bioaccumulation needs the evaluation of metals bioavailability. Yet this factor is difficult to measure because it depends on environmental and biological parameters.

This work aims at studying the bioavailability of particulate metals by working with zebra-mussel. A laboratory and an *in situ* approach were coupled. These approaches leaned on the formalism of the kinetic model of bioaccumulation: the biodynamic model. The laboratory approach used the technique of the pulse-chase feeding coupled with stable isotopes for 5 metals: cadmium, copper, chromium, nickel and zinc. Estimation of assimilation efficiency and filtration rate which represent bioavailability was not decisive. Indeed the innovative technique is not fitting to freshwater bivalves. Another approach was proposed.

Transplantation of dreissenes for 14 days on 6 sites located in the Ile-de-France region (4 in Seine River and 2 in Orge River) was carried out. The goal was to estimate particulate bioavailability *in situ* and to measure the filtration rate. This is a physiological parameter influencing the bioavailability of metals. The approach allowed to identify some of the limits of the biodynamic model (as the necessity to estimate parameters of the model *in situ*) and to relate environmental contamination with metal body burdens.

Key words: Bioavailability, Particulate metals, Contaminated algae, *Dreissena polymorpha*, Bioaccumulation, Biodynamic Model, Transplantation vs laboratory

Liste des abréviations et symboles

BAF	Bioaccumulation Factor
BCF	Bioconcentration Factor
BSAF	Biota-Sediment Accumulation Factor
BCR	Bureau Community of References
BLM	Biotic Ligand Model
COD	Carbone Organique Dissous
DCE	Directive Cadre sur l'Eau
DGT	Diffusive Gel Technique
DRX	Diffraction aux Rayons X
EXAFS	Extended X-Ray Absorption Fine Structure
FIAM	Free-Ion Activity Model (Modèle de l'ion libre)
GPT	Gut Passage Time
IC	Indice de Condition
Kd	Constante dissoute
LSCE	Laboratoire des Sciences du Climat et de l'Environnement
MES	Matières En Supension
MEB	Microscope électronique à Balayage
MET	Microscope électronique à Transmission
MPI	Metals Pollution Index (Index de Pollution Multi-métallique)
NQE	Normes de Qualité Environnementale
PIRENSeine	Programme Interdisciplinaire de Recherche sur l'Environnement de la Seine
SIAAP	Syndicat Interdépartemental pour l'Assainissement de l'Agglomération Parisienne
STEP	STation d'EPuration
XANES	X-ray Absorption Near Edge Structure

Symboles

Al	Aluminium
AE	Assimilation efficiency (Efficacité d'Assimilation) (%)
Cd	Cadmium
C_d	Concentration en métaux dissous biodisponibles ($\mu g.L^{-1}$)
C_{org}	Concentration en métaux dans les tissus mous ($\mu g.g^{-1}_{\text{poids sec}}$)
C_p	Concentration en métaux biodisponibles dans les particules ($\mu g.g^{-1}$)
CR	Clearence rate (Taux d'épuration) ($g.g^{-1}_{\text{poids sec organisme}}.j^{-1}$)
Cr	Chrome
Cu	Cuivre
Fe	Fer
FR	Filtration rate (taux de filtration) ($L.g^{-1}_{\text{poids sec organisme}}.j^{-1}$)
g	Taux de croissance (j^{-1})
IR	Ingestion rate (Taux d'ingestion) ($g.g^{-1}.j^{-1}$)
k_u	Constante cinétique d'assimilation par voie dissoute ($L.g^{-1}.j^{-1}$)

k_e	Constante d'excrétion (j^{-1})
Mn	Manganèse
Ni	Nickel
Pb	Plomb
Zn	Zinc

Sommaire

Remerciements I
Résumé III
Abstract V
Liste des abréviations et symboles VII
Introduction générale 1
Chapitre 1 : Contexte scientifique 11
1. Contamination métallique particulaire 12
1.1. Origine, dynamique et état des lieux de la contamination particulaire 12
1.2. Cas de la Seine et de l'Orge 22
1.3. Contamination métallique et règlementation 25
2. Biodisponibilité des métaux 27
2.1. Définition et techniques de mesure de la biodisponibilité 29
2.2. Principe du biomonitoring 36
2.3. Biomonitoring avec Dreissena polymorpha 37
3. Modèles de bioaccumulation 40
3.1. Voies de bioaccumulation 40
3.2. Mécanismes de bioaccumulation et premiers modèles de bioaccumulation 41
3.3. Le modèle biodynamique 46
4. Evaluation de la biodisponibilité particulaire chez les invertébrés aquatiques : état de l'art 52
4.1. Définition des constantes qui définissent la biodisponibilité particulaire 52
4.2. En laboratoire 54
4.3. In situ 60
4.4. Conclusion : importance d'évaluer la voie trophique du modèle de bioaccumulation pour un bivalve filtreur d'eau douce. 62
Chapitre 2 : Biodisponibilité des métaux particulaires en laboratoire 65
1. Objectifs 66
2. Matériels et méthodes 67
2.1. Pêche et acclimatation des moules 67
2.2. Croissance et contamination des particules en isotopes stables 68
2.3. Déroulement du pulse-chase feeding et échantillonnage 70
2.4. Préparation des échantillons et analyses 77
2.5. Traitement des données 78
2.6. Formules de calcul de l'ingestion des particules et de l'efficacité d'assimilation des métaux 79
3. Résultats et discussion 81

3.1. Difficultés analytiques rencontrées 81
3.2. Contamination de la nourriture 84
3.3. Suivi de l'excrétion des particules 90
3.4. Évaluation du taux d'ingestion et évaluation de l'efficacité d'assimilation des métaux .. 92
3.5. Limites méthodologiques 96
4. Conclusions et perspectives 101
Chapitre 3 : Biodisponibilité des métaux particulaires *in situ* 105
1. Objectifs 106
2. Matériels et méthode de l'évaluation de la biodisponibilité particulaire *in situ* 107
2.1. Sites d'études 107
2.2. Déploiement des organismes et du matériel 112
2.3. Prélèvements ponctuels 114
2.4. Préparation et analyses des échantillons au laboratoire. 114
2.5. Calcul de l'indice de condition 116
3. Mesure du taux de filtration 116
3.1. Faisabilité de mesure du taux de filtration *in situ* 117
3.2. Protocole de mesure du taux de filtration *ex situ* 118
3.3. Résultats de mesure du FR *ex situ* 121
3.4. Origine des variations des taux de filtration 122
4. Etat chimique des sites 125
4.1. Caractérisation physico-chimique de l'eau et des particules 125
4.2. Contamination métallique de l'eau, des particules et des organismes 128
5. Relation entre la contamination des milieux et la bioaccumulation et les limites du modèle de bioaccumulation 135
5.1. Sites sur la Seine 135
5.2. Sites sur l'Orge 138
5.3. Validation et limites du modèle de bioaccumulation : jeux de données in situ 141
6. Limites de l'évaluation de l'AE *in situ* 150
7. Conclusions et perspectives 153
7.1. Conclusions générales 153
7.2. Perspectives 154
Conclusions et perspectives 156
Bibliographie 164
Annexes 176
Article 188

Introduction générale

Depuis une dizaine d'années, la protection de l'environnement est devenue un enjeu majeur de notre société. Cet enjeu fait suite à la prise de conscience globale, des scientifiques bien sûr, mais aussi des décideurs et de la population, de la dégradation et de la contamination de notre environnement. En effet, les activités humaines rejettent des substances qui vont se retrouver dans l'ensemble des compartiments : air, sol et eau. Ces substances naturelles ou chimiques sont indésirables et vont alors contaminer les écosystèmes : on parle de contaminants. Ils sont de deux types (1) organiques, comme les hydrocarbures, les produits phytosanitaires et les produits pharmaceutiques, ou (2) métalliques.
Un contaminant peut également être nommé polluant s'il est considéré comme présentant un risque pour l'homme ou les écosystèmes. Dans les écosystèmes, les contaminants s'accumulent irrémédiablement dans les compartiments aquatiques après dépôt puis ruissellement ou infiltration.

L'étude de l'impact environnemental des métaux est une problématique qui a émergé dans les années 70 (Uthe and Bligh, 1971), suite aux rejets liés à nos activités, comme l'agriculture, l'industrie et nos modes de vie (urbanisation, consommation d'énergies fossiles, produits pharmaceutiques, produits de consommation, etc.). De plus, ce sont des contaminants persistants, car non dégradables. De nos jours, il existe de nouvelles sources de contamination métallique dues à l'activité d'usines de recyclage de déchets électroniques (téléphones portables, ordinateurs, téléviseurs, etc.) qui peuvent entrainer la contamination des sédiments de rivière (cadmium, cuivre, nickel et zinc) comme en Chine (Wong *et al.*, 2007). Les rejets métalliques, dans les cours d'eau, sont soumis à une réglementation et sont donc contrôlés. Ils sont en décroissance dans les pays de l'Union Européenne (UE) (Taylor and Owens, 2009) ou d'Amérique du nord (Spliethoff and Hemond, 1996).
L'accumulation de données sur la contamination métallique des rivières a permis, en presque 50 ans, d'avoir aujourd'hui une très bonne connaissance du transport des métaux dans les rivières (Cánovas *et al.*, 2012; Le Pape *et al.*, 2013), de leur géochimie (Elder, 1988) et du rôle des sédiments en tant que sources métalliques (Chon *et al.*, 2012). Il a ainsi été démontré que la majorité des flux de métaux transitant dans la rivière était constituée essentiellement de métaux sous formes particulaires, apportés au moment de crues (Hart *et al.*, 1988; Poikane *et al.*, 2005; Ollivier *et al.*, 2011). Ces flux sont enrichis d'une

contamination métallique particulaire provenant de sources diverses : ruissellement des sols agricoles par temps de pluie (Marttila *et al.*, 2013), eaux usées non traitées issues des rejets de STEPs (STations d' EPuration), par temps de pluie et des rejets industriels (Chabukdhara and Nema, 2012). De récents travaux (Schäfer *et al.*, 2009; Priadi *et al.*, 2011a) ont montré que la mobilité des métaux particulaires (leur capacité à passer dans la phase dissoute) était étroitement liée à leurs sources. Ainsi, les métaux d'origine urbaine semblent beaucoup plus mobiles que les flux métalliques naturels. La contamination du milieu en métaux apparait donc comme très variable quantitativement (teneur) et qualitativement (spéciation) dans le temps et dans l'espace.

Le bassin versant de la Seine est un bassin fortement impacté par les activités humaines et la concentration de la population. De ce fait, la Seine est un des fleuves les plus contaminés d'Europe en métaux (Meybeck *et al.*, 2007). Depuis les années 60 cependant, il a été constaté une très forte diminution des rejets. Ainsi la contamination métallique dissoute est généralement inférieure aux normes de qualité environnementale (NQE) des masses d'eau superficielles (Thévenot *et al.*, 2009). La contamination métallique particulaire, non prise en compte, peut présenter, quant à elle, un risque pour les organismes qu'il est difficile d'évaluer. Il serait donc intéressant de pouvoir évaluer la biodisponibilité des métaux particulaires, c'est-à-dire la part de métaux susceptible d'interagir avec les organismes aquatiques, ceci afin d'évaluer le risque.

La Directive Cadre sur l'Eau (DCE) (2000/60/CE) a été adoptée le 23 octobre 2000. Cette Directive a pour but le retour au bon état chimique et écologique des masses d'eau d'ici 2015 pour les pays membres de l'Union Européenne. Cette directive a permis de mettre en place un état des lieux grâce à un plan de gestion reposant sur un programme de mesure et de surveillance. Ce programme a été mis en place afin d'évaluer le risque que cette contamination est susceptible d'engendrer. L'état biologique est déterminé grâce aux indices biologiques (prélèvement d'organismes types qui définissent par leur présence ou non la qualité biologique). L'état chimique est évalué par le dosage des contaminants dans l'eau et est comparé aux normes de qualité environnementale (NQE) pour les masses d'eau superficielles.

Malheureusement, ces deux évaluations ne permettent pas d'évaluer le risque, car les indices biologiques ne prédisent pas l'effet de la pollution (l'effet létal seulement est pris en

compte et pas l'effet sublétal) et les mesures chimiques ne considèrent que les fractions des métaux qui se trouvent dans la phase dissoute et ne prennent pas en compte la contamination des particules (en suspension ou de fond : les sédiments) ou du biote, sauf pour certains composés comme le mercure.

Ainsi, la compréhension de l'impact sur les organismes des contaminants particulaires dans la rivière est un enjeu de taille car il reste difficile à appréhender et n'est pas pris en compte par la réglementation.

Le biomonitoring, au sens large du terme, permet d'évaluer l'impact des contaminants sur un écosystème (système terrestre ou hydro-système) ou sur des organismes. Cette technique repose sur la collecte ou de mesure des donnés liées aux organismes (densité, cycle de vie, paramètres physiologiques, etc.) afin d'évaluer l'impact des polluants. Il est par exemple possible d'évaluer l'impact des contaminants métalliques dans les écosystèmes aquatiques en utilisant des organismes aquatiques (Zhou *et al.*, 2008). Une technique, en particulier, repose sur des mesures de la bioaccumulation des métaux par les organismes modèles ou biomoniteurs. Elle permet de faire le lien existant entre la contamination environnementale mesurée et la contamination finale des organismes, l'objectif étant de comprendre les mécanismes gouvernant la bioaccumulation qui conduit à la contamination.

En France, le biomonitoring a été développé afin de suivre la contamination métallique et organique des eaux du littoral, suite à la mise en place du Schéma Directeur d'Aménagement et de Gestion des Eaux (SDAGE) du Bassin Rhône-Méditerranée-Corse avec la moule *M. galloprovincialis* (Andral *et al.*, 2004; Andral *et al.*, 2011).

Il serait intéressant de développer cette technique de biomonitoring en l'étendant au suivi de la qualité des ressources en eau potable, en complément de la DCE. L'organisme à utiliser étant la moule *Dreissena polymorpha* puisqu'il a été montré récemment que c'est un bon candidat au biomonitoring (Bervoets *et al.*, 2005a). En effet, ce bivalve d'eau douce ubiquiste, résiste bien à la contamination des milieux et bioaccumule les contaminants proportionnellement à la contamination du milieu. Ce bivalve pourrait être utilisé afin de suivre la contamination métallique des eaux douces et pourquoi pas pour évaluer, plus précisément, la biodisponibilité de cette contamination dissoute et particulaire ?

Ce biomoniteur filtreur est exposé aux métaux par contact direct du dissous mais aussi par ingestion de particules contaminées. Cette voie de contamination est connue depuis les années 60-70 mais la prise de conscience de son importance date des années 90 (Reinfelder and Fisher, 1991; Luoma *et al.*, 1992). Cette voie n'est plus à négliger et nécessiterait d'être prise en compte dans les tests de toxicité et la réglementation (Fisher and Hook, 2002; Ahlf *et al.*, 2009).

En effet, cette voie, pour certains métaux, est la voie prédominante de la contamination chez des bivalves (Roditi and Fisher, 1999; Bourgeault *et al.*, 2011).

Les facteurs influençant cette voie ne sont pas encore clairement définis : la labilité des métaux particulaires est complexe à évaluer, les premiers échantillonneurs passifs sont en cours d'élaboration (Pradit *et al.*, 2013) et il en va de même pour le comportement des organismes vis-à-vis des particules.

Le biomonitoring est développé *in situ*. En parallèle, la formalisation de la bioaccumulation des métaux repose sur un modèle biodynamique. Il repose sur de la toxico-cinétique du premier ordre. Ce modèle intégratif considère à la fois, la voie de bioaccumulation des métaux par le dissous et par le particulaire, et à la fois la physiologie de l'organisme (Luoma and Rainbow, 2005).

De la même façon que les facteurs environnementaux influencent l'accumulation par voie dissoute, les propriétés physico-chimiques des particules porteuses de métaux sont susceptibles d'influencer fortement le transfert des contaminants particulaires. La variabilité des propriétés physico-chimiques des particules doit donc être prise en compte afin de pouvoir établir un lien entre la contamination chimique du milieu, la biodisponibilité et ensuite la bioaccumulation (Rainbow *et al.*, 2011). De plus, les particules porteuses des métaux étant ingérées par les bivalves, il est également primordial d'identifier les paramètres qui régulent la physiologie des organismes dans le but de comprendre l'ingestion des particules par ces derniers. Ainsi, dans le but de comprendre comment les métaux particulaires sont ingérés l'étude du taux d'ingestion (IR) des particules et l'efficacité d'assimilation (AE) des métaux est primordiale. Ces paramètres physiologiques sont la clé permettant de comprendre la biodisponibilité des métaux particulaires chez les bivalves (Wang *et al.*, 1995; Roditi and Fisher, 1999; Hédouin *et al.*, 2010).

Objectifs de l'étude et démarche scientifique

L'objectif de ce travail de thèse est d'évaluer la biodisponibilité des métaux particulaires, dans les rivières, en étudiant la bioaccumulation. Le travail est réalisé avec un organisme modèle, la dreissène. Deux approches complémentaires, en laboratoire et *in situ*, sont envisagées et leur faisabilité est discutée.

La dreissène a été choisie car elle a beaucoup été étudiée dans les années 90. En effet, sa forte concentration dans les écosystèmes aquatiques a causé des dégâts, dont le coût financier a été lourd, il y a 20 ans le nord des Etats-Unis (Wu *et al.*, 2010). Ainsi, son mode de vie est connu (durée de vie, lieux colonisés, cycle de reproduction), sa physiologie également. De plus, sa manipulation est courante (pêche et acclimatation en laboratoire) et cet organisme est résistant à la contamination et l'accumule de façon proportionnelle à la concentration réelle du milieu. C'est également un organisme filtreur. Il est donc en contact permanent avec les particules en suspension, dont il se nourrit. Enfin, comme cet organisme colonise l'ensemble des masses d'eau du globe, il possède les caractéristiques nécessaires au biomonitoring. Il est donc légitime pour l'étude de la biodisponibilité des métaux particulaires.

L'étude de la biodisponibilité particulaire est une étude complexe car elle repose sur la compréhension de plusieurs mécanismes qui sont dépendants les uns des autres : (1) la spéciation des métaux sur les particules et leur mobilité vers la phase dissoute sont fonction du type de particules (naturelles ou d'origine urbaine) (Priadi *et al.*, 2011a), du type de métal et aussi des caractéristiques physico-chimiques du milieu (pH, dureté, etc.) (Manceau *et al.*, 2002), (2) l'ingestion ou non des particules par les organismes, (3) la désorption des métaux des particules vers les organismes qui aboutit à une assimilation ou non du métal. Ces trois mécanismes sont fonction de différents facteurs.

Il existe des facteurs abiotiques (physico-chimie du milieu et quantité et qualité des particules, etc.) qui impactent les mécanismes (1) et (2), et des facteurs biotiques comme le comportement des organismes : capacité à choisir les particules qu'il filtre ; la physiologie : capacité à ingérer les particules ou à assimiler les métaux ; des organismes qui impactent les mécanismes (2) et (3).

Un travail en laboratoire permet de contrôler la qualité et la quantité de nourriture fournie aux organismes, les conditions physico-chimiques de l'eau (pH, dureté, taux de matière organique, etc.) et la spéciation des métaux. Ainsi, il est possible d'étudier l'impact de la réponse des organismes sur la biodisponibilité des métaux particulaires. Cependant, en travaillant avec un seul type de particule et avec des particules artificiellement contaminées, l'expérimentation s'éloigne de la réalité du terrain. Travailler uniquement en laboratoire (hors mésocosmes) amène un biais à l'évaluation de la réponse des organismes à la contamination naturelle. Il semble donc intéressant de coupler l'approche en laboratoire, simple mais reproductible, et l'approche terrain, complexe mais représentative (Ramade, 2007).

L'étude de la bioaccumulation des métaux particulaires en laboratoire repose sur la méthodologie innovante du pulse-chase feeding avec des isotopes stables (Croteau *et al.*, 2007). Cette méthodologie permet notamment de travailler à des teneurs en métaux faibles et donc représentatives des conditions environnementales. Elle a déjà été testée sur des invertébrés aquatiques, mais n'a jamais, à l'heure actuelle, été testée sur des bivalves.

Les métaux étudiés seront les métaux couramment identifiés comme étant les marqueurs de rejets liés aux activités humaines, comme le cadmium et le zinc (Priadi *et al.*, 2011a) et le cuivre, le chrome et le nickel qui sont des métaux présents dans les cours d'eau en Ile-de-France (Meybeck *et al.*, 2007; Tusseau-Vuillemin *et al.*, 2007). De plus, la toxicité de l'ensemble de ces métaux est connue comme celle du cadmium et du cuivre (Elbaz-Poulichet *et al.*, 2006) et bien-sûr du chrome (hexavalent et aussi tétravalent) (Rodgher *et al.*, 2012). Sur le terrain, l'aluminium, le manganèse et le fer sont des métaux qui caractérisent la signature naturelle des sols, leur présence n'est alors pas synonyme d'une pression anthropique

Les sites d'étude sont localisés le long de cours d'eau en Ile-de-France, la Seine (grande échelle) et un de ses affluents : l'Orge (petite échelle), afin d'étudier, à deux échelles ; un fleuve et le bassin versant d'Ile de France, l'impact de la concentration des populations (rejets urbains ponctuels et diffus par retombées atmosphériques) et des activités industrielles et agricoles sur la qualité des masses d'eau.

L'enjeu, *in fine*, est de mettre en place un outil biologique de mesure, reposant sur un invertébré filtreur, afin d'évaluer la contamination métallique particulaire en milieux aquatiques naturels et urbanisés.

Ce manuscrit de thèse se divise en trois chapitres. Le premier chapitre bibliographique présente le contexte de la contamination métallique particulaire en Ile-de-France, introduit la notion de biodisponibilité et explicite la bioaccumulation des métaux par les organismes aquatiques.

Les chapitres suivants présentent une synthèse critique des travaux réalisés et des résultats obtenus.

Des expérimentations en laboratoire et *in situ* ont été mises au point afin d'évaluer l'impact de la quantité, de la qualité des particules et des caractéristiques physico-chimiques du milieu sur la bioaccumulation des métaux particulaires, et de comprendre leur biodisponibilité.

- Une expérimentation en laboratoire a été tentée afin de tester une méthodologie innovante dans le but d'évaluer un facteur de contrôle de la bioaccumulation : la biodisponibilité des métaux particulaires (Chapitre 2). Cette expérimentation, reposant sur la bioaccumulation, n'a pas été concluante et n'a pas permis d'évaluer la biodisponibilité particulaire de cinq métaux avec un organisme modèle. Un type de particules et différentes concentrations en particules ont été testés. La discussion porte sur les limites de la méthodologie mise en place, avec notamment la prise en compte des erreurs expérimentales, et également sur la critique de la robustesse des résultats obtenus.

  Cette expérimentation nécessite des améliorations avant d'être utilisée en « routine » au laboratoire afin d'évaluer la biodisponibilité de différents métaux en fonction de différentes particules et pour un organisme donné.
- Une mesure *ex situ* d'estimation du taux de filtration des dreissènes a été mise au point *(Chapitre 3).* Ce protocole permet de mesurer le taux de filtration des dreissènes à partir d'une eau fraichement prélevée sur les sites d'étude sans ajout de particules artificielles. La mesure des taux de filtration sur différents sites d'étude est comparée aux résultats d'accumulation de métaux par les organismes. Le suivi de

l'accumulation des métaux a été réalisé en parallèle sur les organismes transplantés lors d'une campagne de terrain de 15 jours sur différents sites (la Seine et l'Orge). Ce suivi a été effectué afin d'évaluer si la biodisponibilité des métaux particulaires ainsi que le taux de filtration étaient interdépendants et fonction de la localisation spatiale.

De plus, la pertinence de l'efficacité de prédiction des métaux bioaccumulés par le modèle biodynamique a été discutée.

Ces résultats viennent compléter et confirmer, ou non, les derniers résultats de l'équipe sur la dreissène (Bourgeault *et al.*, 2011).

Chapitre 1 : Contexte scientifique

1. Contamination métallique particulaire

1.1. Origine, dynamique et état des lieux de la contamination particulaire

1.1.1. Origine

Les éléments traces métalliques sont issus de l'érosion des roches mères et de l'activité volcanique. Ils se retrouvent alors dans les sols. Suite aux précipitations, ils passent par infiltration ou par lessivage des sols dans les compartiments aquatiques.

Les extractions minières sont les premières activités humaines qui ont fortement modifié le cycle des métaux et accéléré la contamination métallique des masses d'eau et notamment des sédiments aquatiques. Les éléments traces ne sont pas dégradables et contaminent l'eau et les sédiments, dans lesquels ils peuvent s'accumuler (Campbell *et al.*, 2006).

De nos jours, les bassins versants exposés aux activités humaines diverses (agriculture, industries et urbanisation) en Europe (Taylor and Owens, 2009), en Amérique du Nord (Spliethoff and Hemond, 1996) et en Asie (Inde) (Chabukdhara and Nema, 2012) sont contaminés. La présence de métaux comme le cuivre (Cu), le nickel (Ni), le plomb (Pb) et le zinc (Zn) dans les cours d'eau est un exemple de contamination métallique due aux activités humaines. Le cuivre est utilisé couramment dans l'agriculture, notamment dans les produits phytosanitaires. Dans l'industrie, le nickel et le plomb notamment, sont présents dans les matériaux de construction et comme additifs dans les carrosseries (industrie automobile et aéronautique). Enfin le nickel et le plomb sont produits, suite à nos besoins en énergie, par combustion des énergies fossiles. Le zinc est également présent sous forme de particules dans les produits d'utilisation courante comme dans les produits ménagers, dans certains médicaments et dans de nombreux cosmétiques (Kevin *et al.*, 2008; Luoma and Rainbow, 2008; Thorpe and Harrison, 2008; Thévenot *et al.*, 2009).

Le bassin versant de la Seine occupe une large partie de l'Ile-de-France, qui concentre 14 millions d'habitants soit 23 % de la population française sur 65 000 km^2, soit 12 % du territoire, 25 % des activités industrielles et entre 25 et 30 % des activités agricoles (Meybeck *et al.*, 2007; Thévenot *et al.*, 2007). Ce bassin versant est donc un bon exemple de bassin subissant des pressions anthropiques diverses. La concentration de la population et des activités est à l'origine de la contamination métallique des cours d'eau qui sont les exutoires finaux des différents rejets (Figure 1).

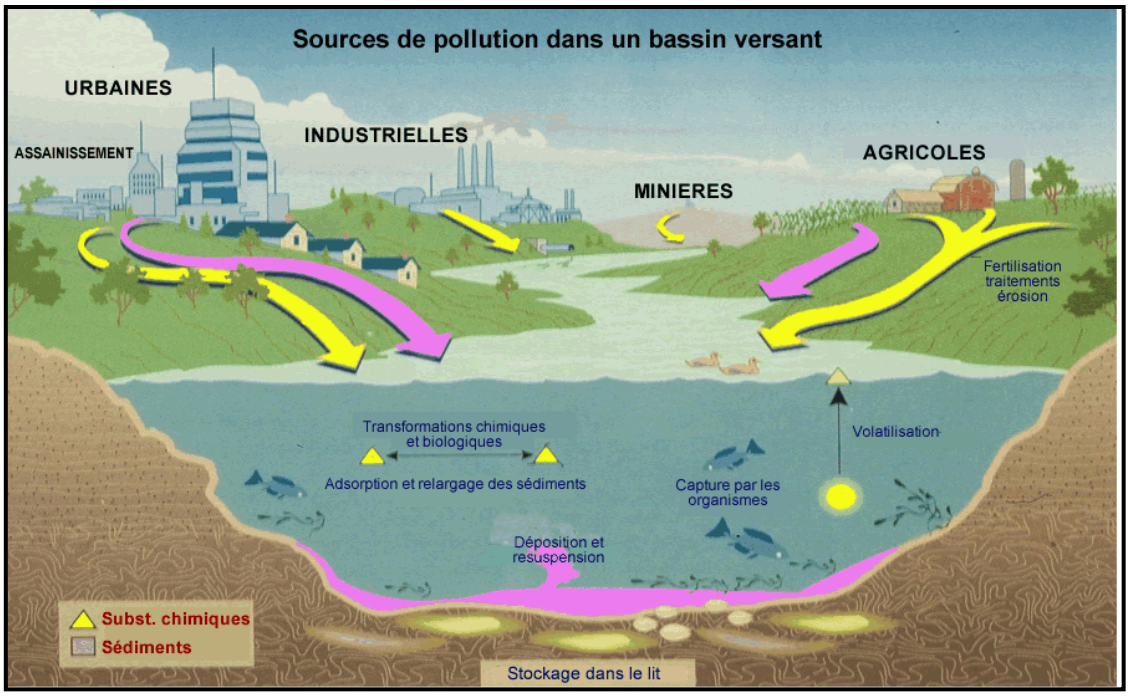


Figure 1 : Source et circulation des contaminants métalliques dans un bassin versant.
Source : http://pubs.usgs.gov/circ/circ1133/heavy-metals.html, Mai 2013 (Modifié : traduit en français)

Les sources de contamination sont soit d'origine diffuse soit d'origine ponctuelle. Les sources diffuses sont les rejets atmosphériques, les ruissellements sur les surfaces urbanisées imperméables (routes, parking, batiments) et le lessivage des sols agricoles contaminés par les produits phytosanitaires. Les sources de contamination d'origine ponctuelle sont les rejets industriels et les rejets d'eaux usées traitées.

1.1.2. Spéciation de la contamination métallique particulaire

1.1.2.1. Définition de la spéciation des métaux particulaires

La spéciation d'un métal est l'ensemble des formes chimiques du métal dans un milieu donné. Elle influence la biodisponibilité, la bioaccumulation et la toxicité du métal. Un modèle de biodisponibilité, le Biotic Ligand Model (BLM) décrit l'internalisation des métaux en supposant qu'il est proportionnel à l'effet toxique (Pelletier and Campbell, 2008). De plus, il a été montré que la composition organique et inorganique des particules était liée à la biodisponibilité des métaux particulaires (Arifin and Bendell-Young, 2000), ainsi la spéciation d'un métal peut varier en fonction de la composition des particules.

La contamination métallique dans la colonne d'eau qui est un système dynamique où entrent et sortent les métaux, se répartit dans trois compartiments : (1) la fraction dissoute dans laquelle les métaux sont sous la forme de cations hydratés ou complexés avec des ligands organiques ou inorganiques ; (2) le compartiment «particulaire en suspension» représenté par les matières en suspensions (MES) dans lequel les métaux sont associés à la phase solide en suspension, adsorbés sur les particules ou incorporés dans la structure minéralogique des cristaux ; (3) les sédiments, qui constituent à la fois une source et un puits de MES et donc des métaux associés.

La dynamique de la spéciation des métaux dans le compartiment dissous a longtemps été réduite à l'interaction simple des métaux libres avec des ligands organiques et inorganiques, sans faire de différence entre ces « ligand classiques » et les colloïdes. Or les colloïdes sont un ensemble de particules de petites tailles (comprises entre 2 et 200 nm de diamètre) qui est en suspension dans l'eau. La géométrie complexe et particulière des colloïdes, un système à deux phases à la fois séparées, continues et dispersées, rend la spéciation des métaux sur ce système plus complexe que la spéciation classique d'un métal sur un ligand organique ou inorganique. Cette différence a été formalisée récemment et prend en compte dans la dynamique de la spéciation, la forme (Pinheiro *et al.*, 2005) et le volume du colloïde (Duval *et al.*, 2008). La spéciation des métaux, dans la phase dissoute, sur ces très petites particules en suspension ne sera pas abordée par la suite. Nous nous intéresserons plutôt à la spéciation des métaux sur les particules de plus grosse taille, de l'ordre du micromètre.

En pratique, la phase particulaire est, dans un échantillon d'eau, la phase complémentaire de la phase dissoute. Cette dernière est définie comme la partie de l'eau prélevée qui passe par le filtre de porosité 0,22 ou 0,45 µm. Les métaux se répartissent entre la phase dissoute et la phase solide suivant leur affinité pour l'une ou l'autre de ces phases ; cette répartition est définie comme de la partition. Cette partition est définie par le Kd qui est le ratio entre la concentration dans la phase particulaire et la concentration dans la phase dissoute. Ce Kd est caractéristique du couple métal/particule. Ensuite, un pourcentage de métal dans la phase particulaire par rapport à la quantité totale de métaux présents peut être défini.

Une fois ces considérations prises en compte nous allons nous intéresser, plus particulièrement, à la spéciation des métaux sur la phase particulaire seule.

1.1.2.2. Technique d'évaluation de la spéciation des métaux particulaires

L'étude de la spéciation en phase particulaire est réalisée selon deux types d'approches analytiques : les méthodes physiques et les méthodes chimiques.

Les méthodes d'analyse physique reposent sur l'observation de la particule à l'aide de moyens analytiques divers. Parmi ces moyens, nous pouvons citer le tri sélectif par granulométrie, la diffraction aux rayons X (DRX), la microscopie à balayage (MEB) ou à transmission (MET) et la spectroscopie d'absorption des rayons X produit par synchrotron (EXAFS, XANES).

L'avantage de ces méthodes est leur caractère non destructeur. La structure de l'échantillon de particules qui sera analysé n'est pas modifiée (sauf pour le tri sélectif).

Les inconvénients majeurs sont : (1) pour la microscopie électronique, l'impossibilité de quantifier la proportion de phases porteuses observées et voire même de les observer (si la concentration en métaux est inférieure à 1 % de la masse atomique totale de la masse porteuse) ; (2) pour la spectroscopie d'absorption, la complexité d'analyse (nombreux échantillons de référence) et la difficulté d'accéder aux instruments nécessaires. La spectroscopie d'absorption quant à elle, permet la quantification de la part de métal portée par chaque phase porteuse pourvu que cette part soit supérieure à 10 % (Cornu and Clozel, 2000; Le Pape, 2012).

Les méthodes d'analyse chimique passent par une étape d'extraction chimique du métal de son contexte structural. Le dosage du métal est conduit dans la solution d'extraction. Parmi ces méthodes chimiques, la méthode par extraction séquentielle est à citer. Cette méthode consiste à extraire les métaux de la matrice étudiée, par différents réactifs chimiques les uns après les autres. Les réactifs sont utilisés selon un gradient croissant d'efficacité d'extraction. Différentes phases contenant des métaux de moins en moins mobiles sont obtenues. Il existe en fait de très nombreux protocoles d'extractions séquentielles, revus par Cornu et Clozel (2000). Selon les extractions réalisées, différentes formes de métaux sont quantifiées. Parmi ces protocoles, seul celui dit « BCR » développé par le Community Bureau of Reference (BCR) européen a été validé par la communauté internationale. Le BCR définit quatre fractions de métaux comme la fraction échangeable, la fraction réductible, la fraction oxydable et la fraction résiduelle (Pueyo *et al.*, 2001). Cette méthode d'extraction

peut être appliquée à la fois à des échantillons de MES mais aussi à des échantillons de sédiment ou de sol.

Il existe également des extractions sélectives qui n'utilisent qu'un seul type de réactif. Une partie seulement des métaux associés aux particules est extraite. Ce type d'extraction permet par exemple d'identifier uniquement une fraction de métaux supposés biodisponibles en utilisant des solutions tampons (fabriquées avec de l'acide acétique) à un pH représentatif de celui retrouvé dans le tractus des organismes exposés (pH=4 pour les bivalves et pH=6 pour le détritivore) (Amiard *et al.*, 2007) ou simplement des acides plus ou moins dilués (HNO_3 concentré, HCl 1N) (Luoma, 1989). Ces méthodes chimiques ont un avantage certain car elles apportent une information rapide sur la répartition des métaux entre les phases mobiles et peu mobiles. L'étude de la variation spatiale et temporelle de cette partition est alors possible (Grosbois *et al.*, 2007; Gagnon *et al.*, 2009; Priadi *et al.*, 2011b). Ces extractions ont l'inconvénient majeur d'être peu reproductibles. Elles sont dépendantes des quantités extraites (rendement d'extraction variable 30-100% selon le métal), du temps d'agitation et de contact, etc. (Cornu and Clozel, 2000; Le Pape, 2012).

1.1.2.3. Etat de l'art sur la spéciation et la partition des métaux particulaires

Un ensemble d'études exhaustives, permettant de mesurer la partition et la spéciation des métaux particulaires, a été réalisé dans des milieux aquatiques très divers : golfes, estuaires, fleuves ou encore de plus petites rivières urbaines (Leivuori, 1998; Leivuori and Vallius, 1998; Lu and Allen, 2001; Bibby and Webster-Brown, 2005; Poikane *et al.*, 2005; Bibby and Webster-Brown, 2006; Amiard *et al.*, 2007; Grosbois *et al.*, 2007; Gagnon *et al.*, 2009; Priadi, 2010 Decembre). Il résulte de ces études que les métaux suivant : l'aluminium (Al), le cadmium (Cd), le cuivre (Cu), le chrome (Cr), le fer (Fe), le nickel (Ni), le plomb (Pb) et le zinc (Zn) sont classés en trois groupes suivant leur affinité pour les MES.

Métaux à forte affinité pour les MES

Le fer, l'aluminium et le plomb sont les métaux à affinité maximale pour les particules. Leurs Kds sont les plus élevés (log Kd = 5-8) et ils sont peu mobiles. Ils sont très souvent associés à la partie minérale de la particule. Il a été montré sur des MES d'origine urbaine et non urbaine en rivière que, l'aluminium et le fer, sont fixés respectivement à 90 % et 70-80 % sur

la matrice minérale des MES qui est la fraction résiduelle des particules définit par le BCR (Gagnon *et al.*, 2009).

Métaux à affinité variable pour les MES

Le zinc, le cuivre, le chrome et le cadmium sont des métaux ayant une affinité variable pour les MES, notamment car ils restent mobiles, c'est-à-dire passent en solution suivant les conditions physico-chimiques, les conditions d'oxydo-réductions notamment. Des Kd variables suivant le pH ont été mesurés pour ces métaux.

Le cuivre est un métal qui présente une forte, voire une très forte affinité pour les particules. Il est susceptible de se fixer sur les concrétions de ferromanganèse et les hydroxydes de fer mais également sur la phase organique et les oxydes de soufre des sédiments. Le cuivre est un métal dont la spéciation est très fortement impactée par la présence de matière organique car il a une très forte affinité pour cette dernière (Lu and Allen, 2001; Bibby and Webster-Brown, 2006). Ces types de fixation à la matière organique sont solides et rendent alors le cuivre peu susceptible de passer en solution (Pernet-coudrier *et al.*, 2008; Li *et al.*, 2009), sauf en cas d'anoxie forte du milieu (canicule de 2003 en Seine) (Elbaz-Poulichet *et al.*, 2006).

Le chrome et le cadmium sont des métaux ayant une affinité moyenne pour les MES. Ils se fixent préférentiellement aux hydroxydes de fer et de manganèse. Ils ont également une mobilité non négligeable. Le zinc a une affinité égale pour la phase dissoute et particulaire Son Kd avoisine 1. De plus, dans certaines conditions, le cadmium et le zinc sont les plus mobiles puisqu'ils se fixent également à la phase échangeable des MES (Gagnon *et al.*, 2009). En condition anoxique, le zinc et le chrome ont une forte affinité pour la phase dissoute (Leivuori, 1998).

Métaux à faible affinité pour les MES

Le nickel semble être le seul métal qui a une affinité plus forte pour l'eau que pour les particules ou voire même pour les matières organiques complexantes de type acide humique (Tusseau-Vuillemin *et al.*, 2007). Il est généralement très labile. Il a un Kd inférieur à 1. Cependant le nickel peut, dans des fleuves urbains à faible débit et à faible taux d'érosion mécanique et donc avec de faibles teneurs en MES comme la Seine (Dupont *et al.*, 2001), être associé à la phase particulaire à plus de 30 % (Priadi *et al.*, 2011b).

L'étude de la partition et de la spéciation des métaux particulaires révèle une variabilité importante de la mobilité des métaux de la phase particulaire à la phase dissoute.

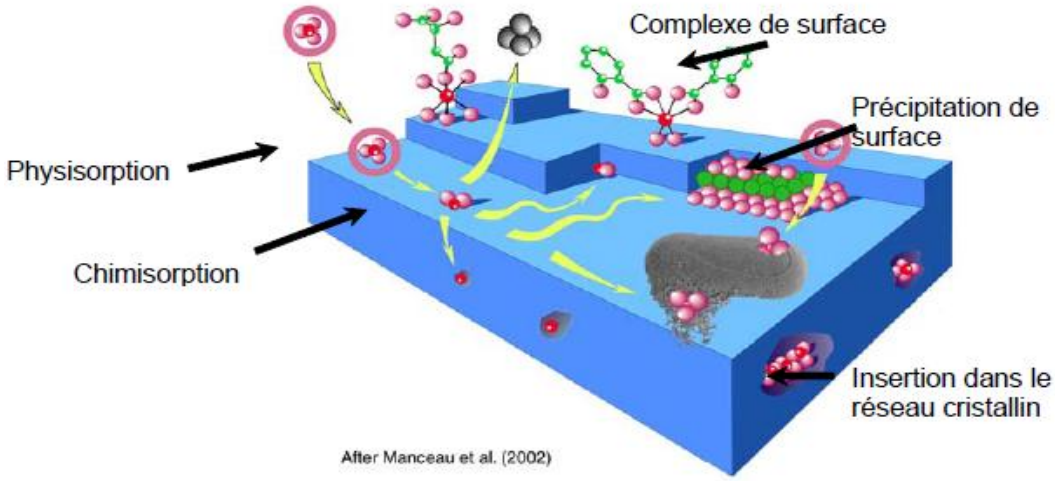


Figure 2 : Principales interactions entre un atome ou une molécule avec un solide à l'interface solide liquide (Manceau et al., 2002).

La variabilité de la mobilité est fonction des types d'interactions entre le métal est la particule (Figure 2). Les métaux qui ont plutôt tendance à se lier aux particules par sorption ou précipitation seront donc plus mobiles. Ce sont les métaux fixés sur la phase échangeable des MES (Cd, Cu, Cr et Zn). A l'inverse, les métaux qui préfèrent la partie minérale et qui s'insèrent donc dans le réseau cristallin seront moins mobiles (Al, Fe et Pb). La variabilité de l'affinité chimique des métaux pour telle ou telle partie des particules peut être contrôlée par le pH du milieu. Ce dernier, lorsqu'il diminue, entraine la mise en solution des sels métalliques, la désorption des cations et l'adsorption des anions. Le pH fait varier l'état d'oxydoréduction des métaux et donc leur affinité chimique pour les particules. Les métaux ne sont pas tous oxydables aux mêmes niveaux et n'ont donc pas la même affinité pour les particules.

La présence également de matière organique en décomposition ou de micro-organismes va produire une acidification du milieu qui provoque la solubilisation des métaux. Les micro-organismes peuvent également provoquer une insolubilisation des métaux par formation de sulfures métalliques insolubles (Deschamps *et al.*, 2006).

Sur des sites impactés par les rejets des STEPs, les particules ont alors de fortes concentrations en matière organique ou en microorganismes et peuvent donc modifier la mobilité de certains métaux, comparativement à des particules naturelles. Le nickel en Seine

illustre bien ce phénomène. Le nickel est habituellement très labile mais en Seine il est associé aux particules à plus de 30 % (Cf. plus haut) car la Seine présente des teneurs en matières organiques (COT) supérieures de 2 à 100 fois par rapport à celles rencontrées dans d'autres fleuves (Dupont *et al.*, 2001). Il a également été montré, en Seine, lors d'épisodes pluvieux qui lessivent les sols urbanisés, que la part de métaux réductibles (donc sensibles aux phénomènes d'oxydo-réductions) et donc plus mobiles comme le zinc, le cadmium, le plomb et le cuivre, augmente (Priadi *et al.*, 2011a).

En conclusion, il a été constaté que la variabilité de la mobilité des métaux est fonction du type de métal et des types de site considérés ; sites naturels ou impactés par des rejets (industriels, urbains, etc.). Il est donc important de connaître les facteurs qui influencent la mobilité de ces métaux afin de pouvoir définir, dans un environnement précis, si le métal particulaire est biodisponible ou non pour les organismes filtreurs.

La spéciation et la dynamique des métaux particulaires dans la colonne d'eau est donc dépendantes des caractéristiques physico-chimiques du milieu, des types de particules et du métal considéré. Après avoir étudié l'aspect qualitatif des métaux dans la colonne d'eau, il est intéressant d'étudier l'aspect quantitatif, en regardant les teneurs en métaux retrouvées dans les sédiments et les particules en Seine.

1.1.2.4. Etat des lieux en Ile-de-France

En Ile-de-France, le bassin versant de Seine subit un fort impact anthropique (rejets industriels et agricoles importants, forte densité de population) à l'origine d'une forte contamination. Elle est une des plus fortes pour les fleuves d'Europe. Elle est supérieure à celles du Rhin, de la Volga ou du Rhône (Thévenot *et al.*, 2009). Ceci cumulé au faible débit de ce fleuve a pour conséquence une faible capacité de dilution des métaux.

Il a été constaté que dans ce bassin versant, les métaux étaient majoritairement sous forme particulaire, entre 50 et 90 % en temps normal. En période de crue et selon les métaux, ils sont retrouvés entre 90 et 99 % sous forme particulaire (Thévenot *et al.*, 2009).

Pour quantifier la contamination métallique anthropique des sédiments et des MES, des facteurs d'enrichissement (EF) sont calculés en faisant le rapport de la contamination des sédiments de fond (ou des MES) par le bruit de fond de sédiments (ou des MES) non

contaminés. Le bruit de fond est déterminé pour chaque métal comme la quantité naturelle en métal présente dans les sédiments par érosion et sédimentation depuis le moyen âge (Meybeck *et al.*, 2004) (Tableau 1).

Sur l'axe Seine, de récents travaux (Meybeck *et al.*, 2007) ont permis de quantifier cet impact anthropique. Cet impact a été observé dans le temps, sur 80 ans (1930-2005), sur les sédiments de fond en aval de l'agglomération parisienne (Figure 3a) et dans l'espace, le long de l'axe Seine sur les MES (Figure 3b).

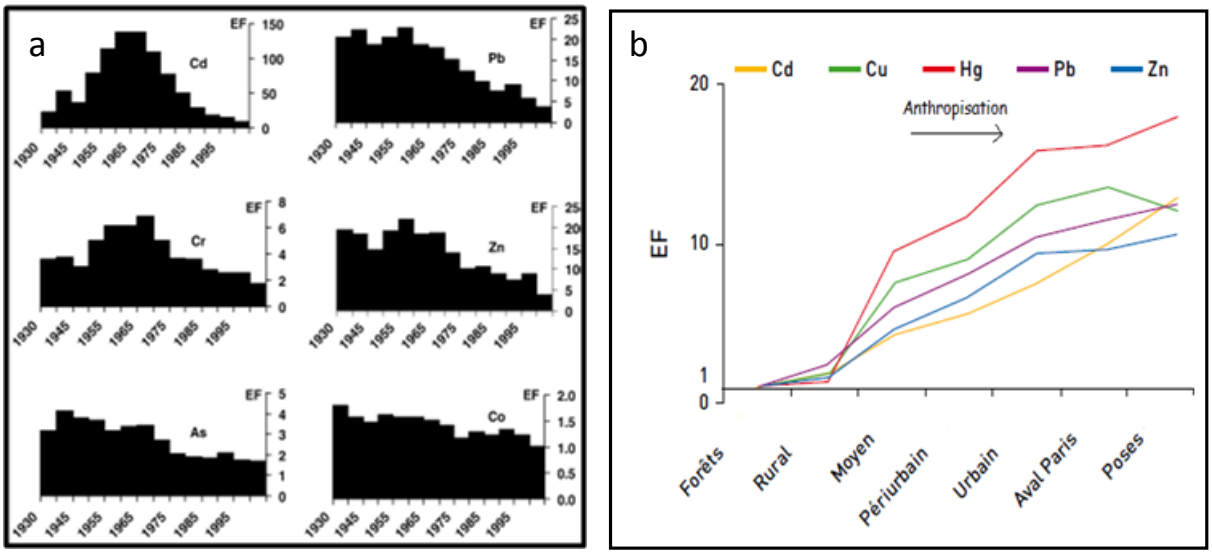


Figure 3a : Profils sur 80 ans de la contamination moyenne sur des périodes de 5 ans des sédiments de fond en Seine en aval de Paris (Extrait de Maybeck et al 2007). Figure 3b : Evolution spatiale le long de l'axe Seine entre 1994-1996 des facteurs d'enrichissement (Enrichissement Factor = EF) des MES (Extrait Daniel R. Thevenot et al., 2009, Fascicule PIREN Seine, Les métaux dans le bassin de la Seine) EF = contamination/bruit de fond, EF=1 équivalent à la contamination métallique des sédiments et MES liée au bruit de fond.

Il a été observé que la contamination particulaire en Ile-de-France, qui a diminué sur les dernières décennies (Figure 3a), reste supérieure au bruit de fond naturel. Il a été observé récemment pour le cadmium, le plomb, le chrome, le zinc, l'arsenic et pour le mercure que la pression anthropique entraîne un enrichissement mesurable des particules de fond (Figure 3a) et en suspension (Figure 3b).

Tableau 1 : Valeurs moyennes de bruit de fonds des métaux sédimentaires (mg.kg$^{-1}_{poids\ sec}$) et écart type (n=10) dans le bassin de la Seine (Meybeck et al., 2004).

Métal	**Cd**	**Cr**	**Cu**	**Hg**	**Ni**	**Pb**	**Zn**
Bruit de fond (mg.kg$^{-1}_{poids\ sec}$)	0,22 (±0,05)	40 (±9)	15 (±5)	0,03 (±0,015)	16 (±2)	20 (±8)	60 (±10)

Il a été observé que la contamination particulaire évolue dans le temps et dans l'espace à large échelle, sur 30 ans et tout le long de la Seine.

Il existe également des variations à plus petite échelle notamment sur une année en Seine. A Poses, il a été constaté en 1995 une augmentation du MPI, indice de pollution multi métallique, pendant la période des basses eaux comparativement à celle des hautes eaux (Figure 4). Le MPI correspond à un facteur d'enrichissement moyen en cadmium, cuivre, mercure, plomb et zinc dans chaque échantillon prélevé par rapport à une teneur théorique naturelle déterminée à partir de l'assemblage minéralogique de chaque échantillon. Cet indice permet de comparer entre eux différents échantillons de particules différentes (MES, sédiments déposé et sédiments anciens).

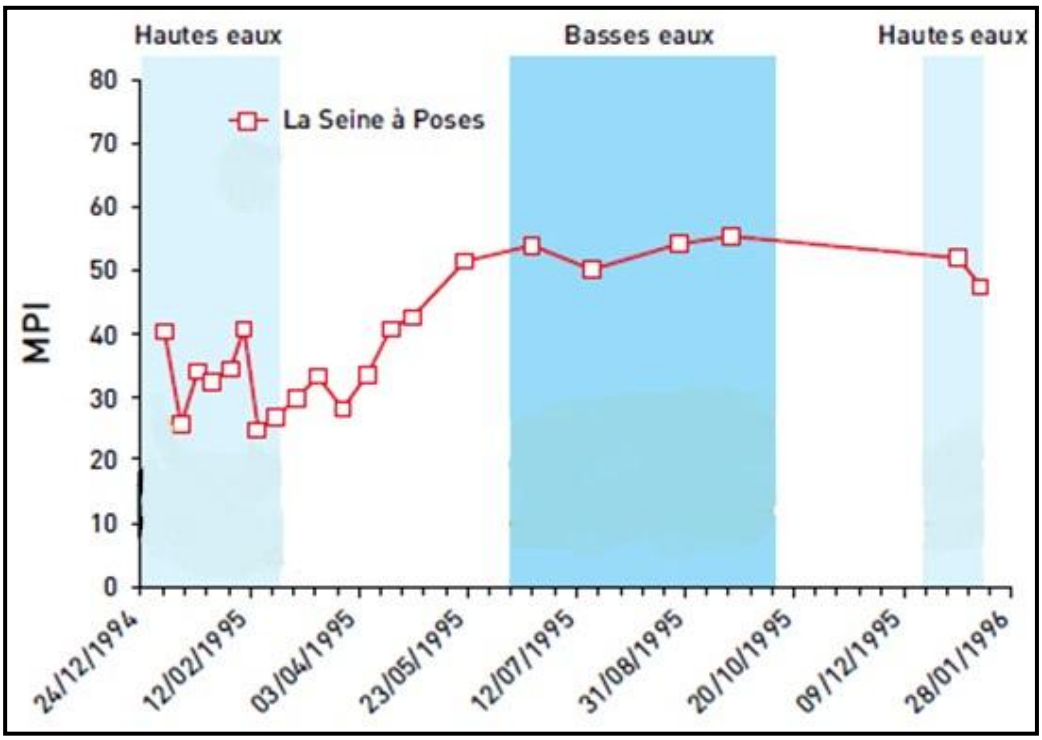


Figure 4 : Etudes des variations de MPI sur l'année 1995 sur 1 site en aval de Paris sur la Seine sur des MES collectées par trappes.

Ainsi la contamination métallique particulaire est fluctuante. Elle varie avec les années. Mais aussi avec la localisation au niveau du cours d'eau et la saison. Enfin, elle est fonction des épisodes pluvieux car lors des périodes de crue, les sédiments de fond sont remis en suspension (Li *et al.*, 2009). Cette remise en suspension peut entrainer un relargage des contaminants par les sédiments qui se retrouvent dans des conditions plus oxiques.

Les variations spatiales et temporelles de la contamination métallique rendent complexe l'évaluation de l'impact de cette pollution pour les organismes. Effectivement, les prélèvements localisés et ponctuels ne semblent pas adaptés. Il est donc nécessaire de faire des suivis intégratifs à grandes échelles.

1.2. Cas de la Seine et de l'Orge

La Seine est un fleuve de 870 km de long avec 65 000 km^2 de bassin et seulement 540 m^3/s de débit moyen à Poses qui matérialise la frontière du fleuve entre l'eau douce et la remontée des eaux saumâtres de la manche. Son débit est faible comparativement à d'autres grands fleuves d'Europe. Sa charge particulaire est faible (quelques mg/L à 250mg/L de MES contre une moyenne de 535mg/L pour les fleuves européens) et les particules sont riches en matières organiques mais naturellement faibles en métaux. La topographie et la composition des sols, essentiellement d'origine sédimentaire (calcaires et carbonatés) (Figure 5) que la Seine traverse (Roy *et al.*, 1999), expliquent les teneurs en particules et leur composition.

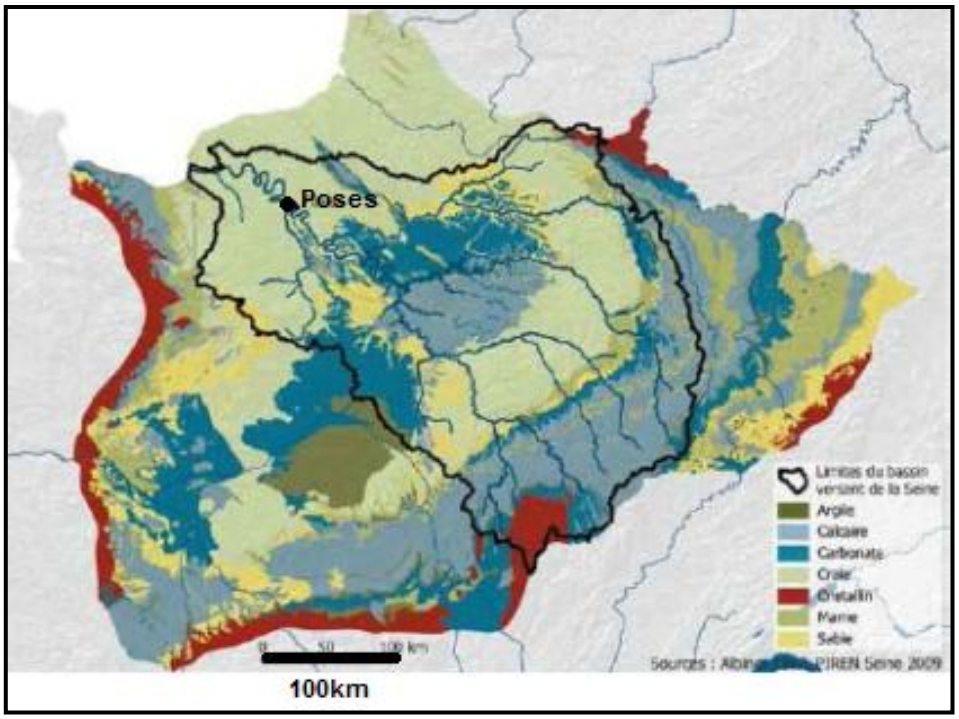


Figure 5 : Carte lithographique du bassin versant sédimentaire de la Seine et localisation de Poses (Source : PIREN Seine 2009).

L'Orge est, comparativement à la Seine, un cours d'eau impacté par une pression anthropique forte et majoritairement d'origine urbaine (Le Pape, 2012). Il est un affluent de la Seine. Ce cours d'eau est francilien et fait une cinquantaine de kilomètres de long. Il prend sa source dans les Yvelines (78) au sud-ouest de Paris et s'écoule dans le département de l'Essonne, du sud-ouest vers le nord-est, et passe au nord des plateaux de la Beauce pour se jeter dans la Seine à Viry-Chatillon au sud de Paris. L'Orge est le cours d'eau principal du bassin versant de l'Orge-Yvette qui est un sous bassin versant de la Seine (Figure 6).

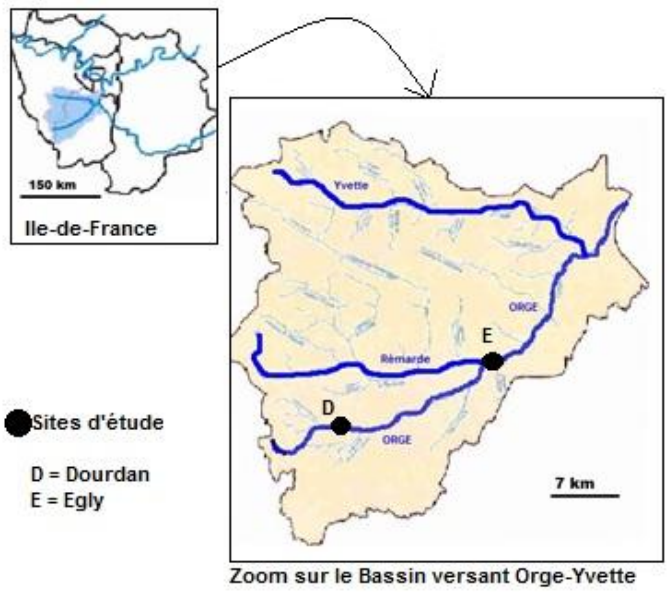


Figure 6 : Localisation du bassin versant de l'Orge-Yvette dont l'Orge est le cours d'eau majoritaire avec l'Yvette et la Rémarde qui sont ses principaux affluents et des sites d'étude.

Ce cours d'eau urbain est une rivière dont le débit moyen est fortement dépendant des précipitations ce qui en fait une rivière modèle pour évaluer les pressions anthropiques qu'elle subit. Ces deux raisons ont motivé l'étude de ce cours d'eau. Un travail de thèse, au Laboratoire des Sciences du Climat et de l'Environnement (LSCE, Gif-sur-Yvette), a d'ailleurs récemment montré que les métaux dont les teneurs augmentaient en aval du cours d'eau comme le cuivre, le plomb et le zinc étaient la signature d'une pression urbaine de type rejets d'assainissement et de lessivage des sols urbains (Le Pape, 2012). Au cours de ce travail, la spéciation des métaux particulaires le long de l'Orge a été étudiée. Ces travaux serviront à expliquer nos résultats suite à l'exposition d'organismes sur ces sites. Deux sites ont été choisis sur l'Orge, un en amont à Dourdan et un plus en aval à Egly. Le détail des sites sera donné dans le chapitre 3.

La Seine et l'Orge sont donc deux cours d'eau du bassin parisien mais impactés à différentes échelles et par des pressions anthropiques différentes. La Seine subit des pressions dues à des rejets divers (industriels, agricoles, urbains etc.) alors que l'Orge est majoritairement impactée par des rejets urbains (rejets de STEPs et lessivage des surfaces bétonnées).

1.3. Contamination métallique et règlementation

La Directive Cadre sur l'Eau (DCE, 2000/60/CE adoptée le 23 octobre 2000) cherche à définir une réglementation unifiée pour l'Europe concernant la qualité des masses d'eau continentales. Ainsi, en ratifiant cette directive, les états membres s'engagent à protéger, restaurer et améliorer la qualité de l'eau dans l'objectif de retrouver un bon état écologique d'ici 2015 (2021 ou 2027 dans des situations où les contraintes techniques et économiques sont trop fortes).

Un des moyens mis en place pour arriver à ce bon état écologique est de définir une liste de substances prioritaires (Annexe N°10 de la DCE 2455/2001/CE) qui sont des composés minéraux et organiques faisant l'objet d'une surveillance particulière et d'une réduction obligatoire de leur rejet dû à leur impact écotoxicologique. Parmi cette liste, certaines substances sont nommées « substances dangereuses prioritaires ». Pour celles-ci, l'objectif est d'arrêter définitivement les rejets, pertes ou émissions. En ce qui concerne les métaux, l'objectif est de retrouver une « contamination » à un niveau représentatif du bruit de fond géochimique naturel.

A l'heure actuelle, quatre métaux sont cités dans la liste des substances prioritaires : le cadmium, le mercure, le nickel et le plomb. Le cadmium et le mercure sont des métaux classés « substances dangereuses prioritaires ». La classification des substances considérées comme dangereuses n'est pas figée et la liste des substances prioritaires est donc susceptible d'évoluer. A l'heure actuelle, le cuivre par exemple, est une substance en cours d'évaluation. De plus, la réglementation concernant les métaux ne s'intéresse pas aux teneurs particulaires ni aux teneurs biodisponibles mais uniquement aux teneurs dissoutes totales. Les normes de qualité environnementale (NQE) sont basées sur les concentrations dissoutes et ont été fixées par la directive « fille » du 16 décembre 2008. Le tableau ci-dessous présente les NQE pour les eaux de surface (rivières, lacs et canaux) pour les quatre métaux (Tableau 2).

Mais la réglementation évolue car la Directive prend en compte, pour le mercure par exemple, la possibilité de mesurer les teneurs dans les sédiments ou dans les tissus biologiques sous réserve que ces mesures offrent un niveau de protection au moins équivalent à celui assuré par la mesure des NQE sur l'eau. De plus, une nouvelle directive

(213/39/UE) adoptée tout récemment, le 12 août 2013, vient modifier la DCE et ses directives filles de 2006 et de 2008. Elle permet l'ajout de 12 nouvelles substances prioritaires à l'ancienne liste, qui en comptait 33. Cependant le cuivre n'a pas été ajouté.

Tableau 2 : Valeurs des NQE-MA (NQE moyenne annuelle) pour les eaux de surfaces intérieures (lacs, rivières et canaux) pour le dissous en fonction de la dureté pour le cadmium ainsi que le bruit de fond naturel estimé en Seine (µg.L^{-1}).

Elément métallique	Dureté de l'eau (mg $CaC0_3$/L)	NQE-MA (µg/L)	Bruit de fond naturel en Seine (µg/L)
Cadmium (et ses composés)	<50	≤0,08	0,01
	50 à 100	0,09	
	100 à 200	0,15	
	≥200	0,25	
Mercure (et ses composés)		0,05	0,93
Nickel (et ses composés)		20	Non disponible
Plomb (et ses composés)		7,2	1,9

Selon les lois européennes, la contamination métallique particulaire (exception du mercure) n'est à ce jour pas prise en compte pour l'évaluation de la qualité chimique des masses d'eau. Et pourtant, il a été démontré pour plusieurs types d'organismes aquatiques (poissons) (Kamunde *et al.*, 2002), bivalves (Bourgeault *et al.*, 2011) que la voie de bioaccumulation majoritaire se faisait pour certains métaux par voie trophique, c'est-à-dire par ingestion des particules contaminées.

Les métaux particulaires sont à l'origine d'une pollution métallique non négligeable des cours d'eau en Ile-de-France. Cette contamination est fluctuante dans l'espace et dans le temps. Elle dépend des épisodes pluvieux et généralement des pressions anthropiques L'impact de cette contamination est donc difficile à prévoir et n'est pas pris en compte (exception du mercure) par les décideurs (DCE). Afin de pouvoir évaluer l'impact pour les organismes aquatiques, une meilleure compréhension de la contamination métallique particulaire ainsi que de sa biodisponibilité est nécessaire. Il semble donc important de développer des outils intégratifs adaptés à cette pollution.

2. Biodisponibilité des métaux

Afin d'étudier la biodisponibilité des métaux particulaires une technique de biomonitoring reposant sur la bioaccumulation des métaux va être utilisée.

Dans le cadre de cette thèse, lorsque nous parlons de biodisponibilité des métaux, nous parlons des métaux biodisponibles dans les milieux et non des métaux biodisponibles à l'intérieur des organismes.

Les termes de biomonitoring et de bioaccumulation sont des termes souvent utilisés incorrectement ou utilisés comme des synonymes de bioindication ou de bioconcentration.

Le paragraphe suivant va donc nous permettre de clarifier la définition de l'ensemble de ces différents termes.

- **Bioindication** (Markert et al., 2003; Markert, 2008) : est définie comme une méthode d'observation de l'impact des facteurs externes sur les écosystèmes et les organismes. Cette méthode repose sur l'utilisation d'organismes (ou d'un ensemble d'organismes) appelés bioindicateurs. Ils donnent des informations sur la qualité de l'environnement. Un bioindicateur ne peut pas être biomoniteur car il donne des informations non quantitatives. Par exemple, par sa présence ou son absence il peut définir la qualité écologique d'un écosystème et en particulier la qualité du fonctionnement de l'écosystème.

Le biomonitoring est une méthode d'observation plus complète, car elle donne des informations quantitatives et pas uniquement qualitatives.

- **Biomonitoring** (Markert et al., 2003; Markert, 2008) : est défini également comme une méthode d'observation de l'impact de facteurs externes sur les écosystèmes et les organismes. Cette méthode repose sur l'utilisation d'organismes (ou d'un ensemble d'organismes) appelés biomoniteurs. Ils donnent des informations quantitatives (quantité de contaminants bioaccumulés, impact des contaminants sur la reproduction, la mobilité des organismes ou dommage à l'ADN des organismes, etc.) de la qualité de l'environnement. On parle aussi de bioindication active car le biomonitoring repose sur l'utilisation de biomoniteurs qui sont également des bioindicateurs.

La définition du terme bioaccumulation que nous utiliserons par la suite a été faite par (Gobas and Morrison, 2000) et est désormais communément utilisée dans les livres d'écotoxicologie (Hoffman et al., 2003). Elle a également été reconnue par l'Union Européenne (Commission Directive, 1993).

La bioindication et le biomonitoring donnent des informations sur la qualité de l'environnement mais ne permettent pas d'identifier l'origine des pressions subites par l'environnement. Ces méthodes d'observation sont intégratives des pressions exercées sur l'écosystème et reposent sur l'observation des effets sub-létaux sur les organismes.

- **Bioaccumulation** : est définie comme le procédé par lequel un organisme est capable de concentrer un contaminant dans ses tissus à des teneurs parfois supérieures à celles retrouvées dans le milieu extérieur (air, eau et sol). Ce procédé est le résultat d'un transfert des contaminants du milieu extérieur vers l'organisme, par différentes voies possibles (assimilation par voie trophique, passage par les voies respiratoires, absorption par le derme).

La bioaccumulation est parfois confondue avec la bioconcentration ou ses synonymes techniques qui permettent de la quantifier comme le BAF (Bioaccumulation Factor) et le BCF (Bioconcentration Factor) et avec la biomagnification (ou bioamplification)

- **Bioconcentration** : est définie comme l'accumulation d'un contaminant par un organisme uniquement par la voie dissoute. Ce terme est donc plus restreint et s'applique uniquement aux organismes aquatiques (Gobas and Morrison, 2000).
- **Biomagnification** (ou bioamplification) : est définie comme l'augmentation de la concentration en contaminants dans un organisme suite à la contamination de la chaine trophique. Ce terme est souvent exprimé comme le rapport de la quantité en contaminants dans l'organisme (le prédateur) sur la quantité en contaminants dans la nourriture (la proie) (Zaldivar et al., 2011, Wang and Rainbow, 2008).

Par la suite, nous n'utiliserons que les termes de biodisponibilité (sous entendue dans les milieux pour les organismes), bioaccumulation (ponctuellement le BAF et le BCF également) et les termes de biomonitoring et de biomoniteur.

2.1. Définition et techniques de mesure de la biodisponibilité

2.1.1. Définition de la biodisponibilité

La biodisponibilité d'un métal est définie comme la part de métal dans l'environnement susceptible de se fixer sur les récepteurs d'un organisme et d'être accumulée par ce dernier (Tessier and Campbell, 1987; Mc Geer *et al.*, 2004).

La notion de biodisponibilité dépend à la fois des caractéristiques physico-chimiques du milieu et de la biologie de l'organisme (Wang and Fisher, 1997) (Figure 7).

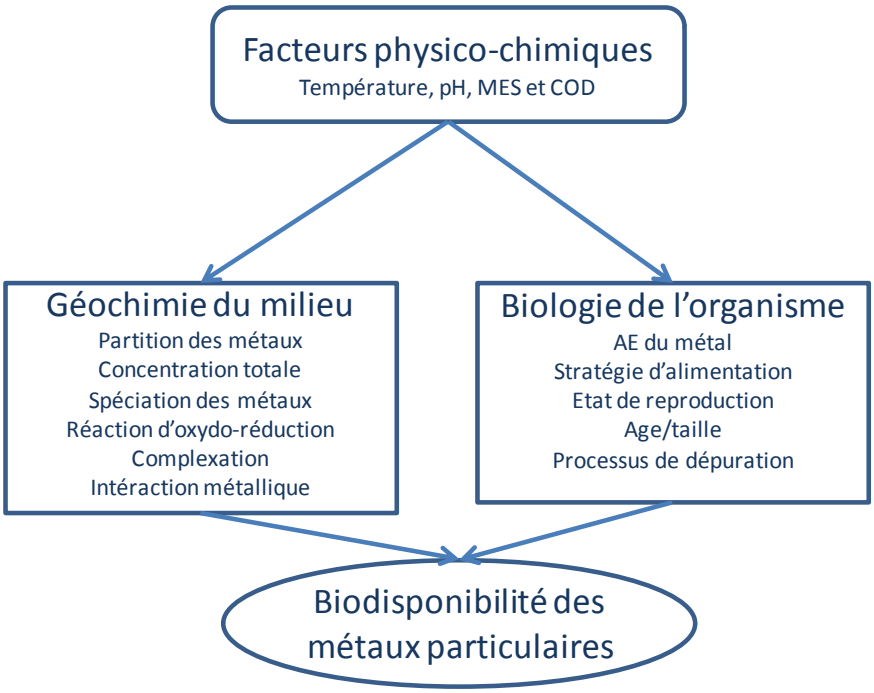


Figure 7 : Schéma des facteurs influençant la biodisponibilité des métaux pour un organisme aquatique (Source : Schéma Inspiré de Wang et Fisher, 1997) avec MES = matières en suspension, COD = Carbone Organique Dissous, AE = Assimilation Efficiency (Efficacité d'assimilation).

2.1.2. Mesures de la biodisponibilité

L'estimation de la biodisponibilité est différente suivant l'organisme considéré (Soto *et al.*, 2011) et suivant la méthode de mesure utilisée.

Il existe des approches chimiques (1) pour mesurer les métaux supposés biodisponibles dans l'eau qui sont alors assimilés à l'ion libre et (2) pour mesurer les métaux particulaires

supposés biodisponibles qui sont assimilés aux métaux facilement extraits (extraction par le protocole du « BCR » ou par extraction séquentielle).

L'approche chimique qui permet d'estimer la biodisponibilité des métaux dissous repose sur l'utilisation d'un échantillonneur passif capable d'échantillonner les ions libres c'est-à-dire les métaux labiles et donc facilement échangeables. En pratique, l'échantillonneur est laissé en contact avec l'eau pour une durée allant de quelques jours à quelques semaines.

Cet échantillonneur permet de mesurer de façon sensible (la limite de quantification diminue par rapport à une mesure chimique directe grâce à l'effet cumulatif), intégrative (dans le temps) et multi-métallique la contamination grâce à la technique du gradient de diffusion en couche mince (DGT) (Davison and Zhang, 1994). L'échantillonneur passif fixe les métaux de façon irréversible sur une résine Chelex après migration au travers d'un gel diffusif. Le fonctionnement de la DGT est similaire au fonctionnement d'une membrane biologique car le passage du métal à travers le gel rappelle le passage à travers la membrane biologique.

En laboratoire, il a été montré, sur des plantes aquatiques, des bryophytes et des invertébrés aquatiques, gammares (Pellet *et al.*, 2009) et daphnies (Tusseau-Vuillemin *et al.*, 2004) que la DGT était un outil efficace de prédiction de la biodisponibilité.

Par contre, *in situ* il est nécessaire d'étudier plus précisément les facteurs d'exposition susceptibles de modifier les observations en laboratoire. Très récemment, des limites à cette évaluation liées à la présence de biofilm sur les DGT ont été mises en évidence (Uher *et al.*, 2012). De ce fait, le biofilm présent à la surface de la DGT peut avoir un impact sur la quantification des métaux qui n'est à l'heure actuelle pas mesuré car il est métal dépendant et est fonction du type de biofilm qui se forme sur la DGT. Par contre, il a été montré que l'interaction entre les métaux labiles et le biofilm n'augmente pas avec la quantité de biofilm, elle existe dès le premier jour d'exposition (Uher *et al.*, 2013).

L'efficacité de prédiction, *in situ*, de la biodisponibilité des métaux par la DGT a besoin d'être démontré de façon plus robuste. A l'heure actuelle, la première étude en mésocosme a permis de faire le lien entre le cuivre labile et sa biodisponibilité pour la mousse *Fontinalis antipyretica* (Ferreira *et al.*, 2013).

Une seule étude *in situ* a été reportée (Sakellari *et al.*, 2012) et une corrélation a été faite pour certains métaux labiles mesurés à l'aide de la DGT, pour le zinc pour *Mytilus galloprovinvialis* et pour le cadmium pour *Pinctada radiata* et *Venus verrucosa*. Les

corrélations sont discutables car elles sont observées pour un couple métal/bivalve et non pour un métal donné sur les 3 organismes testés. Ce type de résultat est prometteur mais serait à confirmer avec un plus grand nombre d'organismes et d'autres espèces. Par exemple il existe des organismes qui bioaccumulent par voie dissoute et par voie trophique. Il semble alors délicat de faire des corrélations entre les métaux labiles de la fraction dissoute et la bioaccumulation pour ces organismes qui bioaccumulent également les métaux particulaires.

Les mesures chimiques qui estiment les métaux particulaires potentiellement biodisponibles donc extraits, pour les organismes, reposent sur des extractions chimiques. Les protocoles de ces extractions ont été développés pour viser un compartiment spécifique (il s'agit des extractions sélectives) ou pour décrire la répartition des métaux dans plusieurs compartiments (il s'agit des extractions séquentielles). Les protocoles d'extractions séquentielles ont été développés pour décrire la spéciation particulaire (section 1.1.2.2).
Dans le cas des extractions séquentielles, il existe différentes procédures, c'est-à-dire utilisant pour chaque phase d'extraction différents acides à différentes concentrations. Les protocoles les plus utilisés sont ceux de Tessier (Tessier and Campbell, 1987) et le BCR (Pueyo *et al.*, 2001) qui est un des protocoles d'extractions séquentielles développé et qui a été validé par le Bureau Communautaire de Recherche en Europe, ce qui lui a valu son nom. Il permet de séparer différentes fractions (Figure 8). Une partie de la phase qualifiée d'échangeable[1], c'est-à-dire contenant les métaux facilement désorbables ou mobiles, a été assimilée aux métaux particulaires biodisponibles (Tessier and Campbell, 1987), avec des réserves. Il a été montré récemment que la phase mobile seule ne suffisait pas à mimer la biodisponibilité. Ainsi, les phases échangeables et réductibles extraites à l'aide du BCR sur des particules en Seine se sont révélées représentative de la biodisponibilité des métaux sur des moules (Bourgeault *et al.*, 2011). Selon d'autres études, c'est l'ensemble des trois phases échangeables, réductibles et oxydables toujours extraites à l'aide du BCR (Larner *et al.*, 2008) qui sont considérées biodisponibles. Enfin, une étude réalisée sur un ver de terre a démontré une corrélation entre la bioaccumulation du cadmium et du cuivre et leur fraction

[1] La phase qualifiée d'échangeable change d'un protocole à l'autre. Nous utiliserons ce terme dans la suite du manuscrit selon la définition du protocole du BCR Cornu et Clozel (2000)

échangeable et une corrélation entre la bioaccumulation du zinc et l'ensemble des fractions échangeables et réduites de ce dernier. (Li *et al.*, 2010).

Ainsi l'évaluation des fractions biodisponibles n'est pas la même selon les études Cette différence est due au fait que la fraction biodisponible dépend de l'organisme étudié, et du type de MES étudié (richesse en fraction organique par exemple) et également du métal (Figure 8) pour un même protocole d'extraction.

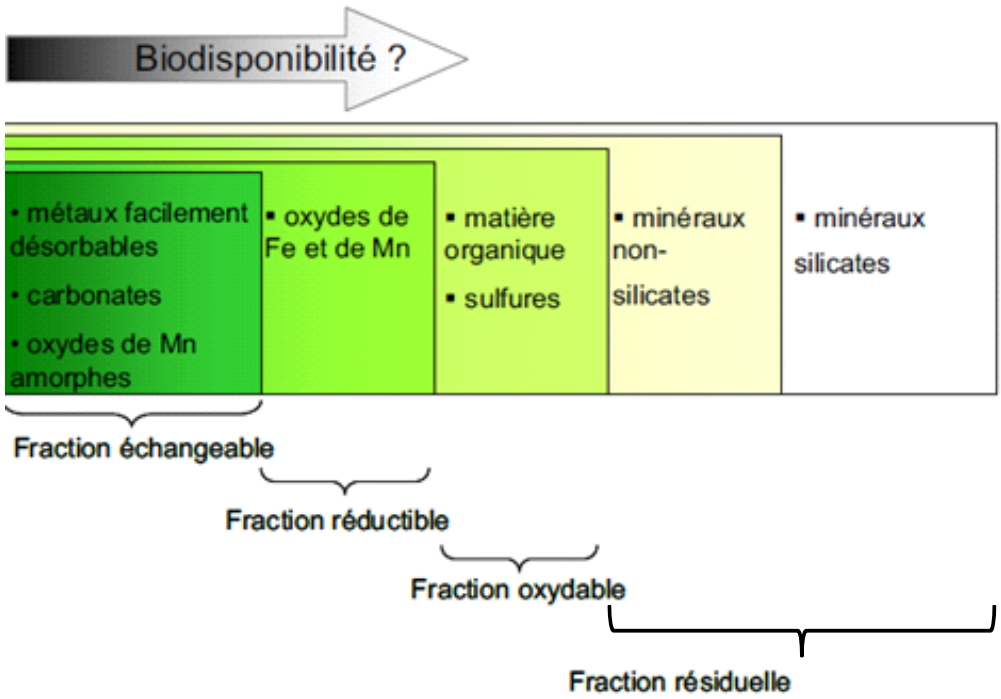


Figure 8 : Schéma présentant les différentes fractions extraites selon différents acides suivant le protocole BCR afin d'évaluer la biodisponibilité qui selon les métaux et organismes est variable (Modifié de Bourgeault, 2010).

Ces méthodologies d'extractions séquentielles sont lourdes à mettre en place. Ces extractions en série sont consommatrices de temps et la répétabilité des expériences est difficile à obtenir (Cornu and Clozel, 2000; Pueyo *et al.*, 2001). Afin d'obtenir une répétabilité très correcte, il est nécessaire de travailler très proprement et surtout d'augmenter le nombre de réplicats afin de lisser les erreurs expérimentales. Ceci demande plus de travail mais permet d'avoir une répétabilité forte, en moyenne supérieure à 80 %, pour 6 métaux, si les résultats des teneurs extraites pendant l'expérience sont comparés aux teneurs théoriques qui auraient dû être extraites sur un échantillon certifié de référence (Priadi *et al.*, 2011a).

Il existe en plus des extractions séquentielles, d'autres méthodes chimiques : les extractions sélectives. Elles reposent sur le même principe que l'extraction séquentielle, mais ne visent à décrire qu'un seul compartiment, par exemple la fraction supposée biodisponible. Afin d'approcher la fraction biodisponible, le pH mesuré dans le tractus des organismes est mimé en ajoutant soit des acides soit directement des fluides digestifs. Les acide utilisés sont soit l'acide chlorhydrique (HCl) ajouté à de l'eau de mer afin d'obtenir des pH de 5 ou de 8 ; représentatifs du tractus (Griscom *et al.*, 2000), soit une solution HCl 0,6 N, soit de l'acide acétique à 25 % (Luoma, 1989), soit de l'HCl 1N, soit de l'hydroxylamine chlorhydrique ($NH_2OH.HCl$) (Tessier and Campbell, 1987). Ces extractions ne définissent pas précisément la biodisponibilité des métaux mais permettent de l'approcher puisqu'il existe des corrélations entre ces métaux extraits et ceux accumulés par les organismes (Luoma, 1989) notamment pour l'acide acétique à 25 % et l'HCl 0,6 N.

Lorsque l'objectif des extractions est d'évaluer la biodisponibilité des métaux particulaires sur différents échantillons sur plusieurs sites, il paraît plus intéressant d'utiliser une extraction sélective qui sera plus rapide à mettre en place. Plus précisément, plusieurs études s'accordent sur le fait que l'extraction à l'aide d'HCl 1N semble la plus pertinente :

- Luoma (1989) a montré sur un bivalve *Scrobicularia plana* pour quatre métaux, Ag, Co, Pb et Zn, une plus forte corrélation entre les métaux extraits avec HCl 1N et la bioaccumulation qu'avec les autres acides utilisés ;
- Fan et Wang (2003) ont montré une corrélation positive entre le cadmium extrait par HCl et le cadmium de la phase échangeable du protocole BCR qui a été démontrée comme une phase théoriquement biodisponible ;
- Enfin, l'extraction avec HCl 1N est aussi un protocole recommandé par le Ministère de l'Environnement du Québec (Canada) afin d'extraire la partie facilement biodiponible des métaux sédimentaires (Québec, 2012).

De plus, l'extraction à l'HCl 1N est une méthode répétable. La variabilité est comprise entre 0 et 35 % (Snape *et al.*, 2004) ou entre 2 et 25 % suivant le métal (Larner *et al.*, 2008).

Ainsi l'extraction à l'aide d'HCl 1N est la méthode idéale pour déterminer la biodisponibilité particulaire des métaux sur plusieurs sites car elle est adaptable en routine pour l'étude de plusieurs échantillons. Elle est facile à mettre en œuvre et plus répétable que le BCR.

Il existe aussi des approches biologiques de l'estimation de la biodisponibilité des métaux qui permettent d'estimer la biodisponibilité dissoute et particulaire en même temps. Les approches reposant sur les organismes, sont plus intégratives car elles intègrent les variations biologiques des organismes mais aussi les variations de contamination et physico-chimiques des milieux considérés (en laboratoire ou sur le terrain). Ces approches, à l'inverse des approches chimiques, sont plus complexes à mettre en place, puisqu'elles reposent sur des expériences de bioaccumulation des métaux par des organismes modèles. De cette façon, la part biodisponible est directement mesurée, puisque la bioaccumulation reflète la concentration biodisponible moyennant un modèle de bioaccumulation. Effectivement, les modèles de bioaccumulation permettent, si l'on connait les teneurs en métaux dans le milieu et si l'on mesure les teneurs bioaccumulées par les organismes, de retrouver les métaux biodisponibles (Griscom *et al.*, 2000; Gourlay *et al.*, 2005; Luoma and Rainbow, 2005; Amiard *et al.*, 2007). Les mesures biologiques semblent plus intégratives que les mesures chimiques. Dans Bourgeault (2011), il a été montré que, selon les sites d'étude, il ne suffisait pas de prendre en compte uniquement les facteurs géochimiques mais aussi les facteurs biologiques (croissance, excrétion, etc.) liés à l'organisme afin d'améliorer la prédiction de la biodisponibilité. De plus, ces mesures permettent de prendre en compte l'interaction des contaminants avec les organismes, car suivant l'organisme considéré et son état physiologique, la biodisponibilité du contaminant peut varier.

Une seconde méthode biologique, qui repose sur le Biotic Ligand Model, consiste à évaluer la réponse toxique d'un organisme vis-à-vis des polluants. Avec cette méthode, la part biodisponible peut être sous-estimée car elle est calculée à partir des polluants qui ont un impact toxique. Or il existe des polluants également bioaccumulés qui n'ont pas d'impact toxique. Suivant la forme prise par les contaminants, fixés par covalence ou fortement adsorbés, ils seront plus ou moins toxiques, voire pas du tout. En effet, certains métaux sont dits non toxiques (Wang and Rainbow, 2006) car ils sont stockés dans les organismes sous forme de granules ou dans des protéines spécifiques de stockage des métaux : les métallothionéines. Ils n'ont pas d'impact toxique sur les organismes, bien qu'ils aient été bioaccumulés.

2.1.3. *Variabilité de la biodisponibilité mesurée*

Le schéma ci-dessous (Figure 9) rend compte de la difficulté à estimer la biodisponibilité. Suivant les approches utilisées, l'estimation de la part des métaux biodisponibles n'est pas la même. Les mesures chimiques permettent de mesurer les fractions mobiles, et donc supposées biodisponibles, des métaux dans les deux phases, dissoute et particulaire, de façon séparée. Par ailleurs, l'approche biologique permet d'estimer, en mesurant la bioaccumulation ou la toxicité des métaux, la part biodisponible totale. Cette estimation est vraie lorsque l'organisme considéré est en contact avec les parts dissoute et particulaire (bivalves) mais ne l'est plus pour les organismes qui n'internalisent pas les particules (biofilms, algues macrophytes) (Soto *et al.*, 2011).

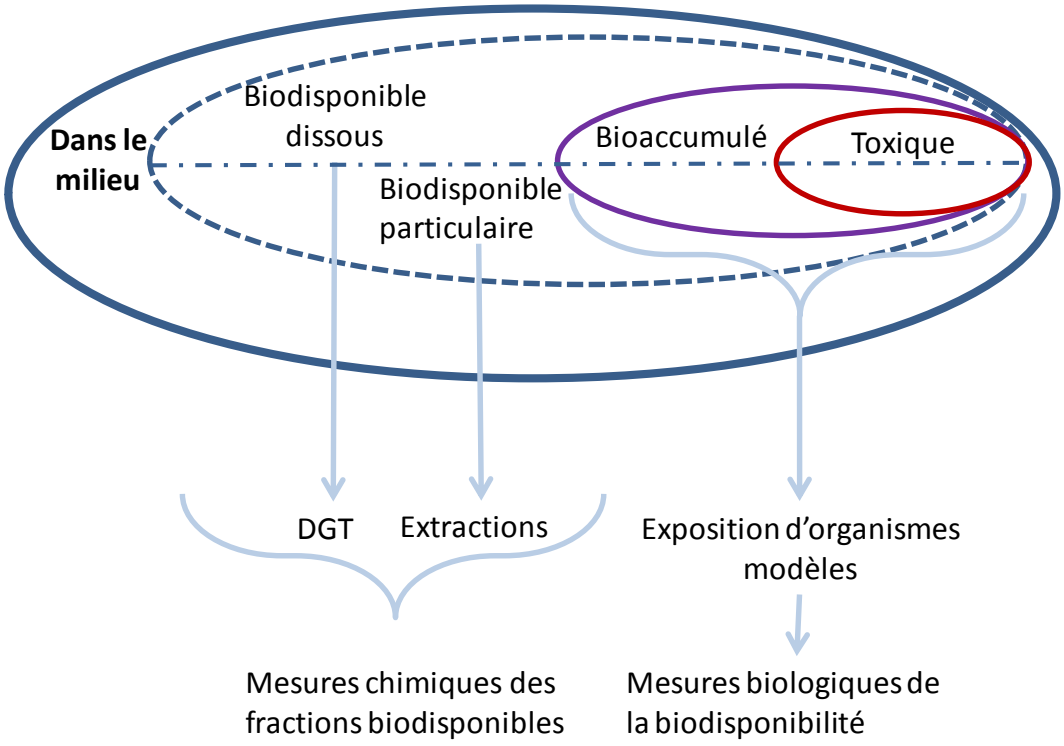


Figure 9 : Schéma conceptuel des métaux dans le milieu et de leur répartition : parts biodisponibles (dissoute et particulaire), bioaccumulées et toxiques, mises en regard avec les techniques de mesure chimique (DGT : Diffusive Gel Technique et extractions) et de mesure biologique.

Il semble que la méthode de mesure biologique de la biodisponibilité reposant sur l'étude de la bioaccumulation par des organismes modèles apporte une image plus proche de la réalité de la biodisponibilité car elle prend en compte la biogéochimie des métaux mais également

la physiologie de l'organisme, elle est plus intégrative des variations (biotiques et abiotiques). L'inconvénient majeur de cette approche, également qualifiée de biomonitoring, est que la prise en compte de la variabilité des organismes complexifie l'estimation de la biodisponibilité. Le choix de l'organisme à utiliser pour évaluer la biodisponibilité dépend de la question posée, si l'on cherche à avoir une idée de la biodisponibilité des contaminants dans leur ensemble (dissous et particulaire) le choix d'un bivalve (*D. polymorpha*), en eaux douces et d'un crustacé (*Procambarus clarkii*) en eaux du littoral est optimal. Mais si l'on cherche à évaluer la biodisponibilité de sédiments fortement contaminés les biofilms seront plus efficaces (Soto *et al.*, 2011).

2.2. Principe du biomonitoring

Le biomonitoring consiste en un suivi des effets et/ou de la contamination des tissus d'organismes modèles en contact avec le milieu naturel. Il permet le suivi de la qualité des milieux aquatiques sur le long terme (plusieurs mois) mais permet également de signaler toute contamination accidentelle ponctuelle (Ramade, 2007). C'est la méthode biologique qui permet d'évaluer la biodisponibilité des contaminants et d'évaluer le risque de la contamination par le suivi des effets biologiques qui s'ensuivent, pour les organismes aquatiques *in situ* (Soto *et al.*, 2011).

Un bon organisme au biomonitoring doit être capable d'accumuler de fortes teneurs en métaux grâce notamment à son faible taux de dépuration et présenter une accumulation proportionnelle à la contamination du milieu. Il doit également être résistant aux contaminants et doit être largement répandu dans le milieu (Soto et *al*., 2011).

Les organismes utilisés pour le biomonitoring sont divers, allant des poissons aux algues benthiques en passant par les bivalves et les biofilms. Il est, de plus, souvent intéressant de travailler avec différents organismes en même temps car ils répondent alors de façon différente à la contamination en fonction de leur mode de vie (filtreurs ou détritivores), de leur place dans la chaine trophique ou de leur mobilité (poissons), immobilité (biofilms). Ainsi, tous les risques potentiels de la contamination métallique sur l'écosystème sont évalués (Luoma and Rainbow, 2008; Soto *et al.*, 2011).

Soto (2011) a d'ailleurs montré, en travaillant avec différents organismes sur un réservoir impacté par une usine rejetant des métaux que, sur seize organismes étudiés comme

biomoniteurs potentiels, le biofilm et la moule sont les biomoniteurs les plus représentatifs de la contamination des milieux. Ils bioaccumulent proportionnellement à la contamination. Cependant il faut noter que cette bioaccumulation proportionnelle n'est pas forcément synonyme d'un effet toxique.

2.3. Biomonitoring avec Dreissena polymorpha

Dreissena polymorpha est un bivalve filtreur. Il possède les caractéristiques d'un bon bioindicateur : (1) il est présent dans tous les milieux (invasif) ; (2) il résiste bien à la contamination ; (3) il bioaccumule très bien les métaux. De plus, sa robustesse en fait une espèce qui s'adapte bien aux manipulations de laboratoire.

Ce bivalve d'eau douce est une espèce avec une coquille zébrée caractéristique. Il mesure entre 15 et 30 mm de long et possède une forme triangulaire caractéristique (Figure 10).



Figure 10 : Photographie de Dreissena polymorpha, moule à zébrures caractéristiques, prise dans un aquarium en laboratoire lors de la thèse.

Il vit fixé ventralement par un byssus, qui est un organe composé de filaments solides en bouquet et qui permet la fixation de l'organisme sur un substrat dur. Il peut s'accrocher aux coques des bateaux et aux ballastes. Ainsi, cette espèce originaire des mers Noire, Caspienne et d'Aral a progressivement envahi tous les écosystèmes d'eau douce d'Europe et d'Amérique du Nord (Tableau 3) par le biais des cargos (Wu *et al.*, 2010). Elle a été observée pour la première fois en Seine par Blanche en 1867.

Tableau 3 : Historique de l'invasion de Dreissena polymorpha en Europe et en Amérique du Nord.

Année de détection	Localisation
1803	Canal Dniepr-Bug
1824	Est de l'Angleterre
1826	Bas Rhin
1833-1867	France
1848	Hongrie
1885-1886	Allemagne
1887	Pays-Bas
1963	Cuba
1985-1989	USA et Canada
1997	Irlande
2001	Espagne

Cette espèce est considérée comme invasive car elle est originaire d'Europe centrale et a envahi nos écosystèmes. Elle est devenue nuisible pour les autres espèces vivant dans les écosystèmes qu'elle colonise et a entrainé des dégâts matériels. Elle a un effet direct sur les autres bivalves, elle est plus compétitive et peut se développer en grappe sur eux (Baker and Levinton, 2003). Elle a aussi des effets indirects car elle modifie le milieu en modifiant le cycle des nutriments (Baker *et al.*, 1998).

Le mode de vie des moules qui se développent en colonies et forment des grappes sur des substrats durs (pierre, canalisation, autres organismes, etc.) est à l'origine de dégâts matériels importants. Elles entraînent le colmatage des installations ce qui occasionne des dégâts et des pertes économiques qui sont chiffrées entre 2 et 5 milliards de dollars dans la région des Grands Lacs (USA) sur la période de la fin des années 90 (Wu *et al.*, 2010). Cependant ces dernières années, l'espèce cause moins de problèmes car sa croissance stagne voire tend à régresser.

Dreissena est un organisme intéressant pour faire du biomonitoring, comme on l'a vu plus haut. Il existe différents types de biomonitoring, passif et actif. Dans le cas du biomonitoring passif, des organismes autochtones sont directement prélevés sur le site d'étude. Dans le cas du biomonitoring actif ou translocation, des populations contrôles sont prélevées de sites de référence, avec peu ou pas de métaux, et sont transférées sur le site d'étude. Les moules

transférées sont enfermées dans des cages pour être disposées sur le site d'étude (Figure 11).



Figure 11 : Photographie des cages à moules.

Ce type de biomonitoring est plus contraignant, logistiquement parlant, que le passif mais il permet d'avoir des populations identiques au départ et ceci limite l'essaimage des populations. Enfin, il permet de développer des programmes de surveillance sur de larges échelles quel que soit le stade de développement local de l'espèce.

En résumé, la biodisponibilité des métaux particulaires peut être approchée soit par une méthode chimique : l'extraction sélective, soit par une méthode biologique : le biomonitoring associé à l'utilisation d'un modèle de bioaccumulation. L'espèce utilisée pour le biomonitoring étant la dreissène qui est ubiquiste, résistante à la contamination, bioaccumulatrice de métaux et en contact avec les particules en suspension du fait de son activité de filtration. Ces deux méthodes ont leurs avantages, la méthode chimique est simple à mettre en place et la méthode biologique est plus intégrative. En termes de limites, la méthode chimique n'est pas très reproductible et la méthode biologique est lourde à mettre en place et complexe à interpréter. Ces méthodes méritent néanmoins d'être développées puisqu'une meilleure compréhension de la biodisponibilité des métaux particulaires permettra d'améliorer les modèles de prédiction de la bioaccumulation de ces derniers.

3. Modèles de bioaccumulation

3.1. Voies de bioaccumulation

Pour un organisme filtreur aquatique, la bioaccumulation se fait selon deux voies : (1) la voie dissoute, c'est-à-dire par contact des branchies par exemple avec le milieu dissous, (2) la voie trophique, c'est-à-dire par filtration de la nourriture constituée des particules en suspension (Wang and Fisher, 1999b).

Les métaux dissous pénètrent dans l'organisme filtreur au moment où celui-ci filtre pour respirer. Les métaux sont alors absorbés par les surfaces directement en contact avec le milieu extérieur, comme les cellules de l'épithélium branchial.

Les métaux associés à la phase particulaire seront d'abord ingérés puis lors de la digestion des particules, les métaux seront alors, soit solubilisés dans le tube digestif, soit directement transférés par endocytose dans les cellules de l'épithélium de la paroi du tube digestif.

Afin de formaliser cette bioaccumulation, il existe différents modèles qui reposent sur (1) la compartimentation des contaminants définie à l'équilibre entre le milieu et l'organisme, comme le BAF (Bioaccumulation Factor) (ratio entre la concentration des contaminants dans les tissus et dans l'eau filtrée) ou le BSAF (Biota-Sediment Accumulation Factor) (ratio entre la concentration des contaminants dans les tissus et dans les sédiments) (Bervoets *et al.*, 2005a); (2) les modèles de toxicité qui modélisent l'étape d'internalisation de l'ion libre comme le FIAM (Free-Ion Activity Model) et un modèle plus intégratif de type BLM (Biotic Ligand Model) et (3) un modèle qui prend en compte l'aspect biodynamique de la contamination des organismes et raisonne en termes de flux d'entrée et de sortie des contaminants dans l'organisme. Il existe un modèle proposé par Luoma (2005). Ce modèle est le plus simple parmi les modèles biodynamiques.

Il a été montré récemment que les modèles BAF et BSAF ne permettent pas, pour la dreissène, de relier la contamination métallique du milieu (dissous et particulaire) à celle des organismes (Bervoets *et al.*, 2005a). Nous allons donc nous intéresser aux modèles de toxicité puis au modèle biodynamique.

3.2. Mécanismes de bioaccumulation et premiers modèles de bioaccumulation

3.2.1. FIAM et BLM modèle

La traversée de la membrane plasmique est l'étape limitante de l'internalisation des métaux. La nature hydrophobe de la membrane rend l'internalisation des métaux, qui sont majoritairement hydrophiles, difficile. L'internalisation des métaux va se faire par l'intermédiaire d'une protéine. L'ion métallique va devoir, selon le modèle de l'ion libre (le FIAM) (Morel, 1983), traverser la membrane après fixation sur une protéine spécifique qui se trouve dans la membrane et qui va permettre l'internalisation (Figure 12) (Batley *et al.*, 2004).

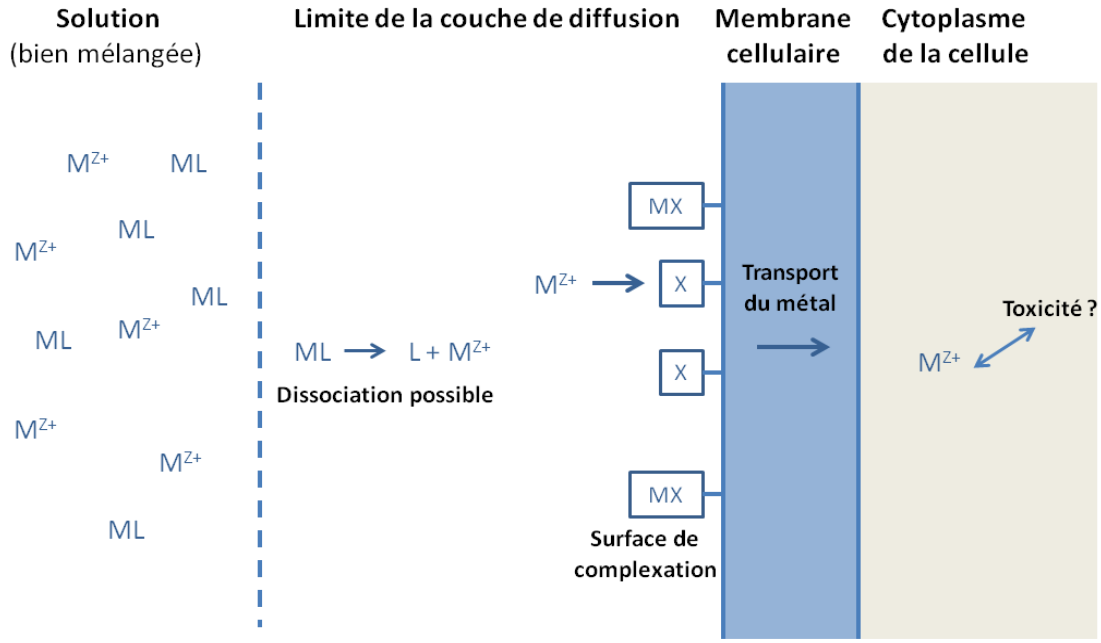


Figure 12 : Schéma de la modélisation de l'étape d'internalisation des métaux par les cellules des organismes sur laquelle repose le FIAM et le BLM (Source : Modifié de Batley et al (2004))

Le modèle du ligand biologique ou le BLM est un modèle de biodisponibilité des métaux dissous. Il repose sur la même approche mécanistique que le FIAM mais prend en compte les interactions qu'il peut y avoir entre le cation métallique et des cations comme le calcium ou magnésium susceptibles de se fixer sur les mêmes récepteurs. Il prend également en compte les complexes inorganiques et organiques dont la formation rend les métaux indisponibles pour se fixer sur les récepteurs métalliques.

Le développement du BLM fait suite à des études qui cherchent à comprendre comment les métaux dissous biodisponibles interagissent avec les organismes et comment ils les affectent (Campbell *et al.*, 2002; De Schamphelaere and Janssen, 2002).

Ces modèles de bioaccumulation et de toxicité permettent finalement de modéliser la biodisponibilité. Ils reposent sur plusieurs hypothèse simples (Campbell *et al.*, 2002) : (1) la traversée de la membrane est l'étape limitante : ainsi le métal est en équilibre avec les ligands biologiques et les ligands du milieu ; (2) il n'y a pas de saturation des sites de complexation; (3) la réponse biologique de l'organisme est proportionnelle à la quantité de métal complexé qui est elle-même proportionnelle à la quantité de métal libre ; (4) la nature de la membrane n'est pas modifiée pendant la complexation du métal avec le ligand de la membrane.

Des études ont cependant démontré que certaines de ces hypothèses n'étaient pas correctes.

La membrane d'une cellule a la capacité de se réorganiser, notamment pour contrôler les flux d'entrée d'éléments essentiels au fonctionnement de la cellule, dont certains métaux font partie (Zn et Cu notamment). Il a aussi été montré récemment que l'affinité du métal pour son ligand pouvait diminuer après pré-exposition au métal ; c'est le cas de truites exposées au cuivre (Kamunde *et al.*, 2002). Ce changement d'affinité s'explique en réalité par une variation des types de sites recrutés par l'organisme pour la fixation du métal essentiel. Lorsqu'il y a eu pré exposition les sites à forte affinité et à faible capacité sont déjà occupés. De ce fait, il reste uniquement les sites à faible affinité, on parle de saturation progressive.

Par ailleurs, les constantes du BLM ont souvent été déterminées lors de tests de toxicité aigüe, c'est-à-dire lors d'expositions courtes des organismes à de fortes teneurs monométalliques, alors que dans l'environnement, les organismes sont plus souvent exposés à de faibles teneurs multi-métalliques sur du long terme. Ainsi l'estimation des constantes peut être biaisée d'autant plus qu'il a été montré que lorsque les teneurs en métaux fluctuent, les processus d'internalisation peuvent être régulés. Par exemple, pour de fortes teneurs en Zn, le Zn va autoréguler sa bioaccumulation en inactivant la protéine transporteur qui permet son entrée dans la cellule (Gitan and Eide, 2000). De plus, la toxicité d'un métal lorsqu'il agit seul ou en cocktail est certainement différente car il y a

potentiellement des effets synergiques ou antagonistes dû à l'effet cocktail (Lebrun *et al.*, 2011).

De plus, l'hypothèse qui a été faite pour ces modèles et qui statue que les métaux sont à l'équilibre avec les ligands de la membrane et ceux dans le milieu n'est, dans la réalité, pas systématique. Il arrive que ce soit le contraire, c'est-à-dire que ce soit la diffusion du métal vers la membrane qui soit limitante et non l'internalisation. Effectivement, lorsque les teneurs en métaux dans le milieu sont très faibles, le flux d'entrée n'est plus fonction de la capacité du métal à se lier à la membrane mais à sa capacité de diffusion. Ceci a d'ailleurs été observé pour des algues exposées à de faibles teneurs en zinc (Hassler and Wilkinson, 2003).

Enfin, le BLM ne considère que la biodisponibilité des métaux dissous en faisant l'hypothèse implicite que les métaux apportés par la nourriture et donc ingérés ne provoquent pas d'effet. Or il a été montré que des organismes aquatiques accumulaient des métaux par voie trophique. Cela a été observé sur des bivalves (Roditi and Fisher, 1999) et aussi sur des daphnies (Guan and Wang, 2006), par exemple. Un modèle cinétique, le modèle biodynamique, prend en compte cette voie de contamination.

3.2.2. Mécanismes de bioaccumulation par voie trophique

Les moules sont des bivalves, elles filtrent les particules en suspension (algues, particules minérales, matières organiques) véhiculées par le milieu.

Il a été montré qu'il existe une sélection des particules lors de la filtration en fonction de leur taille. Si les particules peuvent passer par le siphon, elles sont filtrées. C'est pourquoi les particules comprises entre 0,7 µm et 1,2mm de diamètre peuvent être filtrées par des individus compris entre 9 et 22 mm de long (Horgan and Mills, 1997). Il existe ensuite une sélection avant l'ingestion des particules. Cette seconde sélection a lieu au niveau des cils des branchies et grâce aux palpes qui encadrent la bouche. Elle permet d'évacuer les particules les plus grosses sous forme de pseudo-fèces. (Nalepa and Schloesser, 1993). Les particules conservées sont ensuite ingérées, elles passent dans l'estomac puis sont digérées et donc assimilées au niveau de l'intestin. Les particules qui ne sont finalement pas assimilées sont excrétées sous forme de fèces (Nalepa and Schloesser, 1993).

Pour les moules, la digestion est à deux vitesses. Elle est soit rapide (2-4 h) au niveau de l'intestin, soit plus lente au niveau de la glande digestive (17h-50h) (Figure13).

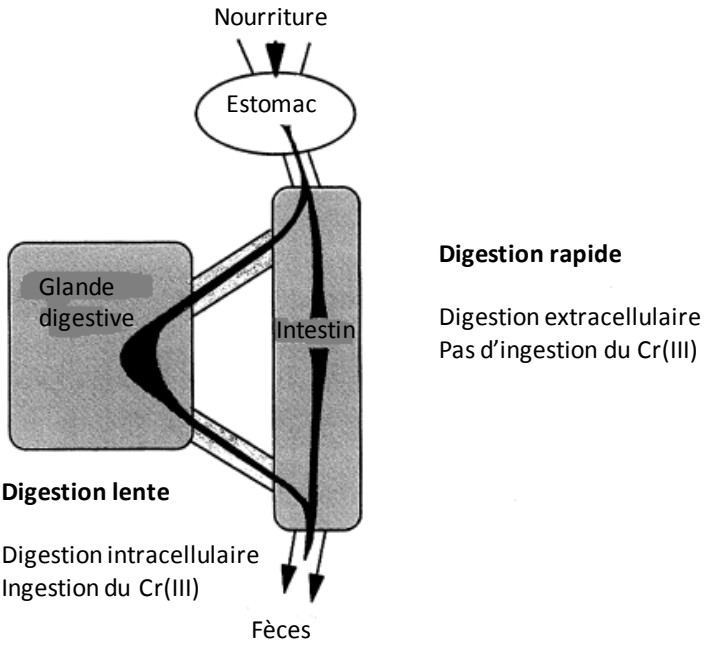


Figure 13 : Schéma de la digestion à deux vitesses chez les bivalves.

La digestion complexe des particules est due à un tri des particules au niveau de l'intestin. Certaines particules sont orientées vers la glande digestive pour une digestion plus longue (Meyer *et al.*, 2005). Ce tri est fonction de la taille et de la quantité des particules mais aussi de leur qualité nutritive, c'est-à-dire de leur richesse en matière organique ou de leur facilité à être digérées. Lors de la digestion des algues par exemple, la fraction cytosolique et la membrane sont séparées. Les restes de membrane sont excrétés sous forme de fèces (ce phénomène est mesuré et évalué grâce à la constante d'excrétion k_e) alors que la fraction cytosolique est endocytée par les cellules de la glande digestive. Ainsi, l'efficacité d'ingestion des métaux par les organismes aquatiques dépend de leur répartition au sein des cellules algales (Reinfelder and Fisher, 1991). En effet, plus la proportion de métal présente dans le cytoplasme des cellules algales est importante, plus l'assimilation par les organismes biomoniteurs est élevée (Figure 14).

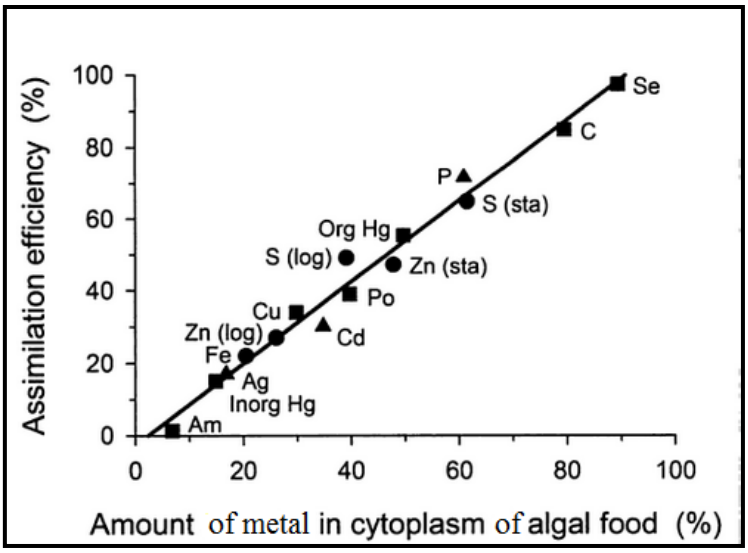


Figure 14 : Corrélation entre les teneurs en métaux dans le cytoplasme de diatomées et leur assimilation par des crustacés aquatiques (copepodes, invertébrés vivants dans les mers et eaux douces). (Source : Meyer et al., 2005).

Sur un bivalve marin, la moule *Mytilus edulis,* nourri de diatomées faiblement contaminées en métaux, la digestion rapide entraine une assimilation moins forte des métaux comparée à la voie lente, (Wang *et al.*, 1995).

Historiquement, la bioaccumulation par voie trophique a été moins étudiée que la voie dissoute. Néanmoins ces dernières années, la compréhension de cette seconde voie de bioaccumulation a été motivée notamment par les réglementations qui nécessitent de comprendre plus précisément les mécanismes physiologiques de bioaccumulation afin de comprendre l'impact des polluants sur les organismes. Ainsi, la mise en place de nouveaux protocoles utilisant des isotopes non radioactifs, et donc techniquement plus simple de mise en œuvre, a permis d'évaluer de façon plus fine cette voie de bioaccumulation (Wang and Fisher, 1999a). Enfin, la formalisation de nouveaux modèles de bioaccumulation prenant en compte cette voie (Wang *et al.*, 1996; Luoma and Rainbow, 2005) a permis de mettre en regard cette voie trophique par rapport à la voie dissoute et de la quantifier. Cette quantification a permis de mettre en évidence la part non négligeable de cette voie dans l'accumulation des métaux.

3.3. Le modèle biodynamique

3.3.1. Principe

Le modèle, le plus couramment choisi, car c'est le modèle biodynamique le plus simple d'utilisation, est le modèle biodynamique de Luoma et Rainbow (2005). Il raisonne en termes de flux d'entrée et de sortie de contaminants vis-à-vis des organismes et prend en compte l'accumulation des contaminants via le contact direct (voie dissoute) et via l'ingestion de nourriture contaminée (voie trophique).

C'est un modèle toxico-cinétique du premier ordre qui décrit, de façon simple, l'accumulation de métaux dans les organismes. L'accumulation totale est la somme d'une accumulation par voie dissoute et par voie trophique et d'une élimination de ces métaux par excrétion (k_e) et par dilution dans les tissus par croissance des organismes (g) (Luoma and Rainbow, 2005).

L'équation du modèle est la suivante :

$$\frac{dC_{org}}{dt} = k_u \cdot C_d + AE \cdot IR \cdot C_p - (k_e + g) \cdot C_{org} \quad (1)$$

Avec :

C_{org} : concentration en métaux dans l'organisme ($\mu g.g^{-1}$)

k_u : constante cinétique d'assimilation par voie dissoute ($L.g^{-1}.j^{-1}$)

C_d : concentration en métaux dans la phase dissoute ($\mu g.L^{-1}$)

AE : efficacité d'assimilation (%)

IR : taux d'ingestion ($g.g^{-1}.j^{-1}$)

C_p : concentration en métaux dans la phase particulaire ($\mu g.g^{-1}$)

k_e : la constante ou taux d'élimination (j^{-1})

g : taux de croissance (j^{-1})

t : temps (j^{-1})

Les constantes du modèles sont indépendantes des concentrations du milieu en métaux.

A l'équilibre, la concentration en métal dans l'organisme $C_{org\text{-}équilibre}$ ($\mu g.g^{-1}$) est la suivante :

$$C_{org-équilibre} = \frac{k_u \cdot C_d + AE \cdot IR \cdot C_p}{(k_e + g)} \quad (2)$$

Pour la majorité des métaux traces, l'hypothèse que les constantes d'élimination sont comparables a été faite, que l'accumulation ait eu lieu par voie trophique ou dissoute. Cette hypothèse a été vérifiée avec Am, Cd, Co, Se et Zn sur des bivalves marins (Wang *et al.*, 1996; Roditi and Fisher, 1999).

Des études de la bioaccumulation des métaux par des invertébrés aquatiques ont montré que le modèle de bioaccumulation prédit de façon assez fiable l'accumulation des métaux par les organismes. L'efficacité de prédiction est comprise entre 50 et 87 % selon les études. Une prédiction fiable est une valeur comprise entre les courbes de déviation d'un rapport 2 par rapport à la courbe optimale 1 :1 pour laquelle valeurs prédites par le modèle et valeurs mesurées dans l'organisme sont identiques.

Une étude (Luoma and Rainbow, 2005) a synthétisé les résultats de différents travaux, ce qui donne pour 7 métaux différents (Ag, Cd, Co, Cu, Cr, Se et Zn), 9 organismes aquatiques (4 bivalves filtreurs marins et d'eau douce, 1 bivalve fouisseur, 3 crustacés et 1 poisson marin) répartis sur 5 pays : Angleterre, Chine (Hong Kong), Etats-Unis (San Francisco et New York), Québec et un pays méditerranéen, une efficacité de prédiction du modèle en moyenne de 88 % (tous les organismes et métaux compris).

Une étude qui s'intéresse uniquement à la moule zébrée sur des sites aux Etats-Unis observe des efficacités de prédiction légèrement inférieures comprises entre 60 et 73 % pour Ag, Cd, Hg et Se (Roditi *et al.*, 2000). Toujours avec la moule zébrée, si certains paramètres sont définis *in situ*, comme l'efficacité d'assimilation (AE), la prédiction du modèle sur des sites le long de la Seine est supérieure avec des efficacités de prédiction comprises entre 80 et 85 % pour Cd, Cr, Ni, Cu et Zn (Bourgeault *et al.*, 2011). Sur d'autres sites sur le Rhin et sur la Meuse (Le *et al.*, 2011) avec deux espèces de moules dreissènes (*Dreissena polymorpha* et *Dreissena rostriformis burgensis*) pour Mn, Fe, Co, Ni, Se, Cd et Pb les efficacités de prédiction ne dépassent pas 76 % pour *Dreissena polymorpha* et pour les autres métaux elles sont inférieures à 51 %.

Les différences d'efficacité de prédiction observées pour un même organisme et pour un même métal, sur différents sites et selon différentes expériences peuvent s'expliquer par le fait que pour un même organisme les paramètres d'entrée du modèle utilisés (k_u, k_e et IR notamment) ne sont pas les mêmes. Il serait nécessaire de normaliser la détermination de

ces paramètres afin de pouvoir comparer efficacement les résultats de bioaccumulation entre les différents travaux de recherche.

3.3.2. Evaluation des paramètres de la voie dissoute et de l'élimination

Les modes opératoires de la détermination des constantes d'assimilation par voie dissoute (k_u) et d'élimination (k_e) sont toujours, à notre connaissance, réalisés en laboratoire (Wang *et al.*, 1996). Une exposition courte d'organismes dans de l'eau contaminée en métaux permet la détermination de la constante d'assimilation par voie dissoute. Effectivement, le temps court permet de minimiser les phénomènes d'excrétion et de croissance des organismes afin d'obtenir la relation simplifiée suivante :

$$\frac{dC_{org}}{dt} = k_u \cdot C_d \qquad (3)$$

Il est important d'assurer une concentration constante en métaux pendant la manipulation afin de ne pas biaiser la détermination des constantes d'assimilation. Puis après exposition, les tissus mous des organismes (pour les bivalves, organismes à coquille) sont analysés pour déterminer les teneurs en métaux accumulés en fonction du temps. La pente obtenue correspond à l'influx ($\mu g.g^{-1}.j^{-1}$). Ensuite, en divisant l'influx par la concentration en métal dissous, la constante k_u est obtenue. En calculant l'influx pour différentes concentrations d'exposition, l'estimation de la constante k_u est améliorée car elle est moyennée suivant les concentrations initiales d'exposition en métaux. Elle correspond alors à la pente entre l'influx en fonction de la concentration d'exposition (Figure 15).

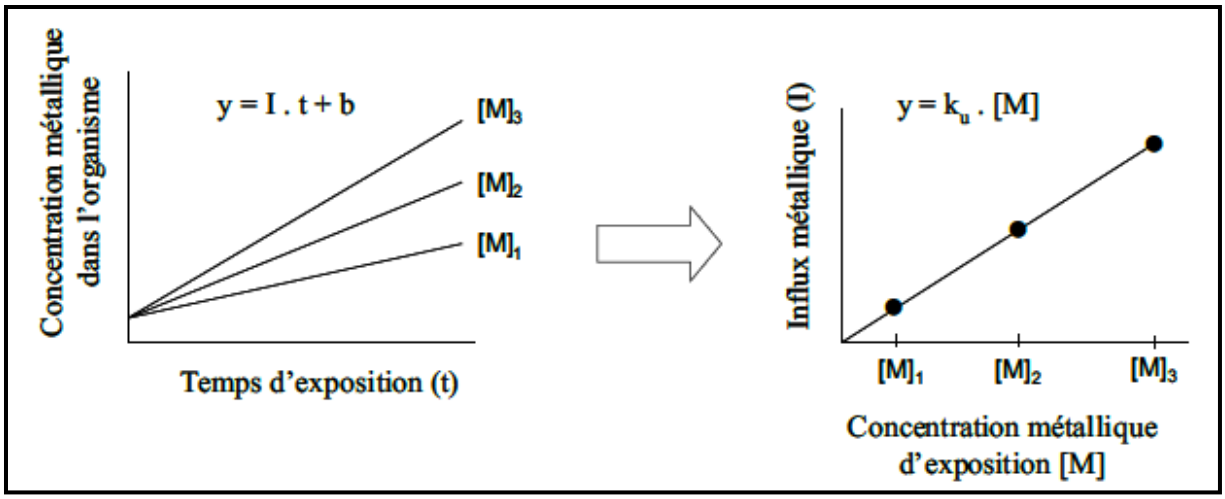


Figure 15 : Méthode de calcul de la constante d'accumulation par voie dissoute suite à plusieurs cinétiques d'accumulation pour différentes teneurs d'exposition en métaux (SOURCE : Thèse Adeline Bourgeault, 2010).

La détermination de la constante d'élimination fait suite à la phase d'exposition (que ce soit par phase dissoute ou trophique). Les organismes sont placés dans un milieu non contaminé et la concentration de leur tissu est suivie régulièrement, durant toute la dépuration. Les organismes sont correctement alimentés (*ad libidum*). Leurs fèces (cas des moules) sont récoltées en totalité et au fur et à mesure de l'excrétion pour éviter toute recontamination des moules. L'eau du milieu de dépuration est régulièrement renouvelée. La cinétique de dépuration, de la forme e^{-ket}, permet de calculer la constante d'élimination par une régression non linéaire ou en déterminant la pente de $\ln C_{org,}$ le logarithme de la concentration en métaux dans l'organisme, en fonction du temps.

D'après mes recherches, il n'existe pas, à l'heure actuelle, d'études réalisées *in situ* pour déterminer les constantes d'assimilation et d'excrétion.

Ainsi, les constantes k_u et k_e obtenues en laboratoire sont valables pour la majorité des systèmes étudiés mais peuvent être discutables pour plusieurs raisons. Les constantes k_u, notamment, obtenues pour un couple métal-organisme le sont généralement pour un seul type de milieu (caractéristiques physico-chimiques de la solution d'exposition) et il se peut qu'elles varient selon l'environnement. Les constantes k_e, obtenues en laboratoire, sont calculées dans des conditions optimales pour les organismes qui sont nourris *ad libidum*.

Les constantes k_u sont obtenues pour un couple métal-organisme, mais la constante k_u calculée n'est alors pas unique. Effectivement, il a été observé pour un même métal et pour

un même organisme, pour la dreissène par exemple, des variations de la constante k_u d'un facteur 2 pour l'argent : la constante k_u est comprise entre 3,56 et 7,19 $L.g^{-1}.j^{-1}$, voire 3 pour le chrome III : la constante k_u est comprise entre 0,82 et 2,10 $L.g^{-1}.j^{-1}$. Cette variation est certainement induite par les différents types de particules fournies aux moules (Roditi and Fisher, 1999). D'après ce résultat et puisque la qualité des particules impacte la constante de la voie dissoute, il est légitime de faire l'hypothèse que chez les bivalves la voie dissoute et la voie trophique ne sont pas indépendantes l'une de l'autre.

En laboratoire, les organismes étant nourris *ad libidum,* l'évaluation de la constante k_e est potentiellement maximisée. Il a été montré en laboratoire et *in situ* que lorsque les concentrations en particules augmentaient, au-delà d'un certain seuil, les bivalves avaient tendance à produire plus de pseudo-fèces (Widdows, 1978; Bayne *et al.*, 1989; Bayne *et al.*, 1993). Cette augmentation peut être corrélée à une augmentation de l'excrétion et donc de la constante k_e. Elle peut aussi être minimisée en laboratoire si les particules ne sont pas apportées en trop grosse quantité et si la qualité des particules est très bonne ; les moules vont alors tout assimiler et peu excréter.

Il est également nécessaire de déterminer le taux de croissance (g). Pour les moules, si l'exposition est relativement courte (inférieure à 15 jours), les organismes risquent peu de prendre ou de perdre du poids (sauf en période de ponte). Il suffit de mesurer l'évolution de leur poids lors de leur exposition. L'indice de condition (IC) qui est le rapport du poids sec des tissus sur le poids sec total (tissus et coquille) est évalué avant et après l'exposition et s'il a évolué, le taux de croissance est calculé à partir de cette différence de poids divisé par le temps d'exposition.

Enfin, pour comparer des données de bioaccumulations des organismes à différentes périodes de l'année, il existe un modèle d'allocation énergétique (DEB : Dynamic Energy Budget) qui permet de prédire la croissance des organismes en fonction de la nourriture disponible et de la température (Bodiguel *et al.*, 2009; Zaldívar *et al.*, 2011).Il est cependant nécessaire de bien quantifier la qualité nutritionnelle de la nourriture. Cet outil associé au modèle de bioaccumulation pourrait renforcer son efficacité de prédiction. Le modèle DEB associé au modèle de bioaccumulation pourrait améliorer la constante g du modèle biodynamique en la reliant aux conditions environnementales du site considéré. Ce modèle suppose que la croissance, entre autres paramètres d'un organisme est impactée par les

contaminants présents dans le milieu. Ce modèle a été développé pour des bivalves de mer *M. galloprovincialis* et *C. gigas* mais pas encore pour la dreissène.

Ces constantes (k_u et k_e), déterminées en conditions contrôlées en laboratoire, sont supposées spécifiques du couple organisme-métal et indépendantes des conditions environnementales. Il a été montré en réalité que ces paramètres sont influencés par des facteurs abiotiques (exemple de la température) (Gossiaux *et al.*, 1998) et biotiques (exemple du taux de filtration (FR)) (Bourgeault *et al.*, 2012).

3.3.3. Facteurs de contrôles de la biodisponibilité des métaux dissous

De nombreuses études ont mis en évidence l'influence de la température (Gossiaux *et al.*, 1998; Pellet *et al.*, 2009), de la matière organique (Roditi *et al.*, 2000; Voets *et al.*, 2004; Pellet *et al.*, 2009), de l'alcalinité et de la dureté (Komjarova and Blust, 2009b; Bourgeault *et al.*, 2010a; Bourgeault *et al.*, 2012) et de l'interaction entre métaux (Komjarova and Blust, 2008; Bourgeault *et al.*, 2010a) sur la biodisponibilité des métaux dissous.
Il a également été montré que des paramètres physiologiques comme le taux de filtration (FR) pour les bivalves, peuvent impacter la bioaccumulation par voie dissoute (Bourgeault *et al.*, 2010a; Bourgeault *et al.*, 2012).

Dans le cas de la bioaccumulation par voie trophique, il semble que ces paramètres influencent également la biodisponibilité des métaux particulaires avec notamment un impact plus important du taux de filtration (FR). En effet, la bioaccumulation par voie trophique résulte de l'alimentation des organismes, comme les bivalves qui filtrent pour se nourrir. Les phénomènes de sélection de nourriture, pour les moules en général mais aussi pour *D. polymorpha* (Baker and Levinton, 2003; Vanderploeg *et al.*, 2009) ou de digestions complexes peuvent également jouer sur la biodisponibilité.

Afin de formaliser la bioaccumulation des métaux par les organismes aquatiques, il existe des modèles qui reposent sur (1) la notion d'équilibre entre les métaux dans le milieu et dans les organismes comme les facteurs de bioaccumulation et de bioconcentration (BAF et BSAF) et des modèles de toxicité : le Modèle de l'Ion Libre et le Biotic Ligand Model, ce dernier étant plus intégratif que le premier et (2) la prise en compte des flux de métaux entre le milieu et l'organisme, des flux entrant et sortant comme le modèle biodynamique de Luoma et Rainbow.

Ce dernier modèle est le plus intéressant car il est assez simple a manipuler et prend en compte la dynamique du transfert des métaux du milieu vers les organismes, la physiologie des organismes et la biodisponibilité des métaux à la fois dissous et particulaires.

Cependant, certaines des constantes biodynamiques du modèle qui sont dépendantes du couple métal/organisme restent encore à définir ou à affiner notamment afin de prendre systématiquement en compte, sur ces constantes, l'influence des paramètres abiotique (température, pH) et biotique (FR). L'évaluation approximative de ces constantes peut entrainer des biais dans la prédiction de la bioaccumulation des métaux par les organismes. Ces biais semblent également liés à la difficulté rencontrée dans l'évaluation de la biodisponibilité des métaux particulaires.

4. Evaluation de la biodisponibilité particulaire chez les invertébrés aquatiques : état de l'art

L'évaluation des paramètres influençant la bioaccumulation des métaux par voie trophique chez les dreissènes a été moins étudiée que la bioaccumulation par voie dissoute. En conséquence, l'étude de l'état de l'art est élargie à l'ensemble des invertébrés aquatiques.

4.1. Définition des constantes qui définissent la biodisponibilité particulaire

Afin d'estimer la biodisponibilité des métaux particulaires, la détermination de la constante de la voie trophique, l'efficacité d'assimilation ou Assimilation Efficiency (AE) du modèle biodynamique, est une approche qui repose sur une bioaccumulation des contaminants par des organismes, le plus généralement en laboratoire. Il est également nécessaire d'évaluer le

taux d'ingestion ou Ingestion Rate (IR) car l'efficacité d'assimilation (AE) dépend de ce dernier.

L'efficacité d'assimilation est définie comme le pourcentage de métaux assimilés, comparativement à la quantité ingérée par l'organisme.

Le taux d'ingestion ($g.g^{-1}_{poids\ sec\ organisme}.j^{-1}$) est défini comme la quantité de particules ingérées par les organismes par poids sec de l'organisme et par unité de temps. Pour les bivalves, il est défini comme le produit du taux de filtration (FR) ($L.g^{-1}_{poids\ sec\ organisme}\ j^{-1}$) et de la concentration en matières en suspension (MES) ($g.L^{-1}$) (Mendonça *et al.*, 2011). Ceci, si les hypothèses suivantes sont faites (1) aucune particule n'est excrétée sous forme de pseudo-fèces et (2) 100 % des particules filtrées sont ingérées. Le taux d'ingestion se mesure généralement en laboratoire ; par la méthode du pulse-chase et également par une mesure du taux de filtration en laboratoire (méthode qui ne sera pas forcément développée car elle est proche de la mesure *in situ*), et également *in situ* (détaillé dans la partie 4.3).

Le taux de filtration correspond au volume pompé par moule, par unité de temps. Il s'exprime en $L.\ g^{-1}_{poids\ sec\ organisme}\ j^{-1}$. Il est parfois appelé taux de pompage (Riisgård, 2001). Il se définit également comme un volume débarrassé de toutes ses particules par moule et par unité de temps (Winter, 1978). Dans ce cas-là, il est équivalent au taux d'épuration = clearance rate (CR). Il se définit aussi comme la quantité de particules filtrées par moule et par unité de temps $g.g^{-1}_{poids\ sec\ organisme}.j^{-1}$.

Le taux d'épuration est le calcul des volumes débarrassés de toutes particules par unité de temps par moule : unité, $L.g^{-1}\ j^{-1}$. Il est important de noter que les taux d'épuration et les taux de filtration sont nommés différemment mais sont parfois calculés de la même façon (Reeders and Bij de Vaate, 1990; Elliott *et al.*, 2008).

Ainsi, la différence entre le taux de dépuration et le taux de filtration n'est pas toujours très claire et les méthodes de calcul de ces valeurs ne sont pas toujours homogènes (Riisgård, 2001)

Les hypothèses faites pour le calcul du taux d'ingestion en utilisant le taux de filtration et les teneurs en matières en suspensions sont les suivantes : aucune particule n'est excrétée sous forme de pseudo-fèces et 100 % des particules filtrées sont ingérées, ne sont pas toujours vérifiées. Les bivalves sélectionnent la nourriture filtrée et rejettent les particules

indésirables avant même de les avoir ingérées sous forme de pseudo-fèces (Nalepa and Schloesser, 1993).

Dans ce travail de thèse, il sera intéressant de s'appliquer à montrer que la quantité de pseudo-fèces produite par sélection des particules filtrées n'a pas d'impact sur le calcul du taux d'ingestion qui utilise le taux de filtration et la concentration en matières en suspension.

4.2. En laboratoire

4.2.1. Pulse chase feeding

La méthode du pulse-chase feeding permet d'estimer l'AE et l'IR en laboratoire, et donc en conditions contrôlées. Elle consiste à exposer les organismes pendant une période courte (pulse) à de la nourriture contaminée, puis tout juste après, à de la nourriture non contaminée pendant une période longue (chase). La période courte doit être inférieure au temps de transit des métaux pour les bivalves, afin d'éviter une recontamination des organismes par les fèces. La période de pulse avec des isotopes radioactifs est de 30 min pour des bivalves comme *D. polymorpha* (Roditi and Fisher, 1999) et *M.edulis* (Wang *et al.*, 1996). Cette période est légèrement plus longue lorsque des isotopes stables sont utilisés, elle est de 2h (Bourgeault, 2010). Cependant elle ne doit pas être plus longue afin d'éviter la contamination du milieu par les fèces contaminées. La période longue de dépuration (de 72h à 96h pour *D. polymorpha* et *M. edulis* respectivement) (Wang *et al.*, 1996; Roditi and Fisher, 1999) permet de suivre le passage de la nourriture contaminée à travers le système digestif des organismes. Le suivi se fait par mesure des métaux dans les tissus des organismes et dans leurs fèces (Figure 16).

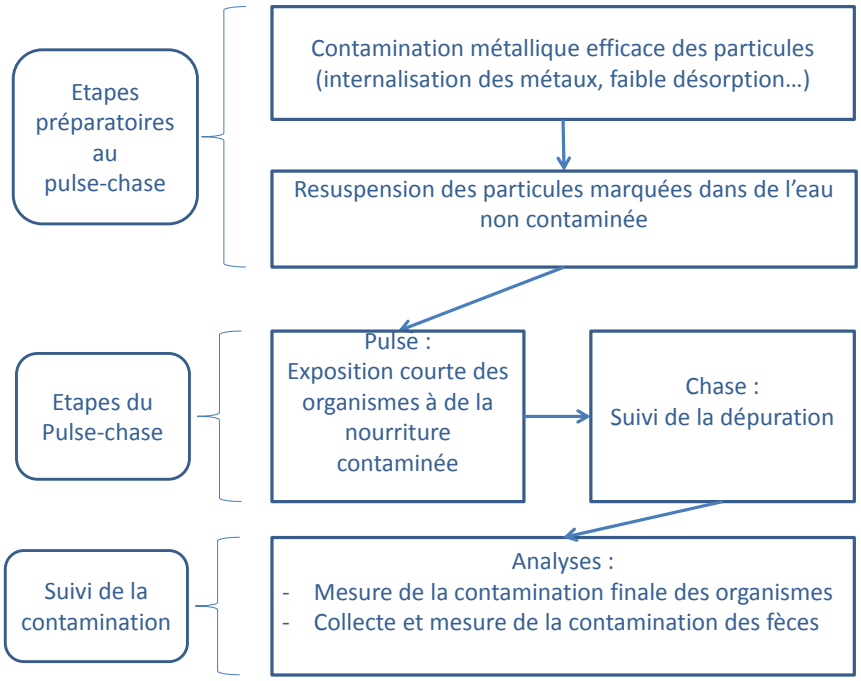


Figure 16 : Schéma des étapes de la manipulation du pulse chase feeding avec de la nourriture contaminée pour mesurer l'AE et l'IR pour des organismes aquatiques.

Depuis les années 90, cette méthode a permis, grâce à l'utilisation d'isotopes radioactifs, de mesurer les efficacités d'assimilation (AE) d'un certain nombre de métaux (Cd, Cr, Se, etc.) et des taux d'ingestion (IR) sur de nombreux organismes aquatiques. Aujourd'hui, les isotopes stables sont également utilisés et l'association pulse-chase/isotopes stables semble prometteuse pour évaluer la biodisponibilité de nouveaux couples métal-organisme (Croteau *et al.*, 2004). Cette association est pratiquement (absence de radioactivité) plus facile à mettre en place (détails dans la partie 4.2.2).

4.2.2. Les isotopes

Le pulse-chase feeding a été mis au point en utilisant des isotopes métalliques radioactifs (Luoma *et al.*, 1992) et a été développé sur de nombreux invertébrés aquatiques de type bivalve (moules et huitres) (Wang *et al.*, 1995; Reinfelder *et al.*, 1997; Roditi and Fisher, 1999; Arifin and Bendell-Young, 2000; Hédouin *et al.*, 2010).

Il a, récemment, été appliqué avec des isotopes stables sur un invertébré non bivalve, un escargot : *Limnaea stagnalis (Croteau et al., 2007)*.

L'intérêt de travailler avec des isotopes (stables ou radioactifs) est de s'affranchir de la contamination en métaux naturellement présents dans les organismes et de pouvoir

mesurer de faibles variations de teneurs en métaux. Ceci permet de travailler en laboratoire à des concentrations faibles en métaux, qui sont donc représentatives des teneurs environnementales.

De plus, en travaillant avec des isotopes radioactifs, on s'assure de l'absence de bruit de fond, ce qui simplifie l'analyse des échantillons contaminés. Et on a déjà du recul quant à leur utilisation car ils ont déjà été testés et validés sur des bivalves (Wang and Fisher, 1997; Roditi and Fisher, 1999; Wang and Fisher, 1999a) y compris récemment (Hédouin *et al.*, 2010). Malheureusement, leur utilisation au sein d'un laboratoire et pour certaines expérimentations relativement longues (2-3h) s'avère non indiquée pour plusieurs raisons, (1) le durcissement des règles de sécurité qui limite l'utilisation des radio-isotopes ; (2) l'impossibilité d'utiliser certains isotopes radioactifs comme ceux du cuivre, car leurs temps de demi-vie, très courts, ne permettent pas la mise en place de la manipulation.

Les isotopes stables permettent d'éviter ces désagréments. Ils semblent désormais avoir remplacé l'utilisation des isotopes radioactifs depuis 5-6 ans (Croteau and Luoma, 2008; Komjarova and Blust, 2009a; Cain *et al.*, 2011; Croteau *et al.*, 2011; Croteau *et al.*, 2013). , Malgré tout, l'utilisation des isotopes stables, présente des inconvénients majeurs qui sont (1) la destruction nécessaire des échantillons ; ces derniers étant minéralisés pour être analysés (2) la complexité de l'interprétation des résultats analysés avec l'ICP-MS due aux interférences possibles (Croteau *et al.*, 2004; Croteau *et al.*, 2007; Croteau *et al.*, 2013).

4.2.3. L'estimation des paramètres représentatifs de la biodisponibilité particulaire du modèle biodynamique

Grâce à la manipulation du pulse-chase feeding, il est possible de calculer l'efficacité d'assimilation (AE) selon deux méthodes : la méthode des ratios (Calow and Fletcher, 1972) et celle du bilan de masse (Luoma *et al.*, 1992).

La méthode des ratios, pour les métaux, a été inspirée de la méthode de calcul de l'assimilation du carbone (Calow and Fletcher, 1972) et repose sur l'utilisation d'un traceur, en faisant l'hypothèse que l'élément n'est pas assimilé par l'organisme. La mesure du traceur dans les fèces permet de connaître la quantité de nourriture qui a traversé le tractus. Prenons l'exemple de calcul de l'AE pour le ^{106}Cd avec le ^{52}Cr comme traceur, utilisé par Croteau, 2007 :

$$AE = 1 - \frac{\left(\frac{^{106}Cd}{^{52}Cr}\right)_{fèces}}{\left(\frac{^{106}Cd}{^{52}Cr}\right)_{nourriture}} \quad (4)$$

La méthode du bilan de masse fait le rapport entre la quantité de métal assimilé divisée par la quantité ingérée.

De plus, la part de métaux assimilés est déterminée en mesurant la quantité de métaux qui reste dans les moules en fin de dépuration c'est-à-dire après ingestion et excrétion totale (pseudo-fèces et fèces) des métaux. Ces deux faits permettent d'exprimer l'AE :

$$AE = \frac{Ingestion - Excrétion}{Ingestion} \quad (5)$$

Dans la littérature, il a été montré que, pour un gastéropode (Croteau *et al.*, 2007) et pour une moule *M. edulis* (Wang *et al.*, 1996), les résultats des deux méthodes de calcul, le ratio et le bilan de masse, étaient comparables pour le chrome, le cuivre et le cadmium.

La méthode des ratios est en pratique plus rapide que celle du bilan de masse. Elle ne nécessite pas la collecte de l'ensemble des fèces. Cependant la collecte partielle des fèces, n'est applicable que si, et seulement si, l'ensemble des métaux suivent la même cinétique d'élimination.

Or ce n'est pas le cas, du moins pour les bivalves (Roditi and Fisher, 1999), car en fonction du type de digestion que les métaux subissent, soit la digestion rapide, soit la digestion lente. Les métaux sont alors excrétés de façon échelonnée. Il est donc nécessaire de calculer le ratio sur l'ensemble des fèces collectées et non sur un seul échantillon. De plus, lorsque la méthode du traceur est utilisée, il est nécessaire de s'assurer que l'isotope considéré comme un traceur n'est réellement pas assimilé par l'organisme.

Ainsi, la méthode du bilan de masse, lorsque l'on travaille avec des bivalves, semble une technique plus appropriée. Ces dernières années, il a été constaté une tendance à l'utilisation de cette technique seule. La technique des ratios est progressivement abandonnée car elle est effectivement moins juste (Croteau and Luoma, 2008; Cain *et al.*, 2011; Croteau *et al.*, 2011; Croteau *et al.*, 2013).

Les méthodes de mesure du taux d'ingestion (IR) reposent sur une approche directe qui est un bilan de masse. La quantité ingérée est la quantité initiale en nourriture moins celle restante (moins quantité excrétée sous forme de pseudo-fèces pour les moules), le tout divisé par le poids des moules et le temps pour avoir un IR en $g.g^{-1}_{organisme\ poids\ sec}.j^{-1}$:

$$IR = \frac{Nourriture_{Ajoutée\ pdt\ pulse} - Nourriture_{restante} - \sum pseudofèces}{m_{moule} \times t} \quad (6)$$

Il existe également une méthode de mesure indirecte. Cette méthode est utilisée lorsqu'il est difficile de mesurer la quantité de nourriture ingérée. C'est le cas lorsque la nourriture est composée de particules en suspension.

Cette méthode part du principe que la quantité de métal ingérée est en théorie la somme des métaux assimilés (retrouvés dans les organismes) et excrétés (fèces et pseudo-fèces).

Cette méthode indirecte repose sur l'utilisation d'un traceur (Croteau *et al.*, 2007) :

$$\mathrm{IR}_{traceur} = \frac{\left(\frac{\sum traceur_{excrété} + traceur_{organisme}}{[traceur]_{particules}} \right)}{poids_{organisme} \times temps} \quad (7)$$

Cette technique peut également être extrapolée à tous les isotopes utilisés et pas uniquement au traceur. Les mêmes valeurs d'IR sont alors obtenues (Croteau and Luoma, 2008).

En laboratoire, la méthode de détermination de la biodisponibilité particulaire des métaux permet d'obtenir une valeur en conditions contrôlées ce qui permet d'évaluer l'impact de facteurs abiotiques comme la quantité ou la qualité des particules.

Cependant, le fait de travailler en conditions contrôlées rend discutable l'application à des expérimentations *in situ* les valeurs d'AE et d'IR.

Il a été observé que l'AE et l'IR sont dépendants de plusieurs facteurs (Tableau 4) ; comme ceux liés à l'organisme : la physiologie de la digestion, la réponse de l'organisme à la contamination (Wang and Fisher, 1999a) ou à la chimie des particules : la partition des métaux sur les particules (Wang and Fisher, 1997) ou de leurs qualités nutritives.

Tableau 4 : Impact de différents facteurs sur l'AE et l'IR du modèle biodynamique en fonction des métaux et des organismes considérés en conditions contrôlées.

AE				
Facteurs	**Organismes**	**Métaux**	**Influence**	**Références**
Facteurs biotiques				
Physiologie de la digestion : la digestion longue	*Pyganodon grandis* (bivalve eau douce)	Cd	Augmentation de l'AE	(Wang and Fisher, 1999a)
Facteurs abiotiques				
Partition des métaux : internalisation du métal dans le cytoplasme	5 espèces d'éphémères	Cd, Cu	Augmentation de l'AE	(Cain *et al.*, 2011)
	4 bivalves marins	Ag, Am, Cd, Co, Se, et Zn	Augmentation de l'AE	(Reinfelder *et al.*, 1997)
Qualité des particules : augmentation de la concentration en carbone	*Mytilus edulis* (bivalve marin)	Ag, Am, Cd, Co, Se, et Zn	Augmentation de l'AE	(Wang *et al.*, 1996)
	Mytilus trossulus (bivalve marin)	Cd	Augmentation de l'AE	(Arifin and Bendell-Young, 2000)

IR				
Facteurs	**Organismes**	**Nourriture**	**Influence**	**Références**
Facteurs biotiques				(Cain *et al.*, 2011)
Comportement Des organismes	5 espèces d'éphémères	Diatomées	Forte variabilité des IR (60 %)	
Facteurs abiotiques				
Augmentation de la contamination de la nourriture (facteur 10)	Invertébré *Limnaea stagnalis*	Diatomées contaminées en Cu	Diminution de l'IR (facteur 10)	(Croteau and Luoma, 2009)
	Invertébré *Limnaea stagnalis*	Diatomées contaminées en Cd et Ni	IR constant	(Croteau and Luoma, 2009)
	Invertébré *Limnaea stagnalis*	Laitue contaminée en Cd, Cu et Ni	Diminution de l'IR (facteur 10)	(Croteau and Luoma, 2008)
Augmentation du temps d'exposition de la nourriture contaminée	Ephémère : *Baetis tricaudatus*	Diatomées contaminées en Cd	Diminution de l'IR	(Irving *et al.*, 2003)

Etant donné que la biodisponibilité particulaire est dépendante de nombreux facteurs biotiques et abiotiques, si l'on cherche à étudier l'origine de sa variabilité naturelle en laboratoire, il est possible que l'étude de cette variabilité en conditions contrôlées ne soit pas appropriée.

En effet, il a déjà été montré en laboratoire, que la nourriture artificiellement contaminée en métaux n'entraine pas la même toxicité, pour les organismes, que la nourriture naturelle aux mêmes concentrations (cas du Cu et du Zn sur des poissons) (Clearwater *et al.*, 2002). Cette

différence de toxicité peut s'expliquer par des questions de biodisponibilité variable. Ce résultat montre la difficulté de reproduire, en laboratoire, la contamination de la nourriture à l'identique de la nourriture contaminée réelle. Ceci s'explique pour plusieurs raisons : tout d'abord, il est difficile de reproduire en laboratoire la diversité des qualités de particule rencontrées en conditions naturelles. Soit un seul type de particule, soit un mélange de particules de différents types (organiques, minérales) ou seston, est testé. Ensuite lorsqu'un seston est testé, les particules utilisées sont dites « fraiches » et leur temps de contamination par des métaux est relativement court (Lee *et al.*, 2000). C'est une condition nécessaire si l'on veut s'assurer que le seston produit puisse être reproduit à l'identique entre deux expériences. Si la dégradation du mélange est permise, ou si le temps de contact entre le seston et les métaux est allongé, le seston sera plus représentatif de la réalité, mais il sera difficile de contrôler l'évolution de sa constitution.
Ensuite, il est nécessaire de pouvoir contrôler la contamination des particules en métaux, c'est-à-dire de définir si la contamination des particules est externalisée ou internalisée.

Concernant la physiologie des organismes, il a été montré que les taux de filtration des bivalves (directement liés aux IR) augmentent avec la force du courant (Prins *et al.*, 1996; Filgueira *et al.*, 2006). Ainsi en laboratoire, si l'on travaille en conditions statiques, l'IR mesuré peut être inférieur à la réalité.

Il semble donc intéressant de coupler cette expérience du pulse chase à l'aide d'isotopes en laboratoire à la détermination de l'AE et de l'IR *in situ* pour la dreissène.

4.3. In situ

La mesure de l'IR *in situ* est calculée à partir de la mesure du taux de filtration (FR) (paragraphe 4.1.) qui est mesuré *in situ*.
Le FR est mesuré *in situ* par mesure de la décroissance des particules (ou de la chlorophylle) dans un milieu clos (Reeders *et al.*, 1989) ou dans un milieu en flux continu.
Pour les bivalves marins, le FR est mesuré *in situ* à l'aide de tunnels benthiques de l'ordre de la dizaine de mètres (Prins *et al.*, 1996; Smaal, 1997) ou sans installation. Dans ce cas-là,

deux sondes sont disposées en amont et en aval d'un lit de bivalves en mer suivant le sens des courants marins (Grizzle *et al.*, 2006).

Il existe également des chambres en flux continu et canaux *ex-situ* (Velasco and Navarro, 2005; Filgueira *et al.*, 2006; Elliott *et al.*, 2008). Ces systèmes nécessitent la mise en place d'un système de pompage et de mise en circulation de l'eau. *In situ* la mesure du flux est réalisée dans les tunnels par des courantomètres électromagnétiques (Prins *et al.*, 1996; Grizzle *et al.*, 2006).

Pour les bivalves d'eau douce, aucune étude n'a été réalisée *in situ* pour mesurer le FR., à l'exception d'une étude *ex situ* dans des canaux de 4m de long en sortie de STEP (Elliott *et al.*, 2008). La décroissance en particules est mesurée dans ces tunnels ou chambres (mesure en entrée et en sortie) afin de déterminer le FR qui est alors calculé selon la formule suivante (Filgueira *et al.*, 2006) :

$$FR = f \cdot \left(\left(C_0 - C_t \right) / C_s \right) \quad (8)$$

Avec FR en $L.h^{-1}$

f = le débit dans le tunnel ($L.h^{-1}$)

C_0 et C_t les concentrations en particules en entrée et en sortie du tunnel et C_s la concentration autour des moules.

D'autres études, mesurent le FR en mesurant les rejets (fèces et pseudos-fèces) des bivalves également disposés dans des tunnels benthiques (Schneider *et al.*, 1998; Neng and Culver, 1999; Galimany *et al.*, 2011). Cependant, cette méthode suppose que les bivalves sont des organismes qui ne sélectionnent pas ce qu'ils filtrent, car on mesure ce qui est filtré de façon indirecte en récupérant les particules excrétées. Or, il y a effectivement une sélection mécanique lors de la filtration qui est due à la taille des particules relativement au diamètre du siphon et de l'écartement des branchies. De plus, la méthode ne semble pas adaptable aux conditions que l'on retrouve dans les rivières car la récolte des fèces et pseudo-fèces des bivalves d'eau douce est plus complexe *in situ* que celles des bivalves marins, en raison de leur petite taille. Elle ne semble pas envisageable. Ces derniers peuvent facilement être dissous par la vitesse du courant du cours d'eau avant d'avoir pu être récoltés.

Finalement, les méthodes de mesure de FR *in situ,* qui reposent sur la décroissance des particules, ont été réalisées sur des systèmes généralement adaptés aux grands espaces

marins (tunnels benthiques de grandes dimensions ou sondes espacées) ou dans des systèmes en flux contrôlés (Neng and Culver, 1999; Elliott *et al.*, 2008) de plusieurs mètres pour des bivalves d'eau douce. Ces systèmes sont finalement des systèmes *ex situ*.
Aucun système *in situ*, n'a à l'heure actuelle, été conçu et dimensionné pour mesurer le taux de filtration *in situ* dans des fleuves ou des rivières (détails Chapitre 3, partie 3).

En ce qui concerne, l'évaluation de l'AE *in situ*, un travail récent (Bourgeault et al., 2011) a permis d'estimer un AE *in situ*. Cette évaluation a été réalisée en couplant des mesures de bioaccumulation de métaux sur 11 mois à des simulations du modèle biodynamique. Ce travail permet une calibration *in situ* (et non en laboratoire) de l'AE. Ce travail de 11 mois a permis d'optimiser les valeurs d'AE à l'aide des données des 5 premiers mois puis de valider les AE estimés avec les données des 6 derniers mois.
Ce travail a montré que les AE pour le cuivre, le cadmium, le nickel et le zinc étaient sites dépendant pour la dreissène puisqu'ils varient respectivement entre 2 et 9%, 2 et 9%, 3 et 14% et 0 et 5% selon les 3 sites étudiés (Bourgeault *et al.*, 2011). Ce travail est cependant unique et ces résultats seraient à confirmer, notamment en augmentant le nombre de sites à étudier. Il pourrait également s'accompagner d'estimations de l'AE en laboratoire. Effectivement, on ne sait pas relier les variations d'AE observées sur les sites à la caractérisation des MES ou à une caractéristique quelconque du site.

4.4. Conclusion : importance d'évaluer la voie trophique du modèle de bioaccumulation pour un bivalve filtreur d'eau douce.

A l'heure actuelle, le modèle biodynamique appliqué à des organismes aquatiques, en mer et en rivière, permet une assez bonne estimation de la bioaccumulation (50 à 83 % de prédiction correcte) comparée à la bioaccumulation réelle mesurée sur le terrain (Roditi *et al.*, 2000; Luoma and Rainbow, 2005; Le *et al.*, 2011). Cependant cette qualité de prédiction est variable pour certains organismes comme *Dreissena polymorpha*. Elle est variable selon les métaux (Roditi *et al.*, 2000) et selon les sites. La prédiction est moins efficace sur la Meuse et sur le Rhin (Le *et al.*, 2011) que sur l'Hudson, le Nicaraga et des Lacs américains (Etie et Ontario) (Roditi *et al.*, 2000) ou la Seine (Bourgeault *et al.*, 2011). Les différences

observées peuvent être dues à une utilisation des constantes biodynamiques du modèle qui n'est pas homogénéisé selon les études.

Le modèle repose sur des hypothèses assez simples : (1) les valeurs k_e, k_u, AE et IR sont considérées comme des constantes dépendantes du couple métal/organisme, (2) il est valide pour différentes espèces aquatiques (filtreurs, détritivores).

Des études remettent en cause l'hypothèse de la constance des k_u pour un couple métal/organisme car il a été montré que les k_u sont dépendants également du taux de filtration des organismes, des teneurs en anions cations et des teneurs en d'autres métaux sous forme ionisée dans le milieu. Ceci a été montré pour la dreissène pour le cadmium (Bourgeault *et al.*, 2010a) et pour le nickel (Bourgeault *et al.*, 2012) pour les constantes k_u.

D'autres études remettent également en cause la constance de l'efficacité d'assimilation (AE) pour un couple métal/ organisme car il a été observé chez *M.edulis* que l'AE est fonction de la qualité des particules (Wang *et al.*, 1996) et chez des éphémères il a été montré variable en fonction de la partition des métaux au sein des particules (Cain *et al.*, 2011). Ainsi, ces différentes remises en cause des valeurs des constantes du modèle pourraient expliquer le fait que, selon les sites ou les organismes d'études, l'efficacité de prédiction du modèle soit fluctuante.

En laboratoire, les facteurs de contrôle de l'AE sont la physiologie des organismes, la qualité et la quantité des particules et ceux de l'IR sont la température, le comportement des organismes et la contamination des particules. De plus, il a été observé que la méthode du pulse chase n'avait pas encore permis d'évaluer des AE fiables pour des métaux comme le cuivre et le nickel pour la dreissène.

Enfin, il serait intéressant d'étudier également les variations de la biodisponibilité des métaux particulaires notamment en travaillant *in situ*, dans des milieux anthropisés.

La contamination métallique particulaire précisément en Ile-de-France est fluctuante dans le temps (impact pluvieux) et spatialement (rejets anthropiques). L'impact de cette contamination n'est pas toujours pris en compte et sa variabilité la rend difficile à prévoir. Améliorer la compréhension de sa biodisponibilité, notamment en utilisant des organismes aquatiques, comme la moule zébrée, qui est un bivalve filtreur est donc importante.

Il existe plusieurs types de modèle de bioaccumulation. Un modèle biodynamique, en particulier, permet de formaliser cette biodisponibilité. La validité de ce modèle a été démontrée mais sa précision systématique, quel que soit l'organisme, le métal et le site est largement perfectible. Les constantes biodynamiques (k_u et k_e) de certains métaux (Ni, Cd) ont déjà été définies pour la dreissène et leur détermination serait à améliorer. D'autres constantes, notamment pour d'autres métaux (Cu, Ni, Zn) sont encore à définir pour la dreissène, comme l'efficacité d'assimilation (AE) du Cu et du Ni et la constante d'assimilation (k_u) du zinc.

La biodisponibilité des métaux est formalisée par la détermination de la constante d'assimilation (AE). Ainsi, il semble qu'en travaillant sur l'estimation de la biodisponibilité des métaux, par des approches en laboratoire et *in situ* qui sont complémentaires, il serait possible d'améliorer l'efficacité de prédiction du modèle de bioaccumulation des métaux. L'amélioration du modèle permettrait à terme de mieux définir les teneurs métalliques à risque, dans les milieux, pour les organismes aquatiques.

Chapitre 2 : Biodisponibilité des métaux particulaires en laboratoire

1. Objectifs

Dans ce chapitre, nous analysons les contraintes liées au développement en laboratoire d'une méthode fiable permettant d'évaluer la biodisponibilité des métaux particulaires avec les dreissènes, et les difficultés qui en résultent. Cette méthode pourra être utilisée afin de déterminer l'impact de la qualité et de la quantité de la nourriture sur la réponse des organismes aquatiques, avec le cas particulier d'une moule, à la contamination métallique particulaire.

La méthode cherche à évaluer l'efficacité d'assimilation (AE) de métaux fixés sur des particules et le taux d'ingestion de nourriture (IR). Le produit AE x IR traduit la réponse biologique et physiologique des organismes à la contamination métallique particulaire et correspond au taux d'accumulation par voie trophique dans le modèle biodynamique.

La méthode développée repose sur le principe du pulse-chase feeding, exposition courte des organismes à la contamination et temps long de dépuration. Elle a été réalisée à l'aide d'isotopes stables du cadmium, du chrome, du cuivre, du nickel et du zinc. Encore aucune étude ne s'est intéressée à cette méthode en utilisant des isotopes stables sur des bivalves. De plus, il n'existe pas d'évaluation de l'efficacité d'assimilation (AE) du cuivre et du nickel avec *Dreissena polymorpha*.

Des travaux antérieurs dans l'équipe d'écotoxicologie d'IRSTEA ont permis de mettre en place les bases du pulse-chase avec des isotopes de cadmium, du chrome, du cuivre et du nickel avec les dreissènes (Bourgeault, 2010). Cependant les résultats n'ont pas permis de proposer une méthode opérationnelle afin d'évaluer la biodisponibilité des métaux particulaires.

Le protocole mis en place nécessitait des améliorations méthodologiques afin de (1) permettre un dopage plus homogène et plus stable de la nourriture (2) observer des comportements alimentaires plus spécifiques d'une condition à une autre.

Il restait à tester également le zinc car c'est un métal important, marqueur de l'impact des rejets urbains dans les cours d'eau.

Ainsi dans le cadre de la thèse, les enjeux des expérimentations en laboratoire ont été :

- de stabiliser la contamination de la nourriture,

- de fiabiliser le mode de contamination trophique.

Afin de quantifier :

- des AE et des IR dans des conditions proches des conditions environnementales, c'est-à-dire avec différentes types de particules, une contamination faible et multimétallique,
- l'AE du zinc, en particulier.

2. Matériels et méthodes

2.1. Pêche et acclimatation des moules

Les dreissènes ont été prélevées et calibrées (20-22mm) dans le canal liant la Marne au Rhin à Vertuzey (N 48.71584°-E 5.67396°), en Meuse, avant d'être rapportées au laboratoire en juillet 2011. La calibration des moules permet de travailler avec des organismes de la même taille. Effectivement, suivant leur taille, elles sont susceptibles de ne pas filtrer les mêmes particules (Ackerman, 1999). Le site a été choisi car, à l'exception du chrome, les teneurs en métaux dans les moules sont relativement faibles par rapport aux teneurs moyennes mesurées dans celles exposées sur des sites en Ile-de-France (Tableau 5).

Tableau 5 : Comparaison des teneurs en métaux dans les moules (µg.g^{-1}), *sur le site de Vertuzey (n=2, 2 mesures en juillet 2011 et novembre 2012, entre parenthèse l'écart type) avec les teneurs dans les moules en Seine (moyenne et écart type, n=37 sur 5 sites différents répartis sur la Seine et sur l'Orge entre 2008 et 2009 (Bourgeault et al., 2010a), entre parenthèse l'écart type).*

Métaux (µg.g^{-1})	Cd	Cr	Cu	Ni	Zn
Moules Vertuzey	0,02	0,76	8,85	4,18	95,29
	(0,01)	(0,45)	(2,74)	(0,16)	(12,78)
Moules Ile-de-France	1,20	1,42	15,64	8,90	157,32
(Orge et Seine)	(0,69)	(0,41)	(5,83)	(2,11)	(71,37)

Puis, les dreissènes ont été acclimatées, pendant au minimum une semaine au laboratoire, avant le début des expériences. Lors de l'acclimatation, l'eau du site est progressivement remplacée par de l'eau de source faiblement minéralisée (Nestlé Pure life : Source des Acacias®). Les moules ont été mises dans un aquarium de 12 L avec oxygénation par bulleur à 15°C et un éclairage réglé sur un cycle jour/nuit (10/14h). L'eau a été renouvelée au 1/3 trois fois par semaine, afin d'éviter de trop fortes concentrations en azote (rejets des

organismes) et afin qu'elles ne dépassent pas 25 $mg.L^{-1}$ en nitrates (N_NO_3, LCK 340, Hach Lange Gmbh) et pas 0,25 $mg.L^{-1}$ en nitrites (N_NO_2, LCK 341, Hach Lange Gmbh) (Bourgeault *et al.*, 2010a).

Elles ont été nourries avec des algues en solution fraiches (puis conservées à 4°c) à $2mg.L^{-1}$ (*Pseudokirchneriella subcapitata*). Lors de l'acclimatation, un suivi tout particulier de la température est nécessaire. Elle doit être constante avant et pendant le pulse-chase car les variations de température entraînent des variations du taux de filtration et donc éventuellement de l'IR (Reeders *et al.*, 1989).

2.2. Croissance et contamination des particules en isotopes stables

L'étape du dopage des particules en isotopes stables est une étape clé de la phase de contamination car le dopage doit être (1) efficace, les métaux doivent être internalisés dans les cellules algales et non simplement adsorbés (rinçage à l'EDTA préalable) et (2) les teneurs doivent êtres faibles dans le but d'être représentatives des conditions environnementales.

Les particules choisies lors du dopage métallique sont les algues données en routine au laboratoire afin de nourrir les moules. Ce choix de l'utilisation de la nourriture habituelle dans le cadre de l'expérience permet de ne pas perturber les bivalves. Ces algues unicellulaires ont une forme de faucille entre 8 et 14 µm de long et 2 et 4 µm de large. Leurs dimensions en font des particules qui sont filtrées avec une efficacité de rétention de 100 % par les bivalves (Lei *et al.*, 1996) et leurs fortes teneurs en matière organique en font des particules préférées aux particules minérales (Baker *et al.*, 2000; Vanderploeg *et al.*, 2001).

Les algues ont été mises dans un milieu de culture de référence nommé ASM1 : $CaCl_2$ 29,4 $mg.L^{-1}$, $CoCl_2$ 29 $\mu g.L^{-1}$, $CuS0_4$ 0,186 $\mu g.L^{-1}$, $FeCl_3$ 1,1 $mg.L^{-1}$, H_3BO_3 2,5 $mg.L^{-1}$, K_2HPO_4 17,4 $mg.L^{-1}$, $MgCl_2$ 40,7 $mg.L^{-1}$, $MgSO_4$ 49,3 $mg.L^{-1}$, $MnCl_2$ 1,4 $mg.L^{-1}$, NaEDTA 7.44 $g.L^{-1}$, Na_2MoO_4 10 $\mu g.L^{-1}$, $NaNO_3$ 170 $mg.L^{-1}$, et $ZnSO_4$ 3,68 $g.L^{-1}$. Lors du dopage en métaux des algues, le milieu de culture a été modifié afin qu'il ne contienne ni zinc, ni EDTA. Car l'EDTA est un ligand fort des métaux qui limite leur biodisponibilité pour les algues. Le fer quant à lui ne peut pas être supprimé du milieu car il est le constituant principal des cytochromes qui sont des coenzymes qui interviennent dans la photosynthèse (et la respiration). Il est donc indispensable à la croissance des algues.

Le protocole de dopage des algues a été mis au point afin de permettre une forte internalisation des algues en cadmium, chrome, cuivre, nickel et zinc et une faible adsorption, afin de limiter la désorption des métaux dans le milieu. Le dopage des algues a eu lieu pendant 8 jours, à 20°C avec agitation et après une phase de croissance de 7 jours et de repiquage (sans dopage) (Figure 17). Le dopage des algues pendant une phase de croissance facilite l'internalisation des métaux (Ball *et al.*, 2006; Komjarova and Blust, 2009a), mais si la phase de croissance est trop rapide (exponentielle), la contamination n'est pas optimale. Tout le défi est d'effectuer le dopage juste après une phase exponentielle de croissance. L'internalisation est maximisée et de ce fait, la désorption est limitée et la contamination du milieu dissous aussi.

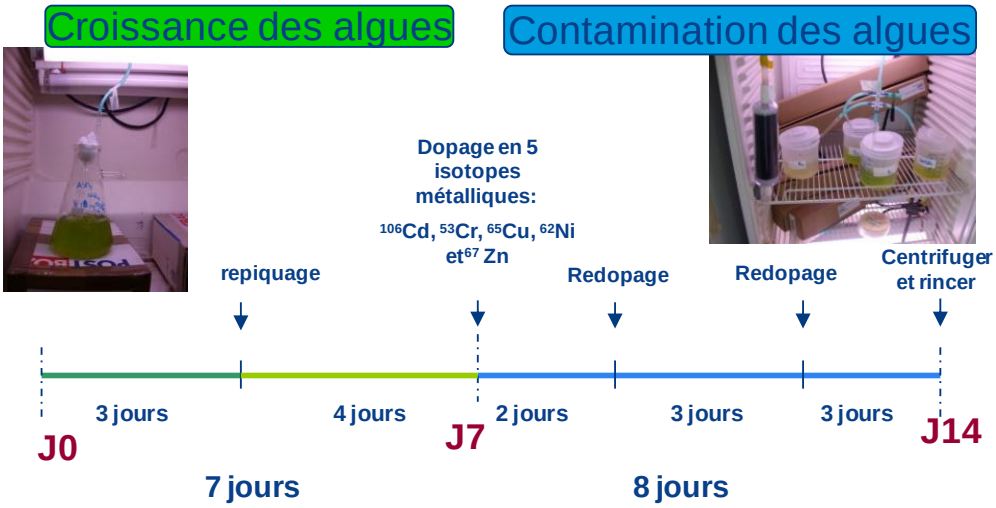


Figure 17 : Schéma général de croissance et de dopage des particules en isotopes stables métalliques.

Les algues ont été dopées tous les 2-3 jours en isotopes. Les solutions mères d'isotopes ont été préparées au LSCE (Gif-sur-Yvette) à partir des isotopes en poudre (Eurisotopes, Saclay, France) qui ont ensuite été dissous dans des solutions d'acidité variable. L'isotope ^{53}Cr (97 % de pureté) a été partiellement dissous à 0,40 $mg.L^{-1}$ dans un mélange d'acides ultra purs $HF/HNO_3/HClO_4$ (1:5:3) à 120°C dans un contenant fermé puis entreposé dans une salle propre pendant 10 jours à 120°C. L'isotope ^{62}Ni (98 % de pureté) a été dilué dans HCl pur à 1,18 $mg.L^{-1}$, l'isotope ^{65}Cu (99 % de pureté) a été dissous dans HCl pur à 500 $mg.L^{-1}$, l'isotope ^{67}Zn (>97 % de pureté) a été dissous dans de l'eau ultra pure acidifiée à 9 % d'acide : 3 % HCl, 6% HNO_3 à 6,7 $mg.L^{-1}$ et l'isotope ^{106}Cd (89 % de pureté) a été dissous dans de l'eau ultra pure à 2% HNO_3 à 119 $mg.L^{-1}$.Finalement le dopage, en 3 étapes, permettait d'obtenir une

teneur dans le milieu d'exposition définie, comme précisé dans le tableau ci-dessous (Tableau 6) :

Tableau 6 : But et déroulement du dopage successif du milieu d'exposition

Métaux	**Cd**	**Cr**	**Cu**	**Ni**	**Zn**
Contamination visée du milieu (µg.L^{-1})	1,8	4,0	12,0	10,0	3,0
Concentration de la solution mère (mg.L^{-1})	11,90	0,40	500,00	1,18	6,70
Trois séries de dopage 1ère série (jour1)	90 µL dans 600 mL	6 mL dans 600 mL	14 µL dans 600 mL	5 mL dans 600 mL	27 µL dans 600 mL
2ème série (jour 3)	86 µL dans 570 mL	1 mL dans 570 mL	13 µL dans 570 mL	5 mL dans 570 mL	26 µL dans 570 mL
3ème série (jour 7)	77 µL dans 500 mL	900 µL dans 500 mL	12 µL dans 500 mL	4,4 mL dans 500 mL	23 µL dans 500 mL

Après chaque série de dopage, la solution est stabilisée à l'aide de soude à pH = 8-9 car les solutions d'isotopes sont très acides et le pH descend systématiquement à 3,5 juste après les dopages. Malheureusement, une erreur de dopage pour le chrome et le zinc est survenue soit lors des ajouts en volume du chrome, soit lors de la réalisation de la solution mère. L'origine de l'erreur n'a pas été identifiée.

En fin de contamination, une phase de rinçage à l'EDTA, pendant 1h, suivi de 10min de centrifugation à 300 rpm a été réalisée (inspiré de (Ball *et al.*, 2006)) afin de supprimer les métaux faiblement adsorbés sur les parois des cellules, pour limiter leur désorption dans le milieu au moment de l'exposition des dreissènes à la nourriture contaminée.

2.3. Déroulement du pulse-chase feeding et échantillonnage

2.3.1. Déroulement du pulse-chase feeding

Organisation dans l'espace et dans le temps de l'expérience

La première étape du pulse-chase, l'étape courte ou pulse, est la phase de contact des moules avec les particules contaminées. Les bivalves ont donc été nourris pendant 1h30 en algues contaminées. L'enjeu du protocole est de limiter cette phase afin de se rapprocher le plus possible du temps de transit des dreissènes (40-60min) (Roditi and Fisher, 1999), dans le but d'éviter une recontamination du milieu par les fèces contaminées et en même temps de

permettre une exposition suffisamment longue des organismes afin de mesurer les isotopes dans les tissus des moules.

Les bivalves ont été exposés à deux concentrations différentes en algues (8 $mg.L^{-1}$ et 15 $mg.L^{-1}$) ; chaque condition étant testée en triplicat. Pour chaque condition, une exposition témoin (nourriture non contaminée) est réalisée (Tableau 7) et (Figure 18).

Tableau 7 : Nomenclature des béchers utilisés lors des 1h30 de pulse.

Conditions	Algues à 8 $mg_{poids\ frais}.L^{-1}$	Algues à 15 $mg_{poids\ frais}.L^{-1}$
Nourriture contaminée	A8, B8, C8	A15, B15, C15
Nourriture non contaminée	Contrôle 8	Contrôle 15

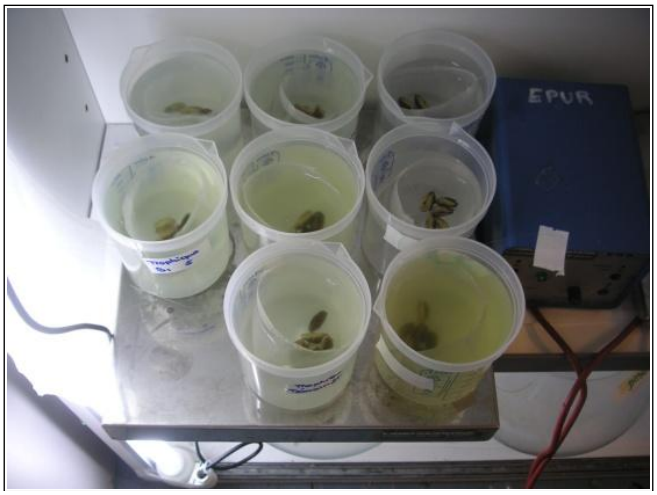
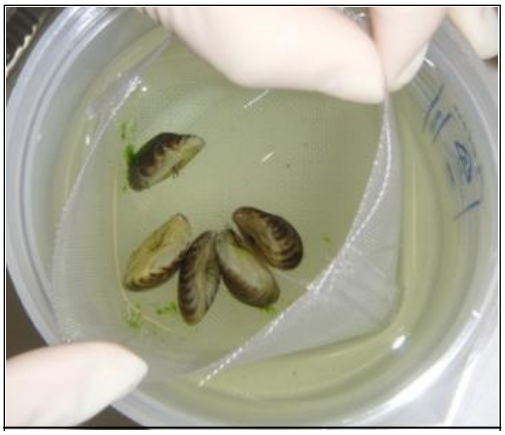


Figure 18 : Disposition des différents béchers sur une table agitante en pièce thermostatée pendant le pulse-chase feeding.

Les moules ont été exposées dans des béchers de 500 mL en plastique avec 5 individus par bécher. Elles ont été mises dans des paniers faits en tamis (Figure 19a). Les paniers ont été conçus afin de permettre (1) une agitation magnétique afin de maintenir les particules en suspension sans perturber les organismes (2) la récupération simple des fèces et pseudo-fèces excrétés lors de l'expérience. La table agitante est mise dans une pièce thermostatée réglée à 15°C et aux conditions d'éclairement identiques à la période d'acclimatation des moules en laboratoire.



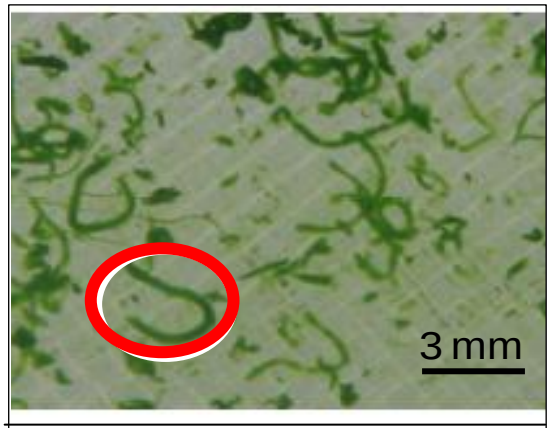


Figure 19 : Figure 19a (à gauche) : Photographie des moules dans leur panier. Figure 19b (à droite) : Zoom sur les fèces et pseudo-fèces déposées sur les paniers.

Principe de la récolte des fèces et des pseudo-fèces

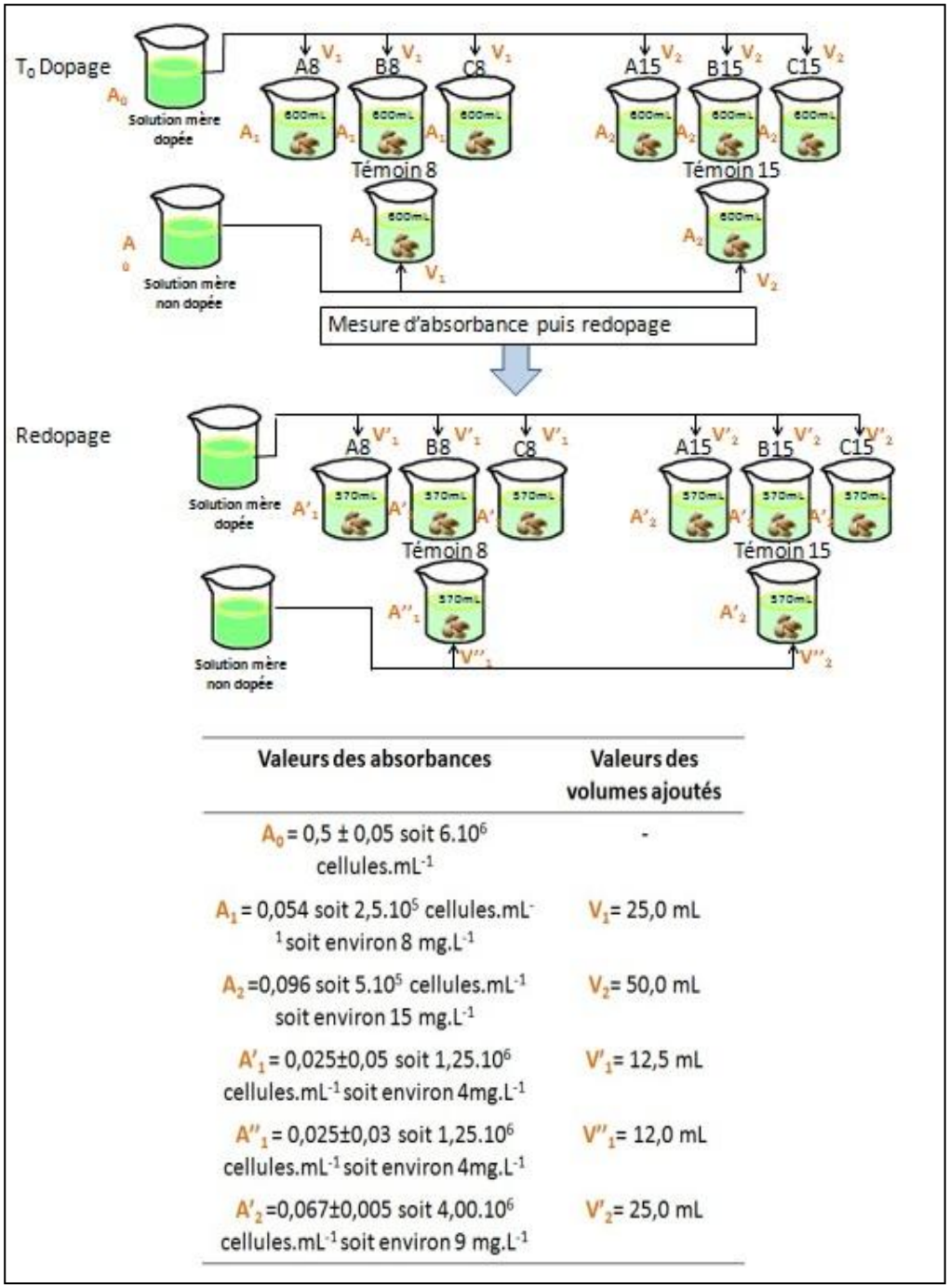
La récolte de la totalité des pseudo-fèces (étape courte) et des fèces (pendant la totalité de l'expérience) a été réalisée à l'aide de pipettes possédant des cônes coupés à leur extrémité. Les fèces et pseudo-fèces sont échantillonnées délicatement, afin d'éviter leur dissolution dans le milieu. Pour ce faire, ils ont été pipetés directement au niveau des tamis. Les fèces sont vertes foncées et mieux délimitées que les pseudo-fèces qui sont vertes claires laiteuses (Figure 19b). L'identification et le prélèvement sont délicats. Les fèces ont été prélevées une par une et déposées sur des filtres installés sur une pompe à vide. Les pseudo-fèces ont été déposés sur d'autres filtres. Les filtres ayant été préalablement pesés, ils ont ensuite été mis à l'étuve pendant au minimum 12h à 60°C, après récolte des fèces et pseudos-fèces et finalement pesés dans le but de déterminer le poids sec des fèces et pseudo-fèces.

L'ensemble des fèces et pseudo-fèces a été prélevé en fin de pulse et pendant le chase. Il a été nécessaire de prélever la totalité des fèces et pseudo-fèces afin de valider les bilans de masse par la suite et le calcul de l'AE.

Principe d'ajout des algues dopées lors de l'exposition

Le concept repose sur un dopage des solutions en algues au début de l'exposition puis lors de l'exposition. Ce redopage permet d'éviter la baisse de nourriture disponible pour les organismes et donc la contamination du milieu d'exposition.

L'absorbance a été mesurée à 680nm (Figure 20).



Valeurs des absorbances	Valeurs des volumes ajoutés
A_0 = 0,5 ± 0,05 soit 6.10^6 cellules.mL^{-1}	-
A_1 = 0,054 soit $2,5.10^5$ cellules.mL^{-1} soit environ 8 mg.L^{-1}	V_1= 25,0 mL
A_2 =0,096 soit 5.10^5 cellules.mL^{-1} soit environ 15 mg.L^{-1}	V_2= 50,0 mL
A'_1 = 0,025±0,05 soit $1,25.10^6$ cellules.mL^{-1} soit environ 4mg.L^{-1}	V'_1= 12,5 mL
A''_1 = 0,025±0,03 soit $1,25.10^6$ cellules.mL^{-1} soit environ 4mg.L^{-1}	V''_1= 12,0 mL
A'_2 =0,067±0,005 soit $4,00.10^6$ cellules.mL^{-1} soit environ 9 mg.L^{-1}	V'_2= 25,0 mL

Figure 20 : Protocole du déroulement des deux phases de dopage en algues lors de la phase d'exposition avec les valeurs d'absorbance des solutions d'algues (A) et les volumes de solution mère d'algues ajoutés (V)

Ce dopage, effectué en deux parties, permet de stabiliser la contamination sur toute la phase d'exposition.

Ajout de nourriture lors de la dépuration (chase)

La période de dépuration, la plus longue, suit directement la période d'exposition. Les moules ont été exposées pendant 48h (des expérimentations préalables dans l'équipe ayant montré qu'il n'était pas nécessaire de réaliser une dépuration de 72h (Bourgeault, 2010))

aux mêmes teneurs en nourriture, non contaminée, que lors de l'exposition. L'ajout de nourriture ainsi que le prélèvement des fèces a été poursuivi pendant toute la phase de dépuration aux temps suivants : t=5h, 8h, 22h, 31h et 48h. Lors de cette période, les ajouts de nourriture se sont déroulés de manière identique à l'ajout lors du pulse, soit juste après une mesure d'absorbance. Au temps t=5h, les ajouts ont été identiques mais à partir du temps t=8h l'absorbance dans certains béchers, notamment dans le bécher B15, est devenue supérieure aux absorbances initiales :

-à t=8h ; l'absorbance de B15 est de 0,140 au lieu de 0,096.

-à t=22h les absorbances des Témoin 8, A8, B8 et C8 sont en moyenne de 0,065±0,004 au lieu de 0,054 et les absorbances des béchers Témoin15, A15, B15 et C15 sont en moyenne de 0,110±0,002 au lieu de 0,096.

-à t=31h et 48h les mêmes constats ont été faits avec des absorbances en légère augmentation pour certains béchers, notamment avec des moyennes de 0,120±0,004 pour les béchers Témoin 15, A15, B15 et C15.

Ces augmentation de l'absorbance nous ont conduit à limiter l'ajout d'algues en fin d'expérience.

<u>Transfert de la phase d'exposition à la phase de dépuration et expérimentation en parallèle de la phase d'exposition</u>

Le passage de la période d'exposition à la période de dépuration, où la nourriture apportée est non contaminée en métaux, a nécessité un transfert des organismes. Ils sont transférés de leur panier vers des béchers avec des milieux non contaminés en métaux.

En parallèle, le milieu d'exposition (contaminé) est filtré (filtre seringue à 0,45 µm de porosité) et permet d'exposer de nouveaux individus pendant 1h30 à ce milieu contaminé (sans particules). Cette expérimentation supplémentaire permet de quantifier la bioaccumulation possible par voie dissoute pendant la phase de pulse. Cette contamination possible étant due à la désorption des métaux des algues.

2.3.2. Echantillonnage lors du pulse-chase feeding

Tout au long de l'expérience, des échantillons d'eau, d'algues, de fèces, de pseudo-fèces et *in fine* de moules ont été prélevés.

Pendant la période de contamination des algues, des échantillons d'eau de 10 mL chacun sont filtrés à l'aide d'un filtre seringue de porosité 0,45 µm afin de récupérer la phase dissoute. Deux échantillons d'algues ont également été prélevés à chaque temps de prélèvement. Les deux échantillons résultent de la filtration de 20 mL d'eau sur un filtre PC de diamètre 4,7 cm préalablement pesé. Le filtre a ensuite été mis au dessiccateur pendant minimum 12h à 60°C, avant d'être à nouveau pesé afin de déterminer le poids sec des algues. Un des deux échantillons a été rincé une seule fois avec de l'EDTA (3 $mmol.L^{-1}$ a pH = 7) pendant 10 min, pour finalement être filtré à l'identique des algues non rincées à l'EDTA. Ce double échantillonnage est une méthode qui repose sur l'utilisation de l' EDTA (ce n'est pas la seule) qui permet de quantifier la part totale de métaux sur les algues et également la part de métaux internalisés (algues rincées à l'EDTA) (Hassler *et al.*, 2004), ce qui permet d'en déduire l'efficacité de contamination des algues.

Les échantillons d'eau, de fèces et de pseudo-fèces ont été récoltés tout au long de l'exposition et de la dépuration. Les temps de prélèvement sont les suivants : t=1h30, t=5h, t=8h, t=22h, t=31h et t=48h. Les échantillons d'algues ont, quant à eux, été récoltés uniquement en début et en fin d'exposition (après 1h30) et en fin de d'épuration (Tableau 8). En fin d'exposition, les moules ont été rincées, prélevées et finalement disséquées afin de récupérer les tissus mous. Le byssus a été enlevé.

L'ensemble de ces échantillons a été analysé en métaux à l'ICP-MS (LSCE, Gif-sur-Yvette) afin d'étudier le transfert des métaux des particules contaminées vers les matrices organiques (moules et déjections des moules).

Tableau 8 : Liste et caractérisation des échantillons collectés lors du pulse-chase feeding.

Type d'échantillon	Temps de prélèvement			Type de matrice	Objectif
	Contamination des algues	**Exposition : 0 à 1h30**	**Exposition et épuration : 1h30 à 48h**		
Algues	Dopage Avant rinçage Après rinçage	1h30	48h	Organique	Dopage efficace des algues
Fèces et pseudo-fèces		1h30	5h, 8h, 22h, 31h et 48h	Organique	Suivre la dépuration des moules
Eau filtrée	Dopage Avant rinçage Après rinçage	1h30	5h, 8h, 22h, 31h et 48h	Eau filtrée à 0,4 µm	Vérifier la faible désorption des métaux des algues
Tissus mous		1h30 après exposition de l'eau filtrée	48h	Organique	Suivre la bioaccumulation
Eau de rinçage		1h30	48h	Eau acidifée à 10%	Quantifier l'adsorption des métaux sur les parois des béchers
Coquilles des moules			48h	Riche en calcium	Quantifier l'adsorption des métaux sur les coquilles des moules

Des échantillonnages supplémentaires de contrôle ont été réalisés : les parois des béchers utilisés en fin d'exposition et les coquilles des moules ont été rincées à l'aide d'une solution d'eau ultra pure, acidifiée à 10 % avec du HNO_3 (Suprapur 65% Merk, France). Les analyses supplémentaires des échantillons de contrôle ont permis de vérifier que les métaux n'étaient pas fixés sur les coquilles de moule, ni sur les parois des béchers (Tableau 8) et de réaliser un bilan de masse (Annexe n°1).

2.4. Préparation des échantillons et analyses

Dans le but de limiter la contamination métallique lors des manipulations, avant toute expérimentation, les contenants ont été rincés à l'aide d'une solution d'$HN0_3$ à 10 % pendant une nuit, puis rincés 3 fois à l'eau ultra pure avant d'être séchés sous hotte dans la salle propre du laboratoire. Le matériel de laboratoire ainsi que les contenants utilisés sont en polypropylène ou en téflon. Les prélèvements d'eau ont été acidifiés à 1 % avec du HNO_3 (Merck Suprapur 65 %, France). L'ensemble des échantillons solides de fèces, pseudo-fèces, tissus de dreissène et particules de nourriture a été lyophilisé, pesé puis minéralisé. La minéralisation des échantillons a été faite par DigiPrep®, dans des tubes de 50 mL en polypropylène (Sarsted) avec ajouts successifs de 2 mL d'HNO_3 à 65 % et 2mL d'H_2O_2 sur les 80 mg de tissus de dreissène utilisés lors de l'analyse sur la centaine de mg qui résultent de la minéralisation/broyage des 5 moules (Bourgeault *et al.*, 2011), et avec ajout d'HNO_3/HCl et d'H_2O_2 dans le cas des fèces, pseudo-fèces et nourriture (Lottin, 2009). Des matériaux de référence ont été utilisés : tissus de moule ERM-CE 278 (European Reference Material) et bryophytes B.C.R n°60 (Bureau Community of Reference, B.C.R) afin de s'assurer de la validité du protocole de minéralisation des moules, des algues et des fèces.

Les échantillons ont été analysés par ICP-MS (ThermoFisher Scientific, XII Serie) au laboratoire LSCE (Gif-sur-Yvette) pour l'ensemble des isotopes des éléments étudiés ; ^{50}Cr, ^{52}Cr, ^{53}Cr et ^{54}Cr, puis ^{58}Ni, ^{60}Ni, ^{61}Ni et ^{62}Ni, puis ^{63}Cu et ^{65}Cu, puis ^{66}Zn, ^{67}Zn, ^{68}Zn et ^{70}Zn et enfin ^{106}Cd, ^{108}Cd, ^{110}Cd, ^{111}Cd, ^{112}Cd, ^{113}Cd et ^{114}Cd. Afin de s'affranchir d'éventuelles variations de sensibilité de l'ICP-MS, les échantillons ont été dopés en étalon interne (Germanium, Ge) à 1 $\mu g.L^{-1}$ avant analyse. Afin de limiter toutes interférences poly-atomiques l'ICP-MS a été utilisée dans la configuration CCT (technologie de la cellule à collision) avec le gaz à collision He/H_2 (7,5 %). L'intérêt de la CCT dans ce type de suivi a été montré lors des travaux précédents (Pellet, 2009). Le matériel certifié d'eau de rivière, SRM 1640a (NIST) (Standart Reference Material, USA), a été utilisé afin de contrôler la fiabilité de l'analyse.

2.5. Traitement des données

Les données extraites des mesures de l'ICP-MS en mode CCT sont des concentrations en isotopes métalliques totales. Les valeurs mesurées en mode CCT permettent de travailler avec des limites de quantification (LQ) faibles (moyenne de 3 échantillons témoins). Elles sont de 0,002 ± 0,001 $\mu g.L^{-1}$ (n=3), 0,70 ± 0,012 $\mu g.L^{-1}$ (n=3), 0,30 ± 0,02 $\mu g.L^{-1}$ (n=3), 0,16 ± 0,009 $\mu g.L^{-1}$ (n=3) et 0,80 ± 0,08 $\mu g.L^{-1}$ (n=3) pour les isotopes du Cd, du Cr, du Cu, du Ni et du Zn respectivement.

Les concentrations en isotopes métalliques mesurées sont des données brutes alors que nous souhaitons, au final, obtenir des concentrations en isotopes nets dans chaque échantillon analysé. Les concentrations brutes sont la somme des isotopes naturels (initialement présents dans les matrices) et des isotopes nouvellement ajoutés par dopage ou isotopes nets. Il a donc été nécessaire de soustraire aux mesures brutes les concentrations en isotopes naturels afin d'obtenir les teneurs nettes en isotopes ajoutés.

La méthode de calcul de la teneur en isotopes naturels dans un échantillon utilisée pour déduire les teneurs nettes en isotopes ajoutés est celle proposée par Croteau (2007).

Le traitement des données, nécessaire pour arriver à des concentrations en isotopes nets ou isotopes ajoutés, se fait en plusieurs étapes. La première étape permet de déterminer le ratio de chaque isotope en divisant la concentration de l'isotope du métal par la somme des concentrations de la totalité des isotopes de ce métal. Ce ratio est noté p^i, avec i le nom de l'isotope considéré. Il est calculé dans les échantillons standards, donc non impactés par le dopage, pour chaque matrice. Ensuite, si les ratios calculés sont très différents des ratios naturels, ce qui peut être dû aux interférences, l'isotope considéré est retiré des calculs et les ratios calculés sont utilisés lors des calculs à la place des ratios naturels. La seconde étape consiste, à l'aide de ces ratios isotopiques calculés, à définir la quantité nette en isotopes ajoutés par dopage, par soustraction de la quantité naturelle en isotopes à la quantité totale ou mesurée.

Voici un exemple de calcul pour le ^{53}Cr :

$$Quantité\ de\ {}^{53}Cr_{\ ajouté} = Quantité\ de\ {}^{53}Cr_{\ total} - Quantité\ de\ {}^{53}Cr_{\ naturel} \quad (9)$$

La quantité de ^{53}Cr naturel a été calculée en prenant en compte la quantité de ^{52}Cr qui est l'isotope majoritaire du Cr et le ratio mesuré de ^{53}Cr i.e. :

$$Quantité\ de\ {}^{53}Cr_{\ naturel} = p^{{}^{53}Cr} \times Quantité\ de\ {}^{52}Cr_{total} \quad (10)$$

En remplaçant l'équation 9 dans l'équation 10, la relation suivante est obtenue :

$$Quantité\ de\ {}^{53}Cr_{\ ajouté} = p^{{}^{53}Cr} \times Quantité\ de\ {}^{53}Cr_{total} - p^{{}^{53}Cr} \times Quantité\ de\ {}^{52}Cr_{total} \quad (11)$$

La troisième étape permet de prendre en compte les interférences, à l'aide de facteurs de correction. En effet, il a été observé pour certaines matrices et certains isotopes que les teneurs mesurées dans les matériaux de référence pouvaient être surestimées ou sous-estimées par rapport aux teneurs théoriques.
Par exemple, le zinc mesuré dans l'eau sur ^{67}Zn est surestimé de 20 %. Et le cadmium mesuré dans les algues témoins sur ^{106}Cd est surestimé de 200 % (voir Tableau 10).
Des facteurs de correction, qui ramènent les valeurs obtenues aux valeurs certifiées, ont été appliqués aux isotopes concernés. Ce facteur est de 1,17 (±0,02, n=11) pour la matrice eau dans le cas du ^{67}Zn et est de 3,44 (±1,46, n=2) pour le ^{106}Cd pour les algues.

Le traitement des données brutes afin d'évaluer la part de chaque isotope ajouté dans chaque échantillon est très lourd mais est indispensable pour s'affranchir des interférences (Croteau and Luoma, 2008).

2.6. Formules de calcul de l'ingestion des particules et de l'efficacité d'assimilation des métaux

La méthode de calcul utilisée, dans le but d'évaluer l'IR, repose sur l'utilisation d'un traceur. Cette approche est à privilégier lorsque la nourriture est composée de matières en suspension, dont la disparition peut être difficile à quantifier généralement (Chapitre 1, paragraphe 4.2.3.).

Le traceur est un élément non assimilé par l'organisme. Dans notre cas, il peut également l'être. Il suffit seulement que ce traceur soit mesurable dans l'organisme et dans les excrétions. La méthode indirecte d'estimation de l'IR repose sur le principe de conservation de la masse. Ainsi appliqué dans ce cas, tout ce qui est ingéré est la somme de ce qui est excrété et assimilé par l'organisme. Dans notre cas, il y a différents traceurs ; ce sont les isotopes ajoutés. L'IR du dopage a été calculé de différentes manières, c'est-à-dire en utilisant chaque isotope : ^{53}Cr, ^{62}Ni, ^{65}Cu, ^{67}Zn et ^{106}Cd ce qui permet différentes approches de mesure de l'IR afin d'améliorer son évaluation.

L'IR ($g.g^{-1}_{poids\ sec\ des\ tissus\ mous}.j^{-1}$) a été calculé en faisant le rapport de la quantité totale d'isotopes excrétés dans les fèces durant le pulse (Σ $isotopes_{fèces}$) (µg) et de la quantité d'isotopes retrouvés dans les tissus mous en fin de chase ($isotopes_{moules}$) (µg) sur la quantité d'istotopes par gramme d'algues ($isotope/m_{algues}$) ($\mu g.g^{-1}_{algues}$) , le tout divisé par le poids sec des moules (W_{moules}) (g) et le temps (j). L'IR est donc calculé selon l'équation suivante :

$$\mathrm{IR}_{\mathrm{isotope}} = \frac{\left(\frac{\sum isotope_{\mathrm{f\grave{e}ces}} + isotope_{\mathrm{moules}}}{\frac{isotope}{m_{algues}}} \right)}{\mathrm{W}_{\mathrm{moules}} \times temps} \qquad (12)$$

Ensuite, pour chaque métal, l'efficacité d'assimilation (AE) (%) a été calculée en utilisant la méthode de calcul proposée par Croteau (Croteau and Luoma, 2008; Croteau *et al.*, 2013). L'AE a été calculé comme étant le rapport entre la quantité d'isotopes retrouvés dans les tissus mous des moules (ng) après la dépuration sur la somme des métaux retrouvés dans les organismes et excrétés (fèces et pseudo-fèces) (ng).

Voici le calcul avec ^{65}Cu :

$$AE_{^{65}Cu}(\%) = \frac{^{65}Cu_{moules}}{^{65}Cu_{moules} + ^{65}Cu_{fèces} + ^{65}Cu_{pseudo\,fèces}} \qquad (13)$$

Les IR et AE ont été calculés pour 5 individus regroupés.

En conclusion, la méthode du pulse-chase feeding avec des isotopes radioactifs a été testée en laboratoire sur 5 métaux différents, cadmium, chrome, cuivre, nickel et zinc et avec un seul type de particule, une particule algale : *Pseudokirchneriella subcapitata* ainsi que sur un bivalve filtreur d'eau douce : *Dreissena polymorpha*.

Par rapport aux méthodologies existantes, le temps de contact entre les métaux et les particules a été allongé (8 jours au lieu de 24h) et la période de contact a été choisie avec soin, afin de faciliter une internalisation optimale des métaux par les cellules algales.

Enfin, le traitement des résultats, générés par l'ICP-MS, en plusieurs étapes a permis de s'affranchir au maximum des interférences générées par l'analyse.

3. Résultats et discussion

La méthodologie innovante du pulse chase-feeding associée aux isotopes stables n'a encore jamais été étudiée avec des bivalves. Seuls, les isotopes radioactifs ont jusqu'à aujourd'hui été utilisés sur ces organismes filtreurs. Cette méthodologie a seulement été testée sur un invertébré non filtreur (*Limnae stagnalis*).

Cette méthode prometteuse s'est malheureusement révélée assez compliquée à la fois à cause de problèmes analytiques (limites méthodologiques) mais également en raison de la complexité des organismes étudiés et à une trop forte concentration en chrome dans les particules qui a pu biaiser les résultats. Les résultats obtenus et présentés sont donc à prendre avec précautions et serviront de base afin d'améliorer à l'avenir cette méthode, pour pouvoir à terme l'utiliser en routine au laboratoire avec ces moules.

3.1. Difficultés analytiques rencontrées

Lors du traitement des données, une variation du ratio isotopique par rapport au ratio naturel a été constatée. L'étape de traitement des données consiste à définir la quantité nette ou la quantité d'isotope ajoutée par dopage par opposition à la quantité mesurée.

La variation du rapport isotopique est dépendante du métal mais aussi de la matrice considérée. Ce ratio étant nécessaire dans les calculs, l'écart par rapport au ratio naturel a été mis en évidence pour chaque matrice (Tableau 9).

Tableau 9 : Comparaison des moyennes du rapport isotopique pour chaque matrice avec le rapport isotopique naturel.

% isotopiques	^{53}Cr	^{62}Ni	^{65}Cu	^{67}Zn	^{106}Cd
% naturel	9,50	3,63	30,83	4,10	1,25
% mesuré matrice eau (n=3)	11,57±0,86	4,13±0,13	33,31±0,21	5,09±0,46	1,67±3,21
% mesuré matrice algues (n=2)	14,94±0,83	5,27±0,17	35,95±0,99	4,45±0,10	3,06±1,18
% mesuré matrice fèces (n=11)	10,52±0,08	4,51±0,07	33,47±0,23	4,46±0,17	1,40±0,70
% mesuré matrice moule (n=1)	14,13	4,15	44,62	4,69	1,73

Cette déviation observée sur des matrices non dopées met en évidence les interférences lors de l'analyse des échantillons par l'ICPMS. Ces interférences ne sont pas totalement corrigées et sont dépendantes de l'isotope considéré et également de la matrice.

Ces interférences se répercutent sur l'évaluation du métal présent dans les matériaux de référence (Tableau 10) : une forte déviation a été constatée pour le cadmium dans la matrice algue et pour le zinc dans la matrice eau. Ces déviations sont liées aux valeurs de pourcentages isotopiques qui s'éloignent des valeurs naturelles (Tableau 9). Ainsi, ces déviations ont été corrigées grâce aux facteurs de correction (évoqués dans la section 2.5.).

Ces étapes alourdissent le calcul des isotopes nets ajoutés.

Tableau 10 : Evaluation des teneurs en ug.L^{-1} des métaux par différents isotopes. Mise en évidence des déviations de mesure observées (en gras) en fonction de l'isotope utilisé et de la matrice pour l'évaluation de la teneur en métal total dans des échantillons de références : matériaux de références (MR et 1640a NIST) et matrices non contaminées en métaux (moules propres, algues non dopées, fèces lors de la dépuration et eau non contaminée).

	^{114}Cd	^{111}Cd	^{112}Cd	^{106}Cd	^{67}Zn	^{66}Zn	^{64}Zn	^{65}Cu	^{63}Cu	^{62}Ni	^{60}Ni	^{53}Cr	^{52}Cr	n
% isotopiques naturelles	28,7 %	12.8 %	24,1 %	1,25 %	4,1 %	27,9 %	48,63 %	30,8 %	69,2 %	3,63 %	26,2 %	9,5 %	83,8 %	
Mesures MR	0,29	0,31	0,29	0,34	64,75	70,66	66,17	8,17	8,13	0,97	0,96	0,47	0,46	1
Valeurs certifiés MR		**0,348±0,007**				**83,1±1,7**		**9,45±0,13**		**Pas de ref**		**0,78±0,06**		
Mesure NIST 1640a	4,05	4,02	4,07	3,69	**67,0**	57,1	54,8	86,2	85,3	24,7	24,5	40,6	40,6	11
±	0,08	0,09	0,11	0,30	3,18	2,48	1,39	1,39	1,86	1,19	1,36	0,79	0,55	
Valeurs certifiées NIST		**3,961±0,07**				**55,20±0,32**		**85,07±0,48**		**25.12±0.12**		**40,22±0,28**		
Moules contrôles (Total)	0,42	0,44	0,43	0,49	43,0	40,1	40,9	5,19	5,19	3,00	3,24	0,46	0,43	1
Algues non dopées (Total)	0,47	0,45	0,46	**1,10**	5,03	5,50	5,30	1,42	1,26	3,95	3,28	6,51	4,30	2
±	0,33	0,31	0,31	0,40	0,75	0,58	0,57	0,46	0,46	1,38	0,09	8,25	2,62	
Fèces (dépuration) (Total)	0,85	0,84	0,84	0,75	4,85	5,25	5,08	2,56	2,50	3,34	3,28	5,35	5,29	5
±	0,57	0,53	0,53	0,58	3,36	3,68	3,44	2,46	2,40	2,31	2,33	3,14	3,06	

Malgré toutes les précautions prises, il s'avère que les calculs réalisés afin de définir les valeurs en isotopes nettes ajoutées, aboutissent à des valeurs négatives. Ce résultat n'a pas de sens. Il explicite en fait un problème de bilan de masse non équilibré qui ne permet pas d'exploiter les résultats (Annexe n°1).

Ces résultats peuvent s'expliquer par (1) des biais apportés par les variations naturelles des rapports isotopiques observés selon les différentes matrices mais aussi (2) par les limites basses avec lesquelles nous avons travaillé. En effet, le dopage des algues en isotopes est minime et de surcroît les moules n'ont, semble-t-il, que peu assimilées les particules et donc les isotopes.

Toutes ces difficultés rencontrées lors du traitement des données nous obligent à être très prudent lors de l'exploitation et l'interprétation des résultats.

3.2. Contamination de la nourriture

Les contaminations finales en isotopes retrouvées dans les algues à la fin du dopage, réalisé sur 8 jours, et celles du milieu de dopage qui a permis cette contamination sont résumées dans les tableaux ci-dessous (Tableau 11 et Tableau 12) :

Tableau 11 : Concentrations finales en isotopes mesurées dans les algues dopées et témoins (µg.g^{-1}) après 8 jours de dopage

Teneurs en métaux	Contamination attendue des algues (µg.g^{-1})	Contamination finale des algues dopées (µg.g^{-1})	Contamination finale des algues non dopées (µg.g^{-1})
^{53}Cr	12-14	186,00	5,00
^{62}Ni	18-20	18,40	1,00
^{65}Cu	38-40	54,10	2,60
^{67}Zn	12-15	0,80	-
^{106}Cd	1-3	1,10	<0,08

-Teneurs non quantifiables

Finalement, les teneurs en métaux du milieu de dopage des algues, (Tableau 12) sont plus fortes pour le ^{53}Cr et plus faibles pour le ^{67}Zn que les valeurs environnementales. Ces résultats sont dus à des erreurs de manipulation lors du dopage du milieu de contamination des algues.

Les teneurs des autres métaux sont supérieures d'un facteur 10 par rapport aux teneurs naturelles. Ces fortes teneurs permettent, en 7 jours de contamination des algues,

d'engendrer une contamination représentative des algues, qui naturellement peuvent s'enrichir en métaux sur plusieurs semaines, donc sur un pas de temps plus long.

Tableau 12 : Concentrations finales en isotopes dans le dissous ($\mu g.L^{-1}$) *dans le milieu de dopage des algues comparativement aux teneurs retrouvées dans le dissous sur des sites de la Seine et de l'Orge.*

Teneurs en métaux dissous ($\mu g.L^{-1}$)	**Environnement naturel**		**Teneurs dans le milieu de dopage des algues (isotopes)**
	Seine*	**Orge****	
Cr	0,15-0,19	0,22-0,32	185,00
Cu	1,25-2,54	0,22-1,85	9,00
Ni	0,9-2,1	1,25-1,95	18,20
Cd	0,02-0,04	0,015-0,066	2,00
Zn	ND	3,03-9,31	0,07

Références : *(Thévenot *et al.*, 2009; Priadi *et al.*, 2011b),**(Bourgeault *et al.*, 2010b), ND : non déterminé

Afin d'évaluer l'impact de fortes teneurs en ^{53}Cr sur la croissance des algues, deux échantillons d'une même solution d'algues aux concentrations initiales de $1{,}9.10^{6}$cellules.mL^{-1} $\pm 0{,}3.10^{6}$cellules.mL^{-1} (mesure avec la cellule de Malassez) ont été exposés soit à un milieu ASM1, soit à un milieu ASM1 dopé à 185 $\mu g.L^{-1}$ de ^{53}Cr pendant 7 jours. Après 7 jours, les teneurs en algues ont été évaluées, comme décrit précédemment. La variabilité de mesure est de 30 % pour un même échantillon (vérifié dans le cas des deux échantillons). Elle est due au fait que la solution est non homogène. Ainsi, les résultats de la croissance sont présentés dans le graphique ci-dessous avec un écart type de 30 % (Figure21).

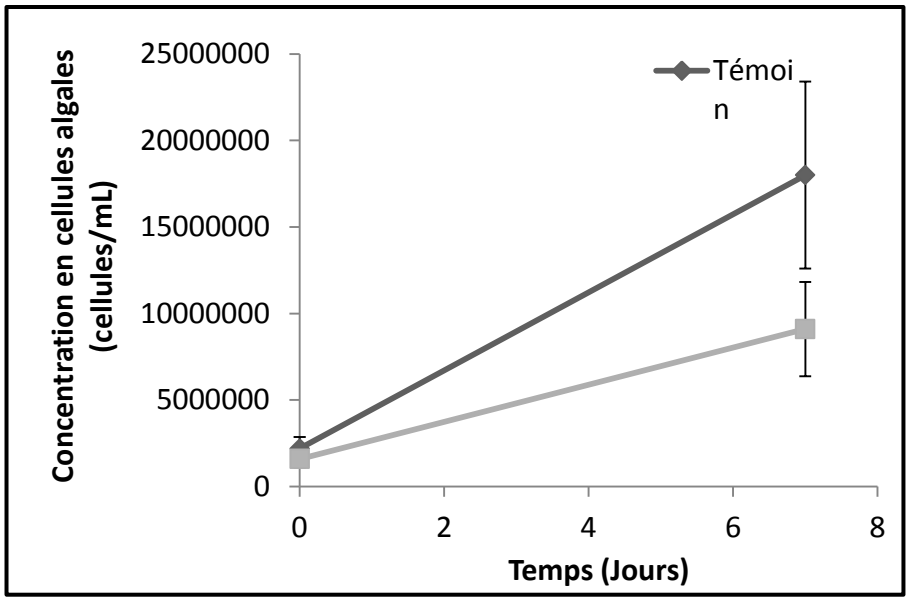


Figure 21 : Evolution de la croissance des algues en absence (Témoin) et en présence de ^{53}Cr (Dopée) sur 7 jours. Chaque point est une valeur et l'écart type est la valeur de la variabilité de la mesure.

Un seul bécher par condition a été testé, il n'est donc pas possible de réaliser de test statistique. Au regard des résultats, il semble que le chrome ait légèrement impacté la croissance des algues. Selon la bibliographique une étude (Rodgher *et al.*, 2012) a évalué l'impact du Cr^{6+}sur *Pseudokirchneriella subcapitata* sur 96h au travers de l'évaluation de l'IC_{50}. L'IC_{50} est la teneur qui inhibe 50 % de la croissance des algues. Il est compris entre 5 600 et 7200 $\mu g.L^{-1}$. La valeur de 150 $\mu g.L^{-1}$ avec laquelle nous avons travaillé est donc 50 fois plus petite que l'IC50 obtenu par Rodgher (2012), qui a, de plus, travaillé avec le chrome VI qui est la forme la plus toxique du chrome. Et, les valeurs de pH du milieu étant égales à 8, dans notre expérience, le chrome est sous la forme du chrome III, d'après son diagramme potentiel-pH. Cette étude montre qu'évaluer l'impact du chrome sur la croissance des algues n'est pas simple et ne dépend pas seulement de la concentration en chrome mais peut être aussi des caractéristiques du milieu d'exposition et surtout du type de chrome dans le milieu (CrVI ou CrIII) (toxicité différente).

Pour la contamination du zinc, sa trop faible concentration(<LQ) nous a conduits à ne pas analyser les résultats concernant cet élément pour la suite.

La baisse de contamination des algues entre le début et la fin du pulse n'est pas significative au regard de la variabilité de la mesure (Tableau 12 et 13). Cependant, une faible désorption des métaux vers le dissous est avérée car une contamination du milieu dissous non négligeable et significative, comparée au milieu témoin, a été constatée (Figure 22).

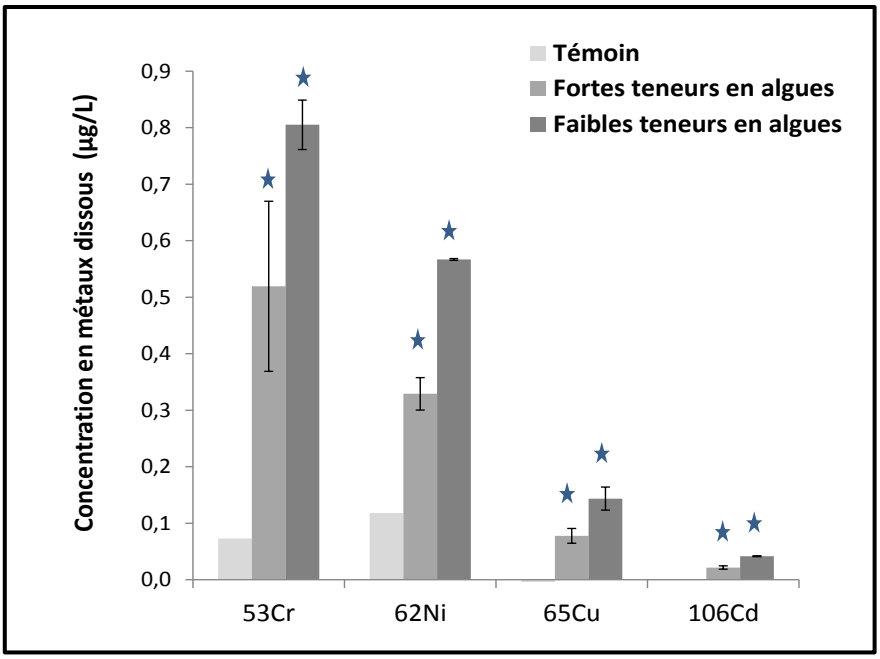


Figure 22 : Concentrations moyennes en métaux retrouvées dans la phase dissoute pour chaque condition ; témoin : algues non dopées (barre grise claire), faible teneur en algues 8 mg.L^{-1} (barre grise) et forte teneur en algues 15 mg.L^{-1} (barre grise foncée). Les écarts types (n=3) sont représentés par les lignes et les moyennes significativement différentes sont signalées par des étoiles (Test de Student, p<0,05).

Il semble donc qu'il ne soit pas possible de s'affranchir totalement d'une désorption des métaux dans le milieu malgré une très faible part de métaux adsorbés sur les parois des cellules. Lors du plan d'expérimentation, ce paramètre est à prendre en compte. Il est dû au transfert naturel des métaux d'une phase contaminée (les algues) vers un milieu non contaminé (la phase dissoute) par équilibre osmotique.

Notons que le niveau de contamination des particules est représentatif des teneurs retrouvées en Seine et sur l'Orge sur les MES en ce qui concerne le cadmium, le cuivre, le chrome et le nickel (Tableau 13). Ce n'est pas le cas du zinc, les particules sont trop faiblement contaminées par rapport aux teneurs naturelles.

Tableau 13 : Concentrations finales en métaux dans les particules ($\mu g.g^{-1}$) *en fin du pulse comparativement aux teneurs retrouvées dans des particules le long de la Seine et de l'Orge.*

Teneurs en métaux particulaires ($\mu g.g^{-1}$)	**Environnement naturel**		**Expérience du pulse-chase (teneurs en fin de pulse sauf dans le cas du Zn)**
	Seine*	**Orge****	
Cr	18,0-109,3	50-250	186,4 ± 26
Cu	13,5-185	30-160	67,3 ± 7,3
Ni	10,0-40,2	ND	13,6 ± 2
Cd	0,2-8,0	ND	1,2 ± 0,5
Zn	100-694	300-2000	<LD

Références : *(Tusseau-Vuillemin *et al.*, 2007; Thévenot *et al.*, 2009; Priadi *et al.*, 2011a),**(Le Pape *et al.*, 2012), ND : non déterminé et LD=0,11$\mu g.L^{-1}$ soit 2 $\mu g.g^{-1}$.

Les valeurs en cadmium et en nickel sont dans les fourchettes basses de contamination naturelle, la valeur en cuivre est intermédiaire et la valeur en chrome est dans la fourchette haute.

De plus, si l'efficacité de contamination des algues est comparée à celle obtenue dans la littérature, il est constaté que la contamination en cadmium avec de faibles teneurs initiales dans le milieu de contamination est un succès, car avec seulement 2 $\mu g.L^{-1}$ de cadmium il a été possible de contaminer les algues à 1,2 $\mu g.g^{-1}_{poids\ sec}$, ce qui n'avait pu être réalisé auparavant qu'avec des teneurs minimales de 20 $\mu g.L^{-1}$ (Sofyan *et al.*, 2006; Geffard *et al.*, 2008). Le facteur de concentration (Bioconcentration Factor, BCF) ($L.kg^{-1}_{poids\ sec\ algues}$) est calculé comme le rapport de la concentration en métal dans les algues sur la concentration en métal dans le milieu. Le BCF du cadmium dans notre expérience est plus élevé que dans l'étude de Sofyan et *al.* 2006 (Sofyan *et al.*, 2006), qui travaille avec des teneurs en cadmium dans le milieu d'exposition proches des nôtres à 5 $\mu g.L^{-1}$ sur 4 jours et qui obtient un BCF de seulement 100 $L.kg^{-1}_{poids\ sec\ algues}$ alors que nous obtenons un BCF égal à 610 $L.kg^{-1}_{poids\ sec\ algues}$. Cette différence peut s'expliquer par une exposition plus longue des algues au milieu contaminé ; 7 jours contre 4 jours. Les BCF obtenus pour le ^{53}Cr, le ^{62}Ni, le ^{65}Cu et le ^{67}Zn sont respectivement de 1 005, 1 015, 6 034 et 11 143 $L.kg^{-1}_{poids\ sec\ algues}$. Si les BCFs sont comparés à la littérature, une seule étude à notre connaissance (Komjarova and Blust, 2009a) a réalisé une contamination multi métallique de ces algues sur 7 jours, avec du plomb à la place du chrome et des teneurs initiales en métaux du milieu de dopage différentes. Malgré tout, les

BCFs de notre étude, classés les uns par rapport aux autres Zn>Cu>Cr=Ni>Cd suivent la même tendance que l'étude de Komjarova et Blust (2009a) : Cu>Zn>Pb>Cd>Ni. Ainsi la contamination des algues semble possible même avec de faibles teneurs en métaux dans le milieu de dopage.

De plus, ce protocole a permis une contamination efficace des particules (Tableau 14).

Tableau 14 : Comparaison des teneurs en métaux internalisés et externalisés par conditions ; conditions 8 : valeur moyenne des teneurs pour les 3 réplicats avec 8mg.L^{-1} d'algues, entre parenthèses l'écart type et condition 15 : idem pour les réplicats avec 15mg.L^{-1} d'algues ; dans les algues avant et après le pulse.

		Avant le pulse				
	Teneurs (µg.g^{-1})	**^{53}Cr**	**^{62}Ni**	**^{65}Cu**	**^{67}Zn**	**^{106}Cd**
Solution mère d'algues	**Part intracellulaire**	185,91	18,43	54,06	0,78	1,13
	Part extracellulaire	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00
	Teneurs (µg.g^{-1})	**Après le pulse**				
		^{53}Cr	**^{62}Ni**	**^{65}Cu**	**^{67}Zn**	**^{106}Cd**
Condition 8	**Part intracellulaire**	160,23 (42,69)	11,53 (3,36)	60,06 (10,44)	1,74 (1,14)	0,73 (0,66)
	Part extracellulaire	48,99 (69,29)	3,60 (5,08)	10,78 (15,25)	0,00 (0,00)	0,80 (0,59)
Condition 15	**Part intracellulaire**	212,48 (7,46)	15,64 (0,42)	74,60 (3,60)	0,96 (0,29)	1,68 (0,09)
	Part extracellulaire	3,39 (5,87)	0,00 (0,00)	0,00 (0,00)	0,15 (0,20)	0,00 (0,00)
	Teneurs (µg.g^{-1})	**Moyenne**				
		^{53}Cr	**^{62}Ni**	**^{65}Cu**	**^{67}Zn**	**^{106}Cd**
Moyenne métaux intracellulaires (Ecart type)(n=3)		186,21 (21,33)	15,20 (2,83)	62,91 (8,62)	1,16 (0,42)	1,18 (0,39)
Moyenne métaux extracellulaires (Ecart type)(n=3)		17,46 (22,34)	1,20 (1,69)	3,59 (5,08)	0,05 (0,07)	0,27 (0,38)
Ratio (fin de pulse)		7,12	7,56	12,50	18,29	3,00

Le ratio internalisation/absorption des métaux est systématiquement supérieur à 2, et il est possible de faire deux groupes. Le groupe contenant les métaux non essentiels avec un ratio inférieur à 10 : 7,1, 7,6 et 3,0 pour le chrome, le nickel et le cadmium et celui comprenant les métaux essentiels avec un ratio supérieur à 10 : 12,5 et 18,3 pour le cuivre et le zinc. Ainsi la part de métaux internalisée est supérieure à la part simplement adsorbée.

De plus, il a été constaté lors du pulse de faibles pourcentages de désorption des métaux particulaires vers la fraction dissoute, entre et 20 et 50 % (cadmium) pour les métaux non essentiels et un pourcentage inférieur à 15 % pour les métaux essentiels.

Ce constat confirme que le protocole utilisé dans l'expérience est pertinent puisqu'il a permis la contamination des algues par les 4 métaux à des teneurs environnementales en utilisant des teneurs en métaux, dans le milieu, proches des concentrations retrouvées dans des cours d'eau (Seine et Rhône) (Elbaz-Poulichet *et al.*, 2006; Tusseau-Vuillemin *et al.*, 2007; Ollivier *et al.*, 2011) avec une forte internalisation des métaux et une désorption limitée.
La forte internalisation est intéressante puisque dans la littérature, une corrélation entre la présence de métaux dans le cytoplasme des cellules et une biodisponibilité améliorée (comparé à lorsque les métaux sont simplement adsorbés) a été mise en évidence entre des phytoplanctons contaminés et des éphémères (Cain *et al.*, 2011). Ainsi une forte internalisation des métaux par les algues nous met dans une situation optimale pour comprendre les processus qui gouvernent la biodisponibilité.
Les bons résultats de la contamination des particules ne doivent pas faire oublier qu'il peut y avoir une contamination de la phase dissoute, qui même faible, est à prendre en compte. De ce fait, les organismes ne seront pas uniquement exposés à la contamination métallique par voie trophique mais aussi par voie dissoute (paragraphe 3.5.3.).

3.3. Suivi de l'excrétion des particules

Les métaux sont tous excrétés selon la même cinétique. Un pic d'excrétion est observé avant 1h30 ou vers 5h (variabilité suivant les béchers) et comprend la majorité de l'excrétion puis l'excrétion se termine lentement jusqu'à 48h (Figure 23).

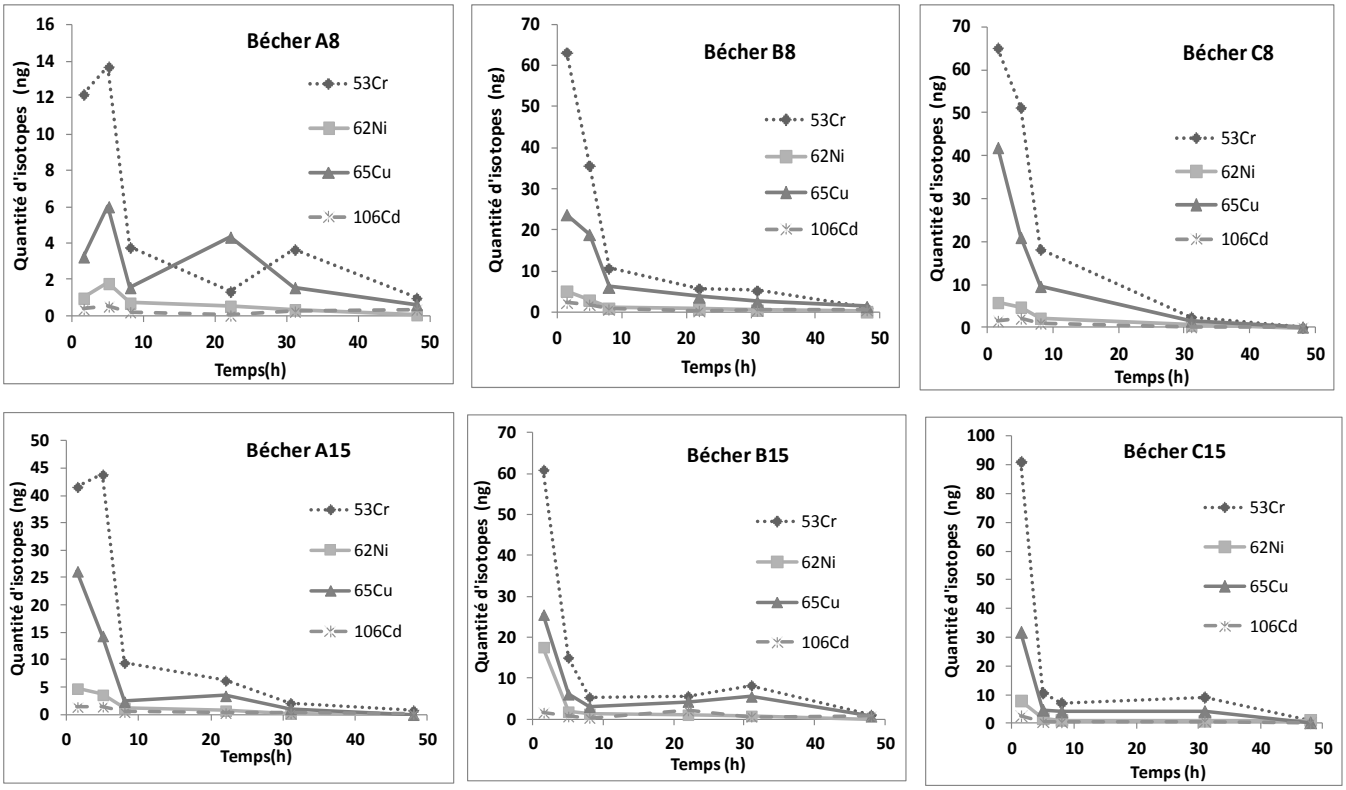


Figure 23 : Courbes d'excrétion des métaux (ng) non assimilés fèces et pseudo-fèces par bécher et par métal.

Cette cinétique d'excrétion est représentative de la digestion par voie rapide chez les bivalves. Seul le bécher A8 présente une excrétion en deux temps, avec deux pics à 4h et 30h et 4h et 22h respectivement dans le cas du chrome et du cuivre, qui est la signature d'une digestion par voie lente (Nalepa and Schloesser, 1993). Cette voie lente est supposée être la voie qui entraine une plus forte assimilation des métaux.

Le suivi de la manière dont les moules zébrées excrètent les particules renseigne directement sur le transfert des contaminants dans les organismes. Le temps de passage dans le tractus ou GPT (Gut Passage Time), qui est le temps nécessaire afin de réaliser l'excrétion de 90 % des fèces (Figure 24), est suivi car il informe sur la vitesse à laquelle les métaux transitent et cela peut renseigner sur l'efficacité d'assimilation notamment (Roditi and Fisher, 1999). Cependant aucune corrélation n'a encore été faite.

Les valeurs de GPT obtenues ne sont pas significativement différentes entre les métaux, ni entre les conditions (Test de Student) (Figure 24). En valeur absolue, le cadmium a le plus fort GPT 28 h (± 7,7, n=6) et le chrome a le plus faible 15 h (± 6,9, n=6). Et les valeurs d'excrétions moyennes ne sont pas différentes entre les deux modalités (faibles teneurs en algues et fortes teneurs), ainsi les moyennes des GTPs et des quantités de métaux excrétés

pour les deux modalités sont représentées à chaque pas de temps (Figure 24). Ces résultats permettent de dire que le transfert des métaux dans les organismes a été complet, les organismes ont donc correctement ingérés les particules contaminées. Le transfert a été globalement identique pour les métaux et relativement rapide (excrétion de la voie rapide majoritaire). Cependant le transfert a été moins rapide comparé à une étude (Roditi and Fisher, 1999) où les valeurs de GPT dans le cas du cadmium et du chrome sont plus faibles que nos valeurs ; elles sont respectivement de 4, 7 et 3 h. Ce suivi a permis de s'assurer que les métaux avaient correctement transité dans les organismes.

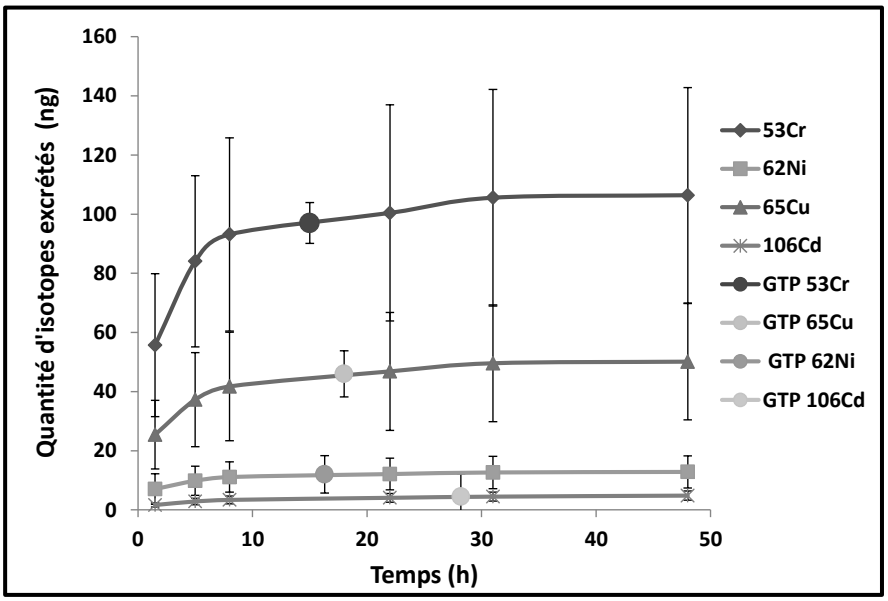


Figure 24 : Quantités cumulées de métaux excrétés en fonction du temps, graphique qui permet de calculer le GPT, temps au bout duquel 90 % du métal a été excrété. La valeur moyenne (n=6 béchers) des GPTs en heure, pour chaque métal, est représentée par les points avec leur barre d'erreur (égale à l'écart type des valeurs des 6 béchers).

3.4. Évaluation du taux d'ingestion et évaluation de l'efficacité d'assimilation des métaux

Le taux d'ingestion est calculé pour les deux conditions, 8 $mg.L^{-1}$ et 15 $mg.L^{-1}$ d'algues, à partir de mesures de chacun des isotopes. Les moyennes des trois réplicats sont représentées par les barres et l'écart type par les lignes (Figure 25).

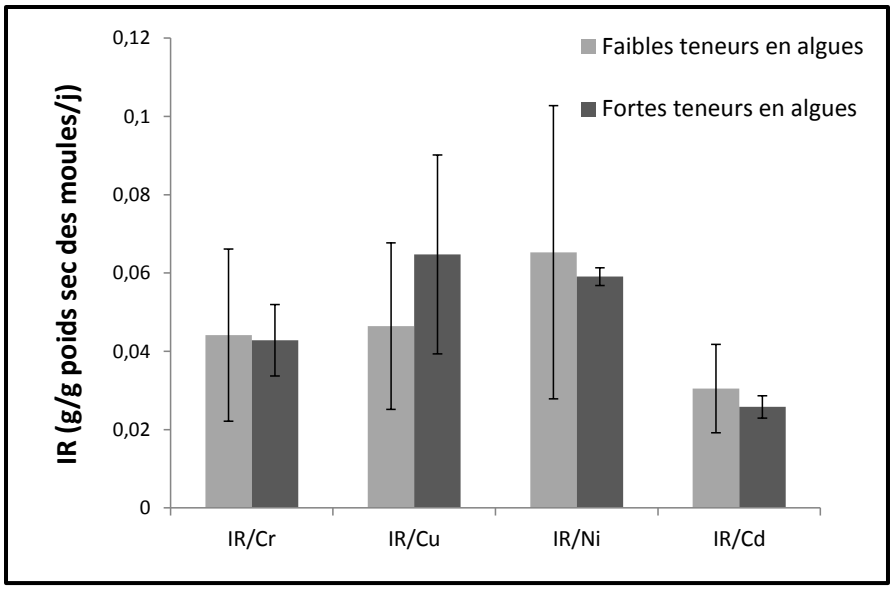


Figure 25 : Moyenne des IRs ($g.g^{-1}$ $_{poids\ sec\ des\ moules}$) calculée lors de chaque condition (n=3 réplicats) en utilisant les 4 isotopes : ^{53}Cr , ^{65}Cu , ^{62}Ni et ^{106}Cd.

La variation observée reflète les variations du comportement et de la physiologie des individus suivant les béchers (variabilité naturelle biologique). Cette variabilité supérieure à 50 % a déjà été observée par Bourgeault (2010).

Les valeurs d'IR ne sont pas significativement différentes entre les deux conditions et également suivant l'isotope choisi (Test Z). Le calcul d'IR quel que soit l'isotope choisi est reproductible. Ainsi n'importe quel isotope, qu'il soit finalement assimilé ou pas, peut servir de traceur afin d'évaluer le taux d'ingestion.

La moyenne globale de l'IR obtenu (n=24) est égale à 0,047 ± 0,027 $g.g^{-1}$ $_{poids\ sec\ des\ moules}.j^{-1}$.

C'est la seconde estimation d'un IR avec *D. polymorpha* en utilisant des isotopes stables (Bourgeault, 2010). Dans cette étude, l'IR moyen est de 0,52 ± 0,30 $_{poids\ sec\ des\ moules}.j^{-1}$ (n=8). Il est presque 10 fois plus grand que celui que nous obtenons et a été calculé pour une solution d'algue identique à la nôtre et également un mélange de cette algue avec différentes teneurs en kaolinite. Comparé à notre étude, l'étude de Bourgeault (2010) a exposé les moules aux particules pendant 2h au lieu d'1h30 et les particules étaient contaminées en 4 métaux (Cd, Cu, Cr et Ni) au lieu de 5 dans notre étude (même métaux plus le Zn). Ainsi la différence significative des valeurs d'IR entre les 2 études peut s'expliquer par le temps d'exposition plus long pour l'étude de Bourgeault (2010) ou par la plus forte teneur en chrome dans les particules, dans notre étude. Cette forte teneur pourrait entrainer une baisse de l'appétence des moules pour les particules contaminées en raison de leur toxicité (Borcherding and Wolf, 2001). De plus, il a déjà été montré sur un autre

organisme, un escargot d'eau douce *Limnae stagnalis* que le cuivre, le nickel et le cadmium particulaire entrainent une diminution du taux d'ingestion d'un facteur 10 (Croteau and Luoma, 2009). Le chrome pourrait avoir le même effet sur la dreissène (paragraphe 3.4.2) et expliquer en partie le plus faible IR mesuré.

L'étude qui utilise des isotopes radioactifs obtient un IR moyen de 0,41 ± 0,23 $g.g^{-1}$ $_{poids\ sec\ des\ moules}.j^{-1}$, c'est la moyenne de l'IR calculé avec trois types d'algues : diatomées, cyanophytes et un assemblage de bactéries. La différence avec notre étude peut s'expliquer par la différence de réponse des moules selon la nourriture fournie (Roditi and Fisher, 1999).

L'efficacité d'assimilation par métal est également moyennée par condition avec trois réplicats (Figure 26).

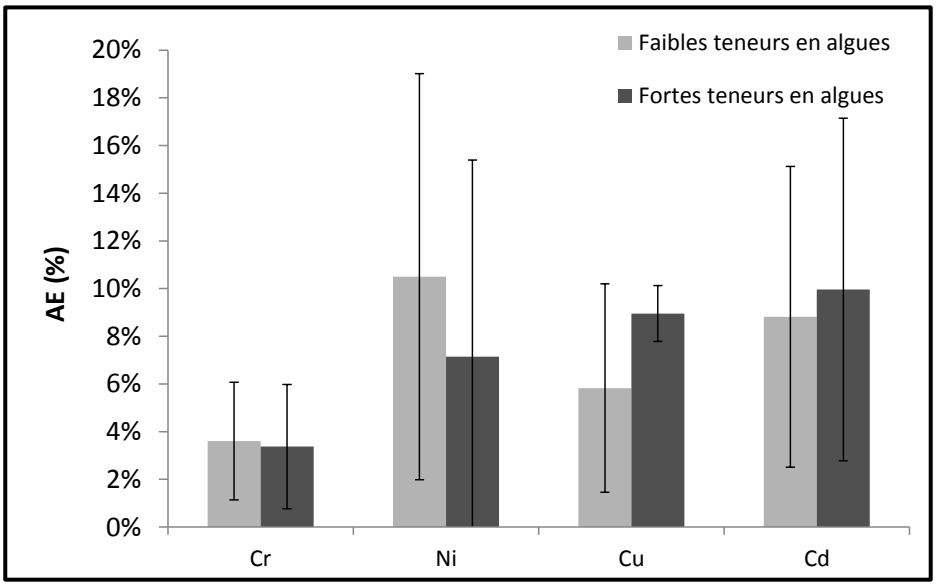


Figure 26 : Moyenne des AEs (%) calculée pour chaque condition (n=3 réplicats) avec les 4 isotopes : ^{53}Cr ,^{65}Cu ,^{62}Ni et ^{106}Cd. Les barres de couleur gris clair représentent les AE moyens pour la condition avec le moins d'algues (8 $mg.L^{-1}$) et les barres de couleur gris foncé pour la condition avec le plus d'algues (15 $mg.L^{-1}$).

Les variations observées sont systématiquement supérieures à 50 % et sont dues aux variations du comportement des individus suivant les béchers. Un test de Student a montré qu'il n'y avait pas de différence significative des valeurs d'AE entre les deux conditions. Il serait donc nécessaire d'augmenter significativement le nombre d'individus, plusieurs dizaines, par milieu d'exposition afin de moyenner la réponse des organismes et donc de travailler dans des milieux d'exposition de plusieurs litres (3-4L).

Les valeurs d'AE mesurées sont faibles, dans l'absolu. Elles oscillent, tous métaux compris, entre 0 et 22 % (maximum avec le nickel dans le bécher A8), c'est-à-dire que pour certains métaux et pour certains béchers, les métaux ne sont pas du tout assimilés par les organismes.

Les valeurs d'AE du cadmium varient entre 9 et 10 % et celles du chrome entre 3 et 4 %. Ces valeurs sont dans les fourchettes basses de celles obtenues dans une étude antérieure (Roditi and Fisher, 1999) où les AE du cadmium varient entre 19 et 72 % et ceux du chrome entre 4,7 et 49 % et sont fonction du type de particules.

De plus, dans le bécher A8, les AE maximum observés pour le chrome et le cuivre sont de 7 % et 10 %. Ces AEs maximum sont corrélés à une cinétique d'excrétion typique d'une digestion lente. Ce résultat est intéressant car il met en évidence une corrélation entre un AE élevé et une digestion a priori lente. Ce résultat serait néanmoins à confirmer car il a été observé sur un seul bécher (A15) et ce bécher présente des valeurs d'AE du chrome et du cuivre également maximale. Cependant il n'est pas observé dans ce bécher de second pic d'excrétion des fèces, caractéristique de la digestion lente (Figure 21, page 90).

A notre connaissance, il n'existe pas d'autres valeurs publiées sur l'AE du cuivre et du nickel chez la dreissène ; les résultats obtenus sont donc les premiers.

En conclusion, les valeurs de taux d'ingestion (IR) et d'efficacité d'assimilation (AE) obtenues présentent une forte variabilité entre les réplicats. Cette variabilité ne permet pas d'observer un effet de la quantité des particules aux niveaux testés sur l'IR et l'AE. Comparativement aux valeurs de la bibliographie, les valeurs obtenues sont très faibles.

Cependant le protocole utilisé présente l'avantage d'avoir évalué ces constantes en travaillant avec un mélange multi métallique, 5 métaux ont été testés en simultané soit plus que des études antérieures : 3 métaux (Croteau *et al.*, 2007; Croteau and Luoma, 2008) ou 4 métaux maximum (Bourgeault, 2010) (Cf. annexe n°6).

3.5. Limites méthodologiques

3.5.1. Limites et biais liés à la correction des interférences

Nous travaillons avec plusieurs métaux, notamment des métaux essentiels (cuivre et zinc), ces métaux sont donc naturellement ubiquistes. Il est donc nécessaire de doper significativement en isotopes afin que les niveaux naturels soient différents après le dopage. Malheureusement, il semblerait que ce ne soit pas le cas. Or comme nous souhaitons travailler à des teneurs métalliques faibles, car représentatives des teneurs environnementales. Il n'est pas possible de doper d'avantage.

Ainsi, les interférences de l'ICP-MS sont plus visibles lorsque l'on travaille aux limites de quantification et sont plus handicapantes. Elles sont corrigées notamment grâce à la cellule de collision (CCT) dans le cas du chrome (Croteau *et al.*, 2007) mais cela ne suffit pas pour les autres métaux puisqu'il est nécessaire de corriger les valeurs mesurées qui dévient. La déviation est quantifiée grâce aux échantillons standards de référence dont les teneurs en métaux sont connues.

La correction des interférences que nous avons réalisée nous permet d'extraire les résultats mais cette correction est longue et fastidieuse. Il y a aussi un bruit de fond existant avant même l'ajout d'isotopes. De plus, les résultats obtenus sont, dans certains cas, inférieurs aux limites de détections (bioaccumulation par les moules cf. section 3.5.2.).

Ainsi, il serait intéressant de tester un nouveau protocole qui semble permettre de rendre plus lisible un changement même faible du rapport isotopique dans l'organisme. Un protocole, très récent (Croteau *et al.*, 2013), consiste à modifier, avant exposition, le ratio en isotopes de la matrice qui va être susceptible de bioaccumuler des métaux particulaires, et non de la nourriture. Ainsi lorsque la matrice accumule une faible quantité de métaux naturels (<25 ng) cela est suffisant pour observer une modification du ratio artificiellement créé dans la matrice. Ainsi, il est possible de quantifier plus précisément la part de métaux ajoutés en améliorant l'estimation du bruit de fond.

3.5.2. Faible bioaccumulation des métaux par les moules

La méthodologie du pulse-chase repose sur un temps de contact court entre les moules et la nourriture contaminée. Effectivement, le temps de contact doit être inférieur au temps de transit des métaux dans les moules afin d'empêcher la contamination du milieu par les fèces. Or, dans le cas des moules, le temps de transit est très court, entre 10 et 30 minutes après la fin des 30 minutes de pulse. L'excrétion de la majorité des fèces a été observée (Roditi and Fisher, 1999).

Et la bioaccumulation des métaux par les bivalves, pendant 40-60 min, n'est généralement pas suffisante pour permettre une quantification de la contamination des tissus. Il est donc nécessaire d'augmenter légèrement le temps de l'exposition. Il a donc été allongé à 1h30 maximum.

Ainsi, les moules exposées bioaccumulent les métaux mais en très faibles quantités, il n'y a que quelques dizaines de ng de métal g de poids sec d'organisme (Figure 27) et pour certains métaux la quantité retrouvée est parfois trop proche des niveaux initiaux, notamment dans le cas du cuivre (Figure 27).

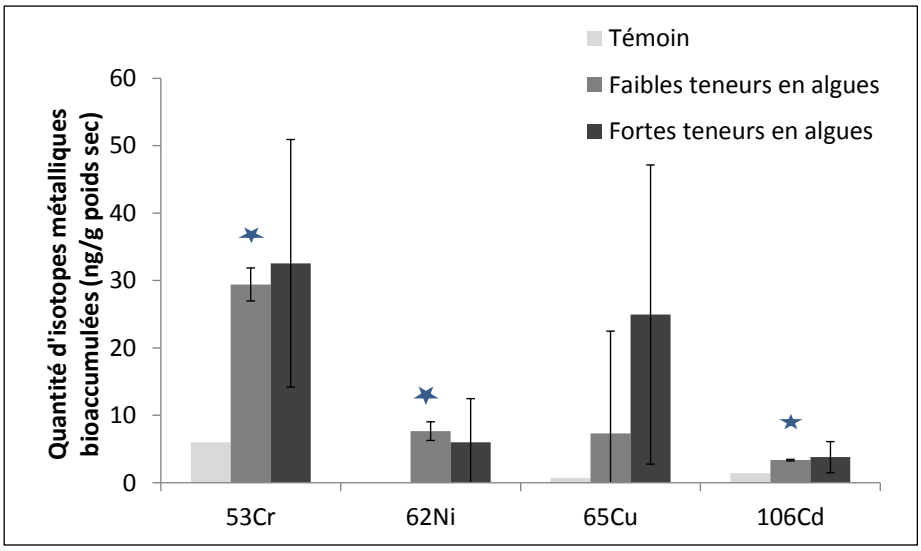


Figure 27 : Quantité moyenne de métaux (ng.g$^{-1}_{poids\ sec}$) (n= 3 réplicat) bioaccumulés dans les tissus mous des moules par condition après la phase de dépuration au bout de 48h. Les étoiles représentent les teneurs significativement différentes des teneurs témoins (test de student, p<0,05).

A l'origine des faibles quantités retrouvées dans les moules, trois explications sont possibles, par ordre décroissant de probabilité :

- Soit l'expérimentation atteint ses limites méthodologiques/analytiques, ainsi 1h30 d'exposition des moules à de la nourriture contaminée ne permet pas, au vu des limites de détection et de mesure des isotopes nets, de détecter les quantités de métaux bioaccumulés.
- Soit c'est un problème biologique dû au fait que, dans cette situation de faibles teneurs en métaux et sur un temps aussi court et après 48h d'épuration, la dreissène est capable de réguler les métaux essentiels et aussi les métaux non désirables.
- Soit c'est un problème de toxicité dû aux trop fortes teneurs en chrome qui ont entrainé de mauvaises conditions d'ingestion des particules et donc au final de l'assimilation des métaux associés aux particules

Afin d'augmenter l'assimilation des métaux par les moules, il serait judicieux d'augmenter à la fois le taux de filtration et le temps d'exposition. La mise en place d'un système en flux continu (Filgueira *et al.*, 2006) permettrait de créer un courant et donc de favoriser un fort taux de filtration des organismes et également d'augmenter le temps d'exposition, sans recontaminer le milieu. Les fèces seraient évacuées par le flux et récupérées à l'extérieur du milieu d'exposition dans de petites trappes. Les trappes étant adaptées d'un système mis en place dans une étude antérieure (Neng and Culver, 1999).

3.5.3. Impossibilité de s'affranchir complètement d'une contamination par voie dissoute

La méthodologie utilisée ne permet pas de s'affranchir complètement de la voie dissoute. En effet, même si les pourcentages de métaux désorbés restent inférieurs à 50 %, les quantités en métaux retrouvées dans le dissous sont malgré tout significativement supérieures aux quantités retrouvées dans les dissous témoins.

Une approche expérimentale permet de quantifier l'impact de la contamination du milieu sur la bioaccumulation des métaux par les organismes. D'autres moules que celles qui ont été exposées à la voie trophique ont été exposées au filtrat du milieu qui avait servi lors de

l'exposition. La quantité de métaux bioaccumulés par voie dissoute est mesurée et la dépuration sur 48h est également prise en compte.

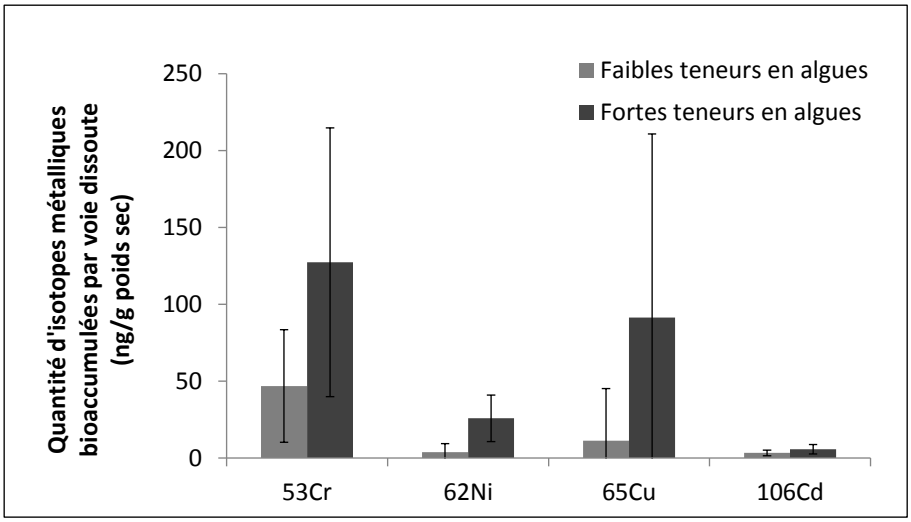


Figure 28 : Comparaison des moyennes d'isotopes de métaux (ng) (n= 3 réplicats) mesurées dans les tissus mous des moules après la phase d'exposition par voie dissoute pour un filtrat issu du milieu contaminé en faibles teneurs en algues ou en fortes teneurs en algues.

Des quantités identiques, pour le nickel et pour le cadmium sont bioaccumulées par voie dissoute seule (Figure 28) et par voie particulaire et dissoute (Figure 27) comme pour le. Il est par contre observé que les valeurs accumulées par voie dissoute sont plus importantes par voie dissoute seule pour le chrome et le cuivre que celles mesurées suite à l'exposition particulaire et dissoute. Cette différence est d'autant plus prononcée (facteur 5) pour la condition avec des teneurs fortes en particules. Il semblerait donc que les teneurs en particules élevées limitent la bioaccumulation des métaux par rapport à une exposition par voie dissoute seule ou par rapport à une exposition avec moins de particules.

Ainsi on peut conclure que les AE calculés ne sont pas représentatifs de la voie trophique seule, malgré une très faible contamination de la phase dissoute, la contamination des moules par cette voie n'est pas négligeable dans le cas du chrome et du cadmium. Ces résultats confirment des essais précédents (Bourgeault, 2010), qui ont eu des difficultés à corriger la bioaccumulation par voie dissoute suite à la réalisation du pulse-chase feeding avec des bivalves. Nous avons de notre côté décidé de ne pas réaliser cette correction de la voie dissoute, il faut donc retenir que les AE calculés reposent sur la biaoccumulation des métaux accumulés par voie trophique et lors de la phase dissoute lors du pulse.

3.5.4. Toxicité du chrome particulaire et impact sur l'IR et AE

Au regard des faibles IR et AE obtenus, l'hypothèse que les fortes valeurs de chrome dans les particules pouvaient expliquer ces résultats, a été émise. Effectivement, il a déjà été montré que le cadmium, le cuivre et le nickel particulaires à de fortes concentrations 157 $\mu g.g^{-1}$,2 628 $\mu g.g^{-1}$ et 102 $\mu g.g^{-1}$ respectivement (Croteau and Luoma, 2009) sont à l'origine d'une diminution de l'IR d'un facteur 10.

Or le chrome est un métal toxique notamment pour sa forme hexavalente ou chrome VI pour l'homme. Pour les organismes aquatiques, la toxicité des deux formes du chrome a été prouvée sur un poisson et une daphnie (Baral *et al.*, 2006) et sur une algue *Pseudokirchneriella subcapitata* également (Rodgher and Espíndola, 2008). Ainsi, la toxicité des deux niveaux de spéciation du chrome est couramment démontrée sur les organismes aquatiques.

Sur la daphnie, *Ceriodaphnia dubia*, il a été montré plus précisément que la CL_{50} à 48h (dose qui tue 50 % des organismes) est de 3 711 ± 1 500 $\mu g.L^{-1}$ de Cr^{III} et de 145 ± 10 $\mu g.L^{-1}$ de Cr^{VI} (Baral *et al.*, 2006). Sur la daphnie *Pseudosida variabilis* des CL_{50} à 24h de 132,2 $\mu g.L^{-1}$ et à 48h de 52,5 $\mu g.L^{-1}$ ont été déterminées sur le chrome total, c'est-à-dire sans distinction entre Cr^{III} et Cr^{VI} (Gutierrez *et al.*, 2011).

Aucune étude n'a étudié la CL_{50} de particules contaminées en Cr sur des bivalves, donc au regard de la contamination du dissous dans notre expérience qui est seulement de 0,5 ± 0,1 $\mu g.L^{-1}$, il est possible que la teneur en Cr dissoute ne soit pas toxique pour les bivalves, mais rien ne peut être conclu à propos de l'effet toxique du Cr particulaire.

De plus, aucune étude ne démontre impact du chrome sur la physiologie des bivalves et en particulier sur l'IR.

Le seul constat fait, suite à notre expérience, est que les fortes teneurs en chrome isotopique de 186 $\mu g.L^{-1}$ ne perturbent pas la croissance des algues. D'après la littérature, l'Agence Francaise de Standardisation (AFNOR, 98) l'EC_{50} du dichromate de chrome pour *P.subcapitata* lors de tests de toxicité sur 72h est compris entre 84,2 et 212 $\mu g.L^{-1}$. Dans notre cas, peut être en raison du pH=8 de la solution, le chrome est préférentiellement sous

sa forme Cr III, il est donc potentiellement moins toxique pour les algues. De plus, il est possible que le type de solution utilisé réduise la toxicité du chrome car ce dernier est moins biodisponible (Vignati *et al.*, 2010).

Il est cependant légitime de supposer que cette teneur peut avoir un impact négatif sur la valeur de l'IR puisque le chrome a un impact toxique et qu'en général une nourriture fortement contaminée est moins appétante et modifie donc le comportement alimentaire des organismes (Irving *et al.*, 2003; Sofyan *et al.*, 2006; Croteau and Luoma, 2009).

4. Conclusions et perspectives

Le protocole utilisé a rendu possible une contamination efficace des particules composées à 100 % d'algues. De plus, cette contamination est réalisée avec un dopage du milieu représentatif des teneurs naturelles en métaux et avec une teneur en chrome particulaire très élevée (même si elle reste dans la fourchette supérieure des teneurs retrouvés en Ile-de-France). Les métaux sont tous correctement internalisés et se désorbent peu. Finalement, la contamination particulaire est représentative des teneurs environnementales. Malgré cette contamination efficace, le transfert des métaux particulaires vers les moules exposées reste faible et il n'est pas possible de mesurer des AEs et un IR fiables.

Ainsi, suite aux verrous méthodologiques inhérents au design de l'expérimentation et à la forte teneur en chrome dans les algues, il n'est pas possible d'utiliser en routine ce protocole à l'heure actuelle sans modifications indispensables.

Plusieurs pistes d'amélioration sont proposées afin de (1) limiter la lourdeur du traitement des données lors de la correction des interférences (2) s'affranchir de la contamination par voie dissoute (3) augmenter la quantité de métaux bioaccumulés par les organismes sans contaminer le milieu avec des excrétions contaminées.

Dans un premier temps, tester le nouveau protocole de Croteau, 2013 (Croteau *et al.*, 2013) peut éventuellement réduire les lourdeurs inhérentes au traitement des données. En effet, dans ce protocole, le ratio naturel des isotopes présents dans les organismes exposés est inversé. Au lieu de modifier le ratio naturel des isotopes de toutes les matrices : algues, eau, moules et excrétions, suite à un dopage, grâce à cette méthodologie, seul le ratio naturel des isotopes sera modifié pour la matrice moule. Il est possible que la correction des

interférences soit réduite ce qui réduirait les étapes nécessaires lors du traitement des données.

Dans un second temps, il est nécessaire d'identifier pourquoi il n'est pas possible d'évaluer la voie trophique. C'est-à-dire pourquoi la soustraction de la voie dissoute à la voie du pulse ne permet pas d'obtenir la voie trophique seule. Il s'avère que lorsque les moules sont exposées à la voie dissoute seule, le milieu d'exposition est vierge de toute particule, ainsi le comportement de filtration des moules se trouve modifié par rapport à la période du pulse notamment car le FR varie en fonction des teneurs en particules (Reeders *et al.*, 1989) et surtout car dans notre cas la forte teneur en chrome est soupçonnée de réduire l'IR.

De plus, la présence, ou non, de particules modifie la bioaccumulation par voie dissoute car le k_u est une constante de la voie dissoute qui, malgré tout, peut fluctuer suivant le type de particules auquel l'organisme filtreur est exposé. Il semble donc que le comportement de filtration influe la voie trophique mais aussi la voie dissoute et qu'il est fonction du type de particules (Roditi and Fisher, 1999).

Ainsi, dans le but d'estimer la voie dissoute seule, comparée à la voie trophique, il semble nécessaire de réaliser une expérience avec voie dissoute puis voie trophique avec des algues ou des particules contaminées ou non, cette expérience a été réalisée avec des Daphnies (Geffard *et al.*, 2008). Elle a permis de mettre en évidence l'importance de la voie trophique dans la contamination des daphnies. Cependant aucune expérience n'a comparé l'impact de la voie dissoute seule avec en simultané la présence de particules non contaminées.

Le problème qui survient et que lors de l'ajout d'algues naturellement contaminées le bruit de fond est augmenté. Ceci complique alors l'analyse. Il se peut que la nouvelle technique de Croteau (2013) lorsqu'elle est utilisée empêche, dans ce cas précis, l'élévation du bruit de fond, mais se serait à confirmer. Dans ce cas, l'isotopie naturelle des organismes ayant été modifiée, peu importe le bruit de fond naturel de particules non contaminée. Ce bruit de fond aura un impact moindre sur le ratio isotopique des organismes contaminés et c'est ce ratio qui est analysé dans cette nouvelle méthodologie. Ainsi, l'ajout de particules naturelles faiblement dopées perturbera dans une moindre mesure le système et sera donc un biais moins important qu'avec la technique actuelle.

Dans un troisième temps, il est nécessaire d'augmenter la quantité de métaux ingérés par les bivalves. Le défi est d'arriver à augmenter la bioaccumulation des métaux, sans augmenter la contamination du milieu par les excrétions. En mettant en place un système en flux

continue, afin de créer un courant qui favorise un fort taux de filtration ((Filgueira *et al.*, 2006) et en augmentant le temps d'exposition, il va être possible d'augmenter le transfert des métaux vers les moules. Ensuite, afin de prévenir la contamination du système par les fèces contaminées, une petite « trappe à sédiments » est mise en place afin de récupérer les fèces et pseudo-fèces contaminées (inspiré de (Neng and Culver, 1999)). Elles sont donc retirées du système et ne le contaminent plus.

D'après nos résultats, la technique du pulse-chase feeding avec un temps d'exposition aussi court (<1h30) semble peu adaptée à l'étude de la bioaccumulation par les bivalves lorsque les teneurs en métaux sont faibles et lorsqu'on utilise des isotopes stables. Il faudrait donc réaliser une expérience similaire avec un temps d'exposition plus long suite à la mise en place indispensable d'un système innovant, permettant de supprimer la recontamination du milieu par les fèces. Il faudrait également augmenter le dimensionnement des milieux d'exposition afin de travailler avec plus d'organismes par milieu d'exposition afin de lisser la variabilité inter-individu qui entraine une forte variabilité.

Chapitre 3 : Biodisponibilité des métaux particulaires *in situ*

1. Objectifs

Lors du chapitre précédent, l'approche mise en place en laboratoire afin de déterminer la biodisponibilité des métaux particulaires a été décrite mais des améliorations sont encore nécessaires pour que la méthode soit opérationnelle. De plus, nous souhaitions également développer, en parallèle, une détermination de la biodisponibilité particulaire *in situ, soit* en conditions non contrôlées.

La technique, mise en œuvre *in situ,* repose sur le biomonitoring qui permet le suivi de la contamination des milieux. Ce suivi est réalisé à l'aide d'organismes modèles exposés à la contamination afin d'étudier soit l'impact de la toxicité de ces contaminants, soit l'accumulation de ces contaminants dans les tissus des organismes biomoniteurs. Cette seconde approche a été choisie et l'organisme biomoniteur utilisé est un bivalve filtreur : la moule zébrée, *Dreissena polymorpha*. L'étude de la bioaccumulation des métaux *in situ* permet de quantifier les paramètres suivants : quantités de métaux dans les tissus, concentrations en métaux dans le milieu. Ces paramètres sont alors utilisés pour simuler, à l'aide du modèle biodynamique, la biodisponibilité particulaire *in situ*.

L'objectif de ce chapitre est donc d'étudier la biodisponibilité (AE) des métaux particulaires *in situ* et d'évaluer l'impact du taux de filtration (FR), et donc du taux d'ingestion (IR), sur cette biodisponibilité.

La variabilité spatiale de la bioaccumulation des métaux a été étudiée sur différents sites sur la Seine et sur l'Orge lors d'une campagne qui s'est déroulée sur 14 jours. En effet, en travaillant sur une période de 14 jours, il est possible de limiter la variabilité de certaines conditions environnementales (température, qualité du phytoplancton, etc.) et de certaines modifications physiologiques de l'organisme (poids, période de reproduction, etc.), un poids stable des dreissènes lors d'une translocation de 21 jours a été constaté par Bervoets (Bervoets *et al.*, 2005b). Il est donc possible de supposer que le taux de filtration, mesuré le dernier jour, est intégratif des 14 jours d'exposition et l'étude de l'impact de ce dernier sur la biodisponibilité des métaux particulaires est alors réalisable. Ainsi ce paramètre va être suivi,

en plus de paramètres mesurés dans le milieu (physico-chimie, concentrations en métaux…) et sur les organismes (bioaccumulation et indice de condition).

A partir des mesures de bioaccumulation, des concentrations des métaux dans l'eau et sur les particules et de la mesure du taux de filtration, l'efficacité d'assimilation (AE) *in situ* est estimée au moyen du modèle biodynamique. De plus, l'efficacité de prédiction du modèle sera discutée.

2. Matériels et méthode de l'évaluation de la biodisponibilité particulaire *in situ*

2.1. Sites d'études

La campagne s'est déroulée du 12 au 30 novembre 2012 sur 2 sites sur le bassin versant de l'Orge : à Dourdan et Egly, et sur 4 sites sur le bassin versant de la Seine : Marnay/Seine, Bougival, Triel/Seine et Andrésy (Figure 29).

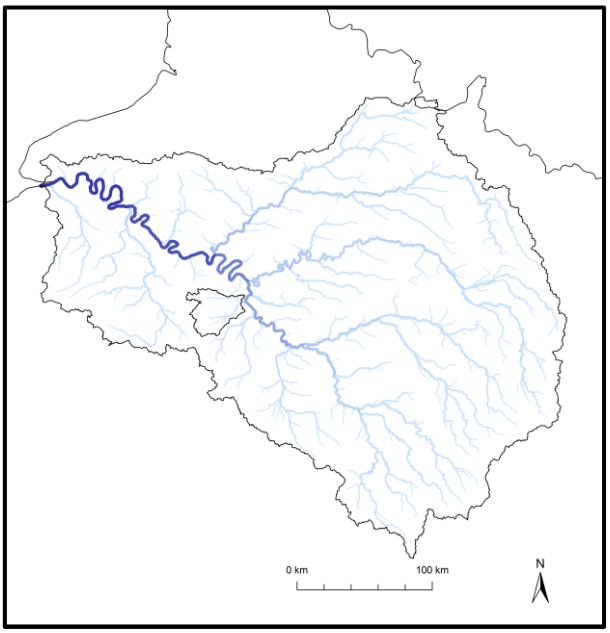


Figure 29 : Localisation globale du bassin versant de l'Orge compris dans le bassin versant de la Seine.

Le choix des sites d'étude le long de la Seine s'est appuyé sur les travaux de l'équipe d'écotoxicologie d'IRSTEA d'Antony (Tusseau-Vuillemin *et al.*, 2007; Bourgeault *et al.*, 2011). Les sites d'étude ont été choisis en fonction de leur position géographique par rapport à Paris (amont et aval) et par rapport à la station d'épuration principale de l'agglomération

parisienne. Il s'agit de la station d'épuration Seine-Aval, à Achères, qui traite 1 700 000 m^3 d'eau par jour, soit 70 % des eaux usées de l'agglomération parisienne (Figure 30). C'est une des stations d'épuration les plus importantes d'Europe. Elle a un fort impact sur la Seine puisqu'en période d'étiage le débit des rejets de la STEP est de 37,5 $m^3.s^{-1}$, ce qui représente un quart du débit total de la Seine, alors réduit à une moyenne de 150 $m^3.s^{-1}$ (Thévenot *et al.*, 2009).

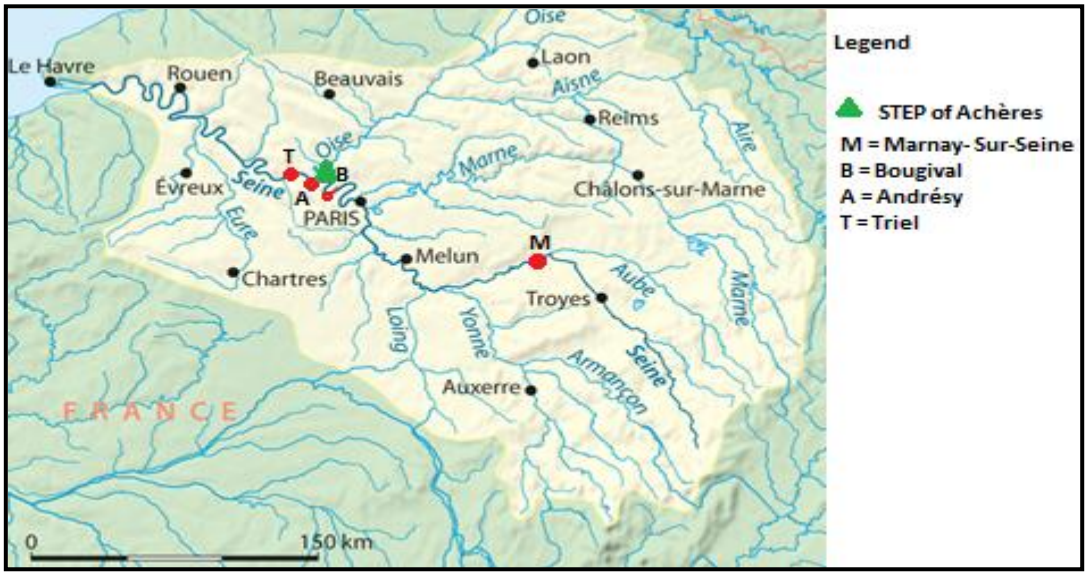


Figure 30 : Localisation des sites d'étude le long de l'axe Seine par rapport à la STEP (Station d'épuration) d'Achères ou station Seine-Aval.

En ce qui concerne les sites en Seine, le site de Marnay-sur-Seine (M) se trouve à 200 km en amont de Paris. Ce site subit majoritairement une pression anthropique d'origine agricole (lessivage des sols agricoles contenant potentiellement des produits phytosanitaires). Les sites de Bougival, Andrésy et Triel-sur-Seine sont en aval de la ville de Paris. Le site de Bougival est localisé sur un site du SIAAP (Syndicat Interdépartemental d'Assainissement de l'Agglomération Parisienne), qui est le service public de l'assainissement francilien, et se situe en aval de Paris et en amont de la confluence avec l'Oise et également de la station Seine-Aval. Celui d'Andrésy se trouve à environ 5 kilomètres en aval de la station Seine-Aval et juste après la confluence de l'Oise. Les prélèvements ont été réalisés sur l'écluse d'Andrésy et ont nécessité la mise en place d'un Plan de Prévention de Sécurité. Le site de Triel-sur-Seine se trouve à une dizaine de kilomètres en aval de la station Seine-Aval et les prélèvements ont été réalisés sur un ponton d'amarrage de bateaux de plaisance (Figure 31).

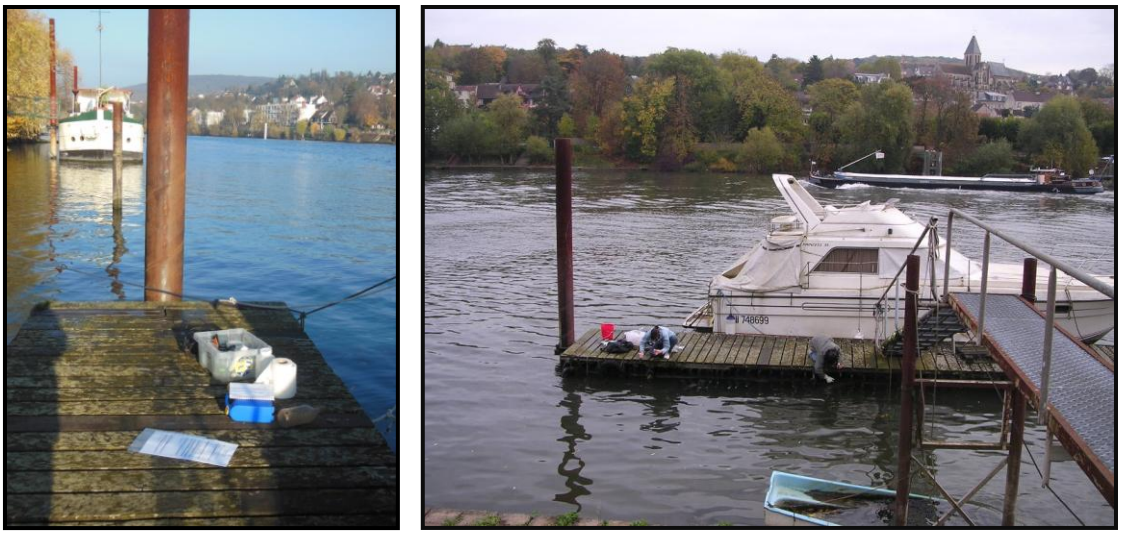


Figure 31 : Photographies du site de Triel-sur-Seine, matériel sur le ponton et vue d'ensemble.

Le choix des sites sur l'Orge s'est appuyé sur les travaux de l'équipe PCO du LSCE de Gif-sur-Yvette (Le Pape, 2012).

L'occupation des sols du bassin versant Orge-Yvette est très contrastée. Les sols sont majoritairement occupés par des forêts et des surfaces agricoles en amont, et un gradient d'urbanisation des sols prononcé d'amont en aval est visible (Figure 32).

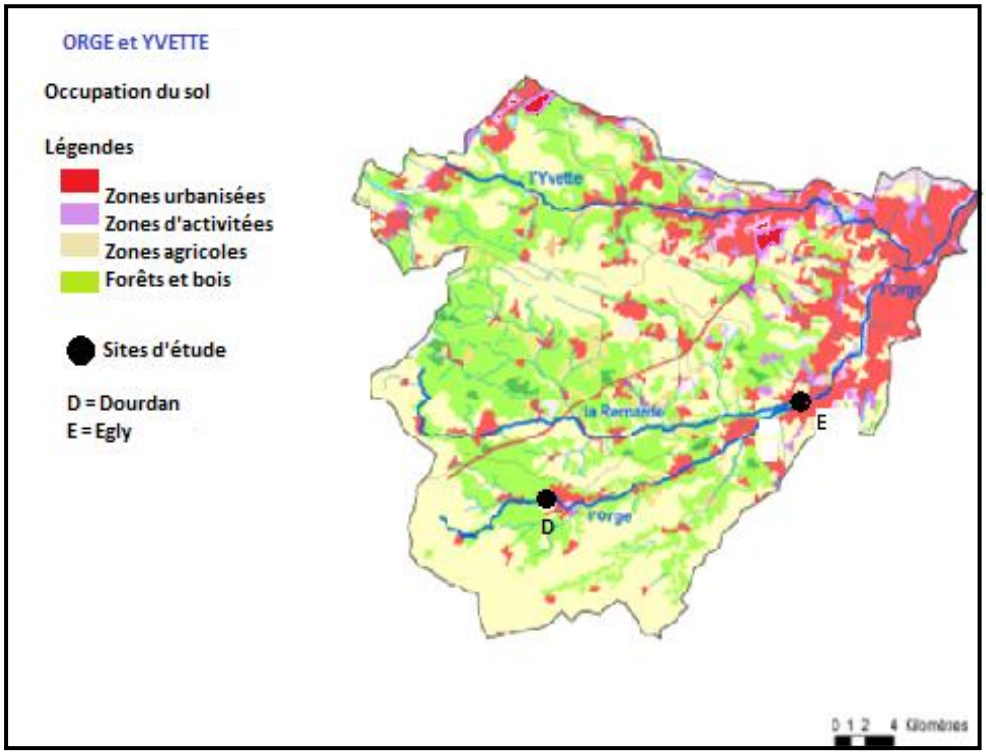


Figure 32 : Occupation du sol sur le bassin de l'Orge-Yvette et localisation des sites d'études.

Dourdan est le site le plus en amont, il se situe à l'entrée de la ville de Dourdan, qui est la première zone urbanisée que rencontre l'Orge depuis sa source. La largeur de la rivière est d'environ 4 mètres au niveau du lieu d'étude et le site se trouve juste après une retenue d'eau, ce qui maximise la hauteur d'eau qui n'est malgré tout que de quelques dizaines de centimètres.

Egly (Figure 32) est le site aval, il se trouve juste après la confluence entre l'Orge et la Rémarde et est localisé en face du camping municipal. A cet endroit, une faible vitesse de l'eau est observée ce qui entraine une forte accumulation des sédiments le long de la berge (jusqu'à 1m de dépôt qui se retrouve hors de l'eau en période d'étiage).



Figure 33 : Photographie du site d'Egly dans son ensemble et de la buse sur la berge opposée au prélèvement, Novembre 2012.

Se trouve également, sur la berge opposée au lieu de prélèvement, une buse qui déverse de l'eau directement dans la rivière (Figure 33). Les prélèvements ont été réalisés en aval de cette dernière.

Sur la Seine et sur l'Orge, les débits journaliers des cours d'eau lors de l'exposition ont été compilés (source : www.hydro.eaufrance.fr) sur une année intégrant le mois d'exposition (Figures 34 et 35).

Sur la Seine, les moyennes des débits en amont de la Seine et en aval sont représentées sur un même graphique (Figure 34). Le site de Bazoches-les-Bray, à 30 km en aval de Marnay-

sur-Seine, a un débit moyen systématiquement plus faible que celui de Vernon, à 50 km en aval de Triel/Seine.

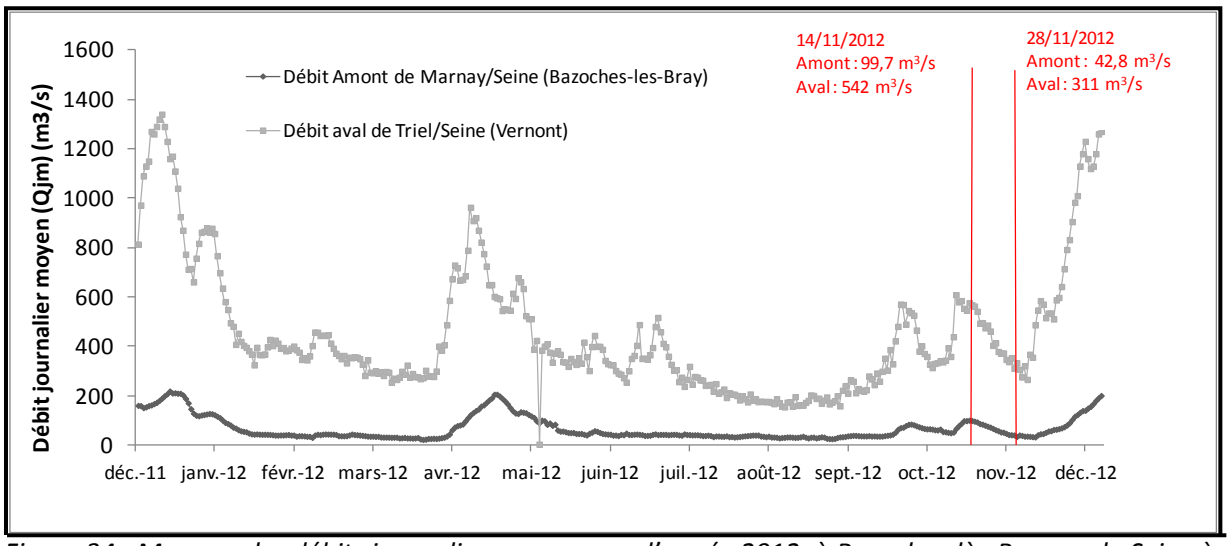


Figure 34 : Mesures des débits journaliers moyens sur l'année 2012, à Bazoches-lès-Bray sur la Seine à 30 km en aval de Marnay/Seine et à Vernont à 60 km en aval de Triel/Seine. Source : D'après www.hydro.eaufrance.fr.

Sur l'Orge, pendant la période d'exposition des moules, le débit ne varie pas de façon significative (Figure 35). Ces valeurs de débit sont dans la moyenne annuelle de l'Orge amont, la moyenne annuelle, calculée sur 32 ans, étant de 0.3 $m^3.s^{-1}$. Ces valeurs font suite à un petit épisode pluvieux en Octobre, responsable d'une légère augmentation du débit par rapport à l'été. Nous sommes donc, d'après une étude récente sur la contamination métallique de l'Orge (Le Pape *et al.*, 2012), dans une situation de dilution de la contamination urbaine.

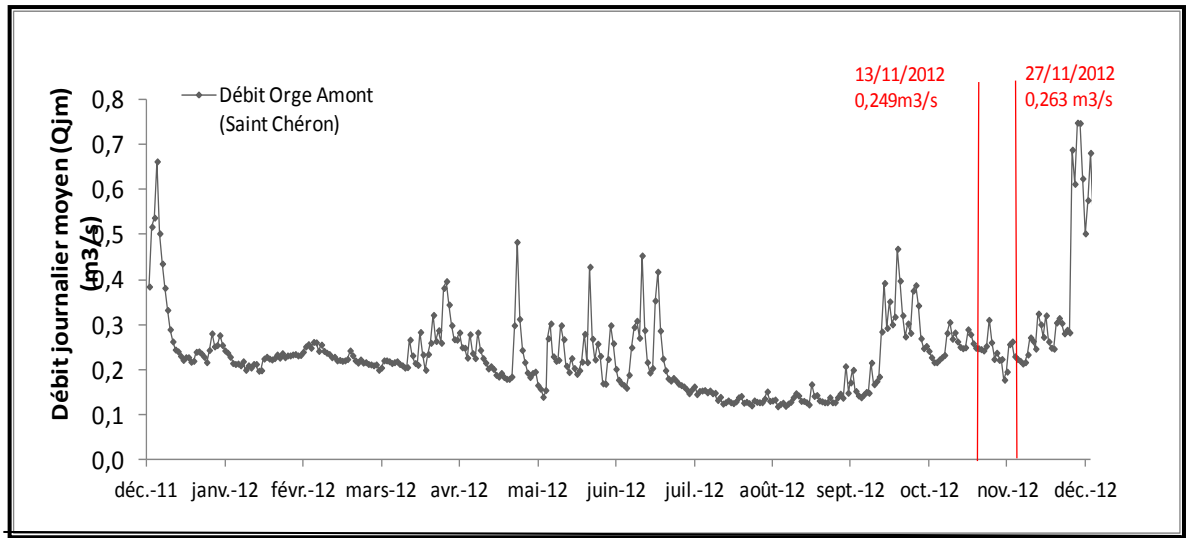


Figure 35: Mesures des débits journaliers moyens sur l'année 2012 à St Chéron sur l'Orge : entre Dourdan et Egly. Source : d'après www.hydro.eaufrance.fr.

2.2. Déploiement des organismes et du matériel

Des moules calibrées (18 à 22mm) et prélevées (Novembre2012) sur un site propre en métaux à Vertuzey (54) (Cf. Chapitre 2) ont été déposées dans des cages fabriquées avec du grillage vert de jardin (15 moules par cages) (Figure 36). Les cages contenant les moules sont transplantées sur les sites (1 cage par site) en Ile-de-France pendant 14 jours, moins d'une semaine après leur pêche.



Figure 36: Photographie d'une cage avec 15 moules transplantées sur les sites d'étude en Ile-de-France.

Des DGTs (Diffusive Gradient in Thin Film) avec des gels diffusifs (Figure 38) ont aussi été déployées (3 par site) : ce sont des échantillonneurs passifs qui permettent une mesure de la concentration de métaux labiles (Davison and Zhang, 1994) présents dans la phase dissoute. Il a été démontré que les métaux labiles étaient également préférentiellement biodisponibles pour les organismes (Buzier *et al.*, 2006; Tusseau-Vuillemin *et al.*, 2007) et ce, en milieu naturel et dans les rejets de STEPs.

Enfin, des trappes à sédiments (1 par site) ont été déployées. Ce sont des bouteilles en plastiques lestées d'un poids (afin qu'elles restent verticales) et mises la tête en bas (afin de récupérer plus facilement les sédiments en fin d'exposition). Elles sont percées asymétriquement (en bas de la bouteille d'un côté et en haut de l'autre), les trous étant orientés dans le sens du courant afin de casser les flux des matières en suspensions qui tombent alors au fond de la bouteille (Figure 37).

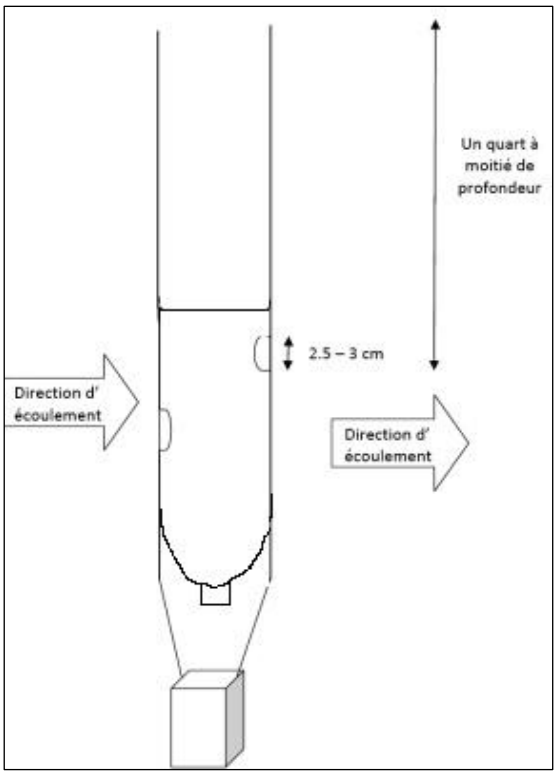


Figure 37 : Schéma d'une trappe à sédiments (Schéma modifié de Priadi (2010 Decembre))

Elles permettent de récolter d'assez grandes quantités (plusieurs grammes) de particules en suspension afin de déterminer, par la suite, les teneurs en métaux totaux. De plus, une extraction sélective (à l'HCl 1N) a été réalisée. Elle permet de récupérer les métaux particulaires labiles, qui sont, selon plusieurs auteurs, les métaux les plus biodisponibles pour les organismes (Luoma, 1989; Larner *et al.*, 2008).

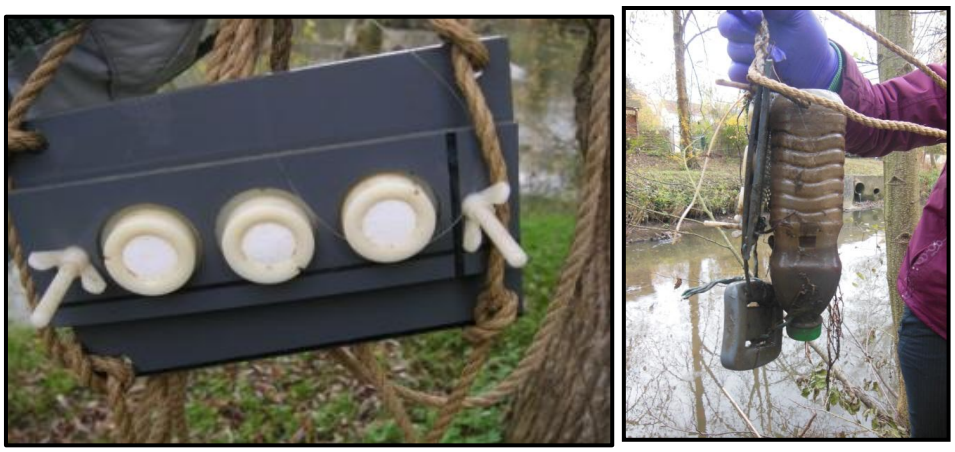


Figure 38 : Détails d'un système comprenant 3 DGTs (photo de gauche) et d'une trappe à sédiment avec son poids (photo de droite).

Ces systèmes déployés (Figure 38) permettent une mesure intégrée des métaux car les DGTs et les trappes à sédiments sont conçues afin de réaliser une mesure intégrative. La DGT munie du gel Chelex permet une diffusion progressive des métaux tout au long de l'exposition et la trappe permet également une accumulation graduelle des particules dans la bouteille.

2.3. Prélèvements ponctuels

Des mesures de caractérisation du milieu ont été faites. Elles sont réalisées soit directement sur le site comme les mesures de température, de pH, de conductivité et de la chlorophylle, soit directement en laboratoire suite au prélèvement d'eau.

Les protocoles de prélèvement d'eau sont différents en fonction du type de mesures qui sera ensuite effectuée en laboratoire.

Afin d'évaluer le COD (Carbone Organique Dissous constitué du COT (Carbone Organique Total et du CIT (Carbone Inorganique Totale) et les anions-cations, un litre d'eau est filtrée (Filtre seringue, filtre PES de porosité 0,45 µm) et mise dans une bouteille en verre ambré, préalablement grillée. Afin d'évaluer les teneurs en MES et en carbone (COP) particulaire et en azote, un litre d'eau est prélevé dans une bouteille en verre.

Afin de déterminer les teneurs en métaux dissous, 20ml d'eau filtrée avec un filtre seringue (filtre PES de porosité 0,45 µm) est acidifié (1 % $HN0_3$) sur place et mis dans un tube de 50 mL (Sarsted). Et, afin de déterminer les métaux totaux, 40mL d'eau est également échantillonné dans un tube Falcon de 50mL.

L'ensemble de ces échantillons est transporté jusqu'au laboratoire dans une glacière avec des pains de glaces, avant d'être traité puis analysé en laboratoire.

Ces prélèvements ponctuels s'ajoutent aux mesures intégrées et permettent de caractériser les teneurs organiques et métallique des compartiments dissous et particulaires.

2.4. Préparation et analyses des échantillons au laboratoire.

Au laboratoire, l'eau filtrée dans les bouteilles ambrées est stockée à 4°C avant d'être analysée dans un délai de 14 jours maximum par l'Equipe Chimie afin de déterminer les teneurs en cations et anions et les teneurs en COD. L'analyse des anions cations est réalisée

par chromatographie ionique à l'aide d'un chromatographe (DIONIX 120). L'analyse du carbone organique total (COT) et inorganique total (CIT) dans les échantillons d'eau est réalisé par vaporisation totale de l'échantillon à 680°C. Le carbone est alors transformé en CO_2 et ce gaz est quantifié. Afin de mesurer le COT, le carbone inorganique est au préalable éliminé ; dans le cas du CIT, seuls les composés inorganiques sont transformés en CO_2. Les analyses ont été réalisées à l'aide de l'analyseur Shimadzu TOC-L.

L'analyse des teneurs en MES et COP est effectuée grâce à l'eau ramenée qui est passée sur un filtre, au préalable grillé (500°c, 2h) et pesé, une fois de retour au laboratoire. Le filtre est séché à l'étuve à 60°C pendant une nuit et pesé afin de déterminer la quantité en MES, puis Le filtre est traité afin de déterminer le COP (Carbone Organique Particulaire) et l'azote.

L'analyse du carbone et de l'azote particulaire a été réalisée à l'aide d'un analyseur élémentaire (Elementar Vario El III) qui permet de sublimer les éléments carbonés et azotés en dioxyde de carbone et oxydes d'azote (950°C). Puis les oxydes d'azote sont transformés en diazote à 500°C. Enfin, le dioxyde de carbone et le diazote ont été séparés par adsorption sur une colonne chauffante et détectés par un catharomètre. Ces analyses ont également été réalisées par l'équipe Chimie du laboratoire.

Les échantillons d'eau, en vue de l'analyse des teneurs en métaux totaux, ont été minéralisés à la DigiPREP (protocole en Annexe n° 2) sous hotte et analysés par la suite à l'ICP-MS.

Les sédiments issus des trappes à sédiments ont également été minéralisés à l'aide de la DigiPREP en totalité (protocole en Annexe n°3) ou ont subi une extraction à l'HCL (Protocole en Annexe n°3) au sein de la salle propre du laboratoire du LSCE.

Les moules ont été disséquées, pesées et congelées à -80°C puis elles ont été lyophilisées, broyées et minéralisées par DigiPREP par ajouts successifs d'$HN0_3$ et H_2O_2 avant l'analyse des tissus mous (byssus enlevé).

L'analyse des échantillons en métaux a été réalisée à l'aide d'un spectromètre à torche à plasma ou ICP-MS (ICP-MS Quadripolaire X series II), au laboratoire du LSCE. De plus, l'ICP-MS a été utilisée en mode CCT (Collision Cell Technology), permettant de limiter les interférences lors de l'analyse des masses molaires comprises entre 40 et 80. Cet instrument permet la quantification rapide et simultanée des teneurs en de nombreux éléments, allant du lithium à l'uranium. Il permet d'atteindre des limites de détection basses de l'ordre du microgramme par litre en solution : 0,66 ±0,030 $\mu g.L^{-1}$ pour le chrome, 0,04 ±0,010 $\mu g.L^{-1}$

pour le manganèse, 0,006 ±0,001 µg.L^{-1} pour le cobalt, 0,150 ±0,010 µg.L^{-1} pour le nickel, 0,210 ±0,020 µg.L^{-1} pour le cuivre, 0,110 ±0,020 µg.L^{-1} pour le zinc, 0,002 ±0,001 µg.L^{-1} pour le cadmium et 0,003 ±0,001 µg.L^{-1} pour le plomb.

2.5. Calcul de l'indice de condition

La mesure de l'indice de condition (IC) a été réalisée au laboratoire. Les organismes ont été disséqués puis pesés (poids humide des tissus). Ensuite les coquilles ont été séchées puis pesées (poids sec coquille). Ainsi l'IC des organismes a été calculé selon la formule suivante :

$$IC = \frac{Poids\ \ tissus\ humide}{Poids\ \ tissus\ humide + Poids\ \sec\ coquille} \qquad (14)$$

Afin d'évaluer, la biodisponibilité particulaire de la contamination métallique en Ile-de-France des moules ont été transplantées pendant 14 jours, sur des sites le long de la Seine et sur des sites le long de l'Orge. Cette expérience a permis en étudiant, à la fois la contamination métallique et les caractéristiques chimiques des sites et la fois la bioaccumulation des métaux par les organismes, de constituer un jeu de données. Ce jeu de données rend possible, en utilisant le formalisme du modèle biodynamique, l'estimation de la biodisponibilité particulaire des métaux *in situ.*

3. Mesure du taux de filtration

La biodisponibilité des métaux particulaires est fonction du comportement des organismes, et notamment de leur activité de filtration. Afin d'estimer cette biodisponibilité *in situ*, il est donc nécessaire d'estimer également le taux de filtration. Cette mesure doit être faite in situ, car il a été montré que les mesures réalisées en conditions contrôlées ne sont pas nécessairement identiques aux situations réelles puisqu'elles ne prennent pas en compte ni la nature des particules (Reeders *et al.*, 1989), ni leurs teneurs (Madon *et al.*, 1998), ni la vitesse du courant qui est corrélée positivement au taux de filtration (Prins *et al.*, 1996; Filgueira *et al.*, 2006).

Afin de mesurer les taux de filtration, *in situ*, il existe actuellement deux approches :

- une approche qui mesure le FR par une étude de la décroissance des particules (ou de la chlorophylle) dans une enceinte (fermée ou ouverte)
- une approche qui mesure le FR en récoltant les fèces et pseudo-fèces des moules et en analysant leur quantité et la qualité (rapport inorganique et inorganique de ces derniers).

Nous nous intéresserons plutôt à l'approche qui mesure le FR par décroissance des particules car la première méthode repose sur l'hypothèse que les bivalves ne sélectionnent pas ce qu'ils filtrent et n'est pratiquement pas adaptable en rivières car la récolte des fèces et pseudo-fèces qui sont plus petits pour les bivalves d'eaux douces est pratiquement complexe.

Par contre nous ne pourrons pas réaliser cette mesure dans une enceinte ouverte, afin de prendre en compte la vitesse du courant, car au regard de la bibliographie (paragraphe 3.1) il n'est pas faisable de travailler *in situ* avec un système de moins de 4 mètres et/ ou de moins de 500 moules. Or nous souhaitons privilégier un système « miniature » facilement transportable sur différents sites d'études.

3.1. Faisabilité de mesure du taux de filtration *in situ*

Les systèmes ouverts existants, mis en place dans des milieux marins, qui reposent sur la mesure de la décroissance des particules ou de la chlorophylle utilisent des tunnels benthiques (Prins *et al.*, 1994; Prins *et al.*, 1996; Smaal, 1997; Filgueira *et al.*, 2006) et les mesures sont réalisées en entrée et en sortie de tunnel. Il existe également des études qui mesurent la décroissance, tout simplement entre deux points en mer ; sans tunnel (Grizzle *et al.*, 2006). En mesurant la décroissance des particules (ou de la chlorophylle) à l'entrée et à la sortie d'un tunnel benthique avec des organismes (et en parallèle également avec un tunnel sans organisme), il est possible d'évaluer le taux de filtration en $mL.moule^{-1}.s^{-1}$ selon l'équation suivante (Riisgård, 2001) :

$$FR = \frac{F \times \left(1 - \frac{C_{sortie}}{C_{entrée} - C_{sortietémoin}}\right)}{n} \qquad (15)$$

Avec :

F = débit du système en $mL.s^{-1}$

C_{sortie} et $C_{sortie\ témoins}$ sont les concentrations en particules ou en chlorophylle respectivement en entrée du système et en sortie du tunnel témoin

C_{sortie} est la concentration moyenne en particules en entrée des deux tunnels

n = nombre de moule

Finalement les systèmes ouverts in situ sont tous de grandes dimensions : minimum de 4 mètres de longs ou jusqu'à 60 mètres d'écart lorsque l'étude a lieu en mer sans système Grizzle (2006). A notre connaissance ils n'ont pas été testés en eau douce.

Il existe également des systèmes ouverts ou en flux continu qui ont été testés mais *ex situ*, c'est-à-dire dans des aquariums de petites tailles (19L ou 3L) avec une moule marine (*Mytilus galloprovinciallis*) (Filgueira *et al.*, 2006) ou dans des canaux de 4 mètres de long en sortie de STEP, avec *Dreissena polymorpha* (Elliott *et al.*, 2008). Dans ces cas-là, des systèmes de pompe permettent de recréer artificiellement le courant présent en mer ou en rivière.

Cette approche *in situ* n'est donc pas adaptable, à petite échelle, au cas des cours d'eau comme la Seine et l'Orge.

3.2. Protocole de mesure du taux de filtration *ex situ*

A l'heure actuelle, les systèmes *ex situ* de mesure du taux de filtration (FR) sont soit des systèmes en flux continu de petites tailles, de types aquariums, soit de grandes tailles, de types canaux. Dans le premier cas de figure, ils ont été testés sur des bivalves marins (Filgueira *et al.*, 2006), dans le second cas ils ont été testés sur *Dreissena polymorpha*. Dans tous les cas, ces systèmes nécessitent des pompes afin de créer un courant.

Il existe également des systèmes fermés, équivalents à des aquariums, utilisés, soit en laboratoire (Bourgeault, 2010), soit semi *in situ*, car ils dans ce cas, les aquariums sont placés sur le site d'étude mais ne prennent pas en compte le courant (Reeders *et al.*, 1989; Reeders and Bij de Vaate, 1990; Widdows *et al.*, 1998; Hansen *et al.*, 2011).

Une méthode de mesure du taux de filtration *ex situ,* dans une enceinte fermée, a été mise au point en s'inspirant de ces protocoles. Avec cette méthode, le débit de la rivière n'est pas

pris en compte car l'enceinte fermée est déposée sur les berges alors que la qualité de l'eau et des particules naturelles sont prises en compte puisque l'eau de la rivière est directement celle du système. Cette méthode, par rapport à l'étude de Bourgeault (2010) qui filtre l'eau de la rivière et lui ajoute des particules artificielles est plus représentative de la réalité du terrain car il est possible d'évaluer le taux de filtration en travaillant avec les particules naturelles de chaque site. Ceci nous permet de travailler dans des conditions *ex situ* en système clos c'est-à-dire aussi proche des conditions réelles que dans le cas des études semi *in situ* (Reeders *et al.*, 1989; Reeders and Bij de Vaate, 1990; Widdows *et al.*, 1998; Hansen *et al.*, 2011). Le seul facteur qui n'est pas pris en compte est la vitesse du cours d'eau.

Les mesures ont été réalisées par une analyse de la décroissance des concentrations en particules et en chlorophylle, dans un milieu clos, en un temps fixé. Pour ce faire, nous travaillons avec 3 béchers témoins, c'est-à-dire sans moule afin d'évaluer la sédimentation éventuelle des particules et avec 3 béchers contenant 5 moules chacun. Pour chaque condition, témoin et expérimentale, il existe donc 3 réplicats. Au final, dans les 6 béchers, les teneurs en chlorophylle et en particules sont mesurées après 15min d'exposition et après 1h15 (Figure 39). La mise au point du protocole et sa validation ont été réalisées en conditions réelles. Cette validation a permis de mettre en évidence la nécessité de travailler avec des béchers témoins, afin de s'affranchir de la sédimentation naturelle des particules qui représente 10 à 20 % du taux de filtration totale mesurée, ainsi le FR équivalent à la sédimentation (4 validations avec chacune 3 réplicats, donc n=12) est de 15 $mL.moule^{-1}.h^{-1}$ ± 32. (cf. formule 18). Le temps nécessaire entre deux mesures, notamment afin de s'assurer qu'il reste au suffisamment de particules ou de chlorophylle mesurable dans le bécher à la fin est d'une heure car en 1h plus de 50 % des particules ont disparu. De plus, visuellement il a été constaté que les moules ne filtrent pas ou peu (1 sur 5) pendant les 15 premières minutes. Il donc nécessaire d'attendre 15 minutes avant de réaliser la première mesure afin d'être sûr que les organismes se sont adaptés à l'enceinte et au milieu d'exposition.



Figure 39 : Détails des 6 béchers utilisés pour la mesure du taux de filtration (FR) ex situ (photo de gauche) et installation du matériel à Triel (photo de droite).

Les mesures des teneurs en chlorophylle ($\mu g.L^{-1}$) sont réalisées sur le site grâce au spectrofluorimètre portable l'Aquapen C, pour un échantillon, 10 mL d'eau sont prélevés à la pipette et sont directement analysés en triplicat (3 mL à chaque fois) (Protocole, Cf. Annexe n°5). Les mesures en particules sont réalisées en laboratoires sur des échantillons d'eau prélevés dans des bouteilles en verres de 20mL puis emballées dans de l'aluminium. Les échantillons sont transportés au laboratoire dans une glacière avec des pains de glaces. Les mesures sont réalisées dès le retour au laboratoire à l'aide d'un compteur à particules (Beckman Coulter, Z1).

Le calcul du FR a été réalisé selon la formule suivante, dérivée de Coughlan (1969) :

$$FR_{corrigé} = \frac{V}{n \times t} \times \ln\left(\frac{C_0}{C_t} - \frac{C_{0\,Témoin}}{C_{t\,Témoin}}\right) \quad (16)$$

Avec :

V= volume de l'enceinte d'exposition (mL)

n = nombre de moules

T= temps (j) d'exposition

C_0 : concentration moyenne en particules initiales dans les béchers avec les moules

C_t : concentration en particules après un temps t dans les béchers avec les moules

$C_{0\ Témoin}$: concentration moyenne en particules initiales dans les bécher témoin, sans moule

$C_{t\ Témoin}$: concentration moyenne en particules après un temps t dans le bécher témoin, sans moule.

La correction appliquée par le rapport $C_{0Témoin}/C_{tTémoin}$, permet de s'affranchir de la sédimentation naturelle des particules, mise en évidence lors de la mise au point.

L'évaluation du FR est réalisée suivant deux approches :

- basée sur la décroissance des particules analysées avec un compteur à particules (Beckman Coulter) (Cf. Protocole Annexe n°5) qui sera notée $FR_{corrigé\ part}$.
- basée sur la mesure de la chlorophylle grâce à un fluorimètre portable (AquapenC) (Cf. Protocole Annexe n°5) qui sera notée $FR_{corrigé\ chloro}$.

Sur chaque site, le taux de filtration des dreissènes a été mesuré au moment du déploiement et au moment du prélèvement des organismes, c'est-à-dire après 14 jours d'exposition.

Lors de la mesure du taux de filtration à T_o les dreissènes sont acclimatées pendant 15 min puis la mesure du taux de filtration débute.

3.3. Résultats de mesure du FR *ex situ*

Dans cette partie, les variations des valeurs des taux de filtration, suivant les sites, vont être analysées. Pour ce faire, les mesures après 14 jours d'exposition sont utilisées et pas celles du T_0 afin de s'assurer que les organismes sont complètement adaptés à leur milieu et que les FR mesurés sont donc bien représentatifs des conditions. Il a été constaté en effet que pour un site, la mesure du FR est significativement différente entre le T_0 et le T_{14}.

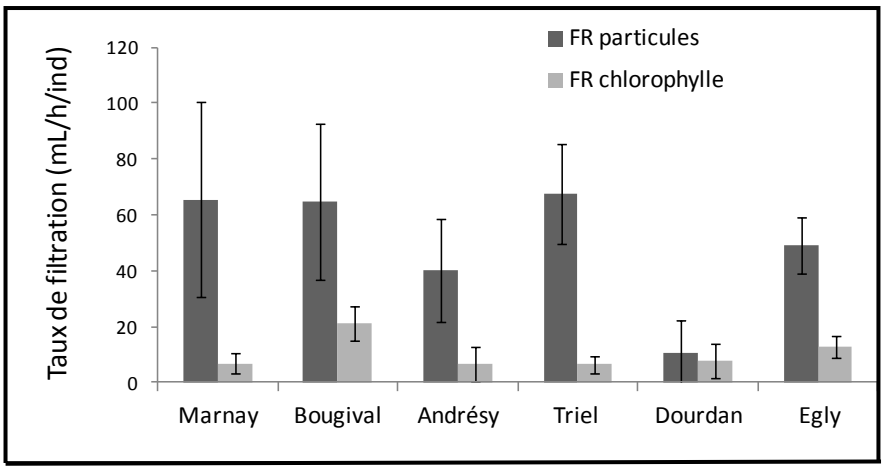


Figure 40 : Moyenne (n = 3, réplicats) et écart type des $FR_{corrigé\ part}$ (FR particules) et $FR_{corrigé\ chlorophylle}$ (FR chlorophylle) ($mL.h^{-1}.individu^{-1}$) pour chaque site selon les deux approches.

Les valeurs de $FR_{corrigé\ chloro}$ sont systématiquement plus petites que celle de $FR_{corrigé\ particules}$, le ratio est aux alentours de 1/5 sauf pour Dourdan (Figure 40) où la valeur du FR observée est nettement plus faible à Dourdan avec l'approche $FR_{corrigé\ particules}$.

Cette différence peut s'expliquer par le fait que la mesure du taux de filtration dans notre cas, est réalisée en faisant l'hypothèse que ce qui est mesuré est en totalité filtré par les dreissènes, ici la chlorophylle ou les particules. Ainsi dans le cas d'une consommation partielle, la mesure peut être entachée d'erreur.

Dans le cas de l'indicateur « particules », le compteur à particules utilisé détecte les particules comprises entre 2 et 70 µm de diamètre. Cette gamme de taille correspond au spectre particulaire que les moules zébrées sont capables de filtrer (Horgan and Mills, 1997). Ainsi en mesurant cet indicateur, le calcul du taux de filtration est attendu proche de la réalité.

A l'inverse, lorsque la décroissance de la chlorophylle est mesurée, la chlorophylle particulaire, effectivement filtrée par la dreissène, est intégrée ainsi que la chlorophylle dissoute, qui fluoresce. Or, cette dernière n'est pas forcément retenue par les branchies des moules. La décroissance mesurée de la chlorophylle est alors plus faible que la consommation réelle en chlorophylle particulaire et le taux de filtration calculé sera alors sous-estimé. Ceci peut expliquer les valeurs de $FR_{corrigé\ chloro}$ systématiquement plus petites que celles de $FR_{corrigé\ part}$.

Par la suite, uniquement les valeurs de $FR_{corrigé\ part}$ seront donc prises en compte.

3.4. Origine des variations des taux de filtration

Les taux de filtration (FR) présentent une variabilité moyenne de 40 %. Cette variabilité est due à l'incertitude de la mesure et également à la biologie des organismes. Elle a également été observée en laboratoire lors de la thèse et par une autre étude (Madon *et al.*, 1998). Il a été constaté que les taux de filtration étaient proches sur 5 sites ; seul le site de Dourdan présente un FR significativement plus petit (Figure 41).

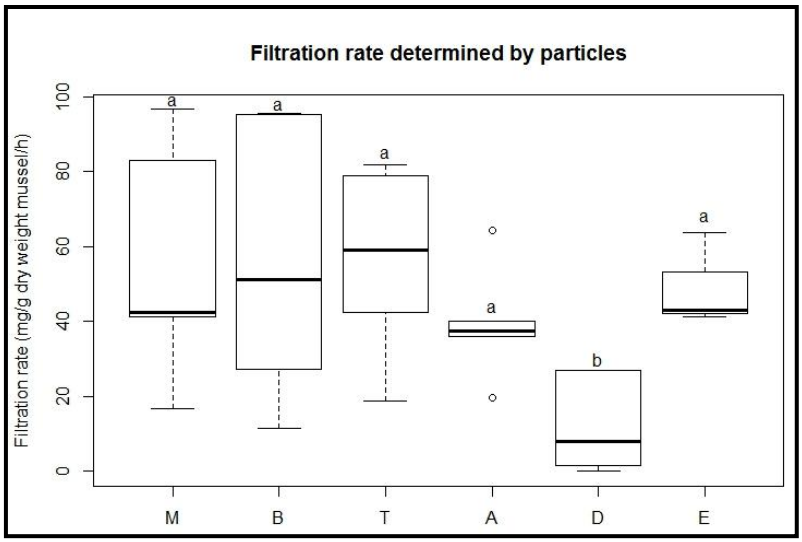


Figure 41 : Valeurs moyennes des FR (n=6 T0 et T14, sauf pour site Egly où seul les FR du T14 ont été considérés), test de Student (p<0,05). Légende : M=Marnay, B=Bougival, T=Triel, A=Andrésy, D=Dourdan et E=Egly.

La faible valeur de FR mesurée sur Dourdan est associée à une plus forte teneur en carbone organique dissoute et à de fortes teneurs en métaux particulaires et dissous, essentiels pour les organismes comme le fer et le manganèse. Les faibles valeurs de taux de filtration pourraient être expliquées par les fortes teneurs en éléments indispensables aux moules. Ces dernières adaptent alors, ou non, leur filtration en conséquence de la biodisponibilité des nutriments. Il a été montré dans une étude avec *Dreissena polymorpha* (Schneider *et al.*, 1998) que le FR (quantité d'eau filtré) était constant quelles que soient la qualité et la quantité de particules alors que le taux d'épuration (CR= clearance rate) qui correspond à la quantité de particules filtrées, augmente avec la quantité de particules et diminue avec la qualité des particules (rapport organique sur inorganique des particules). Les moules semblent réduire la sélection des particules lorsqu'elles ont plus facilement accès à ce dont elles ont besoin.

Cependant ce résultat n'est qu'une piste d'interprétation parmi d'autres car d'autres études n'ont pas forcément abouti aux mêmes conclusions (Reeders *et al.*, 1989; Madon *et al.*, 1998; Schneider *et al.*, 1998). L'étude des variations du FR est relativement complexe car elle dépend à la fois de l'organisme et du lieu d'étude, ainsi, les résultats obtenus au cours d'une étude sont difficilement extrapolables à d'autres.

En ce qui concerne la variabilité de la mesure du FR qui est de 40 % dans notre étude, la même variabilité a été constatée dans l'étude de Madon (1998) et par nous même avec le système utilisé en laboratoire par la suite. Cette forte variabilité peut s'expliquer par la

variabilité biologique, inter-individu, car dans les deux expériences, la nôtre et celle de Madon (1998), la mesure est effectuée sur une moyenne de 15 organismes minimum. Il est d'ailleurs observé sur le site d'Andrésy une diminution de cette variabilité supposée inter-individu. Ceci peut s'expliquer par l'impact direct de la STEP d'Andrésy qui rend les caractéristiques du milieu plus constantes que sur les autres sites.

La mesure du taux de filtration *in situ* est un enjeu important car elle permettrait de prendre en compte la qualité et la quantité des particules ainsi que la vitesse du courant, qui sont des paramètres influençant ce taux. *In fine* une mesure précise du taux de filtration permettrait à priori de compléter le jeu de données et donc d'améliorer l'estimation de la biodisponibilité particulaire. Cependant il n'a pas été possible de proposer un système transposable et adapté à la mesure du taux de filtration pour les dreissènes en rivière. Le taux de filtration sera mesuré *ex situ*, seule la vitesse du courant ne sera pas prise en compte.

La mesure du taux de filtration a permis d'observer à Dourdan sur l'Orge un FR plus faible comparativement aux sites de la Seine et d'Egly sur l'Orge. De plus, une diminution de la variabilité du FR inter-individu à Andrésy, site impacté par la STEP Seine Aval, a été observée. La mesure du FR *ex situ* pas n'a pas permis de corréler de façon robuste les valeurs de FR à une caractéristique quelconque des sites.

4. Etat chimique des sites

4.1. Caractérisation physico-chimique de l'eau et des particules

Les résultats concernant la température, le pH et la conductivité de l'eau sont présentés dans le tableau 15.

Tableau 15 : Valeurs de la température (°C), du pH et de la conductivité (µS.cm^{-1}) à t_0-$t_{14jours}$.

Sites	Température (°C)	pH	Conductivité (µS.cm^{-1})
Marnay	9,4-9,7	8,15-8,01	517-531
Bougival	9,5-9,2	8,08-8,22	525-571
Andrésy	8,0-7,5	7,90-7,65	537-626
Triel	9,2-9,2	7,23-7,94	602-611
Dourdan	7,8-7,5	7,81-7,87	613-619
Egly	8,9-8,5	8,06-7,91	632-661

La température en Seine est constante dans le temps et dans l'espace à l'exception d'Andrésy où la température est plus faible de 2 degrés. De même sur l'Orge, la température est constante (Tableau 10).

Sur la Seine, les valeurs de pH diminuent globalement d'amont en aval. Celles de Marnay et Bougival sont proches. La valeur du pH est la plus faible à Andrésy. En Seine, la diminution du pH est caractéristique de l'impact des rejets urbains. Sur l'Orge, le pH est stable dans le temps et dans l'espace (Tableau 10).

La conductivité augmente, sur la Seine, d'amont en aval, avec une plus forte conductivité à Andrésy par rapport à tous les autres sites. La conductivité augmente également d'amont en aval sur l'Orge. Les valeurs de conductivité sont stables (variation inférieure à ± 45 µS.cm^{-1} à Triel, sinon inférieure à 0,5 µS.cm^{-1}) pour un même site entre deux mesures (Tableau 10).

Ces augmentations de conductivité sont la marque d'une pression anthropique croissante. Cette pression se caractérise également par une augmentation des concentrations en particules ou en matières organiques dissoutes (Tableau 11).

L'ensemble des résultats concernant la caractérisation chimique de l'eau et des particules est présenté dans le tableau 16.

Les valeurs en anions et cations suivent un gradient croissant d'amont en aval sur la Seine, à l'exception d'Andrésy qui présente une plus forte concentration en chlore, nitrites, nitrates, phosphates et sulfates. Un enrichissement en MES et en carbone organique et inorganique, en carbone et azote particulaire a également été observé, avec des teneurs maximales systématiquement à Andrésy. Les teneurs en chlorophylle suivent ce même gradient mais ne sont pas maximales à Andrésy contrairement aux autres valeurs.

Sur l'Orge, les teneurs en anions et cations, en chlorophylle, en MES, en carbone et en azote particulaire et en COD sont plus fortes sur le site aval, Egly, que sur le site amont, Dourdan. Seules les teneurs en CID sont identiques entre les deux sites.

Tableau 16 : Teneurs en anions et cations (mg.L^{-1}), en chlorophylle (µg.L^{-1}), en matières en suspensions (MES) (mg.L^{-1}), en carbone organique et inorganique dissous (mg.L^{-1}) (COD et CID) et en carbone et azote particulaire (g.g^{-1}) à t_0-$t_{14jours}$.

Sites	Li^+	Na^+	NH_4^+	K^+	Mg^{2+}	Ca^{2+}	F^-	Cl^-	NO_2^-	Br^-	NO_3^-	PO_4^{2-}	SO_4^{2-}	Chlorophylle (µg.L^{-1})	MES (mg.L^{-1})	COD (mg.L^{-1})	CID (mg.L^{-1})	C_{part} (g.g^{-1})	N_{part}. (g.g^{-1})
Marnay	<LQ	5,40-7,47	<LQ	14,70-1,01	1,80-2,85	115,90-127,98	<LQ	11,56-16,16	<LQ	<LQ	23,30-23,38	0,05-0,08	15,90-18,15	10,3-11,7	16,80-12,48	2,46-2,12	48,82-48,82	49,90-73,85	10,50-19,04
Bougival	<LQ	9,15-15,75	0,02-0,04	3,42-4,26	3,40-6,32	113,20-135,83	<LQ	15,84-27,37	0,13-<LQ	<LQ	25,60-22,23	0,12-0,20	24,10-40,27	11,5-17,6	22,00-11,60	3,29-2,59	47,41-48,44	56,70-86,44	8,55-21,03
Andrésy	<LQ	12,7-15,00	0,21-0,51	4,20-3,23	4,10-5,19	117,70-131,70	<LQ	19,79-26,39	0,49-0,76	<LQ	25,20-24,39	0,37-0,25	28,20-41,99	11,6-14,1	28,80-9,38	3,80-3,43	47,83-46,84	71,00-86,80	8,61-37,47
Triel	<LQ	11,33-12,21	0,17-0,32	4,23-2,00	4,20-4,31	113,30-137,70	<LQ	17,55-21,27	0,54-0,54	<LQ	24,80-22,84	0,29-0,21	28,30-32,24	19,2-13,3	25,78-15,24	3,98-3,18	47,02-49,72	64,00-79,37	8,67-16,35
Dourdan	<LQ	24,76-18,99	<LQ-0,04	2,50-2,50	5,10-5,99	112,10-129,63	<LQ	42,90-36,08	<LQ	<LQ	11,70-12,67	0,05-0,15	29,70-29,98	13,8-17,6	11,49-13,33	3,27-3,63	48,74-50,06	90,00-96,20	14,10-17,70
Egly	<LQ	21,15-19,20	<LQ-0,36	4,04-3,66	7,20-7,89	120,90-136,04	<LQ	37,78-35,25	<LQ	<LQ	17,00-16,90	0,09-0,14	36,30-37,61	58,2-40,3	11,71-21,40	3,09-3,11	49,85-50,64	113,78-99,91	17,00-21,40

LQ du NH_4^+= 0,01 µg.L^{-1}, LQ du NO_2^-= 0,02 µg.L^{-1} et LQ du Li^+, F^-, Br^- = 1 µg.L^{-1}

4.2. Contamination métallique de l'eau, des particules et des organismes

Dans le cas des métaux totaux et dissous, les valeurs sont la moyenne des mesures à t_0 et à t_{jour14} alors que la valeur des métaux particulaires est le résultat d'une seule extraction totale.

4.2.1. Contamination métallique de la Seine

Les teneurs en métaux (totaux, dissous et particulaires) des sites le long de la Seine sont présentées dans le tableau 17.

Tableau 17 : Teneurs métalliques dans le compartiment dissous (µg.L^{-1}) et particulaire (µg.g^{-1}) analysés à l'ICP-MS en mode CCT, d'amont en aval de la Seine.

Totaux (µg/L)	**Cr**	**Co**	**Mn**	**Ni**	**Cu**	**Zn**	**Cd**	**Pb**	**Fe**
Marnay	0,82 ±0 ,16	0,25 ±0,10	11,52 ±3,63	1,30 ±0,34	3,35 ±0,60	8,23 ±1,87	0,03 ±0,02	0,80 ±0,43	344,25 ±42,36
Bougival	1,34 ±0,36	0,36 ±0,02	18,86 ±2,74	1,51 ±0,21	5,22 ±0,00	13,72 ±0,78	0,05 ±0,02	1,85 ±0,42	554,90 ±263,47
Andrésy	1,64 ±1,11	0,44 ±0,14	25,33 ±14,53	2,07 ±0,48	6,52 ±1,40	17,18 ±8,59	0,06 ±0,03	2,17 ±1,40	702,60 ±580,39
Triel	2,18 ±1,23	0,47 ±0,05	25,60 ±2,21	2,60 ±1,13	5,81 ±1,55	19,34 ±9,45	0,05 ±0,00	1,79 ±0,05	643,45 ±170,91
Dissous (µg/L)	**Cr**	**Co**	**Mn**	**Ni**	**Cu**	**Zn**	**Cd**	**Pb**	**Fe**
Marnay	0,10 ±0,01	0,11 ±0,05	3,31 ±1,66	0,69 ±0,03	0,88 ±0,39	3,3 ±0,15	0,01 ±0,01	0,05 ±0,01	10,95 ±1,94
Bougival	0,21 ±0,06	0,14 ±0,03	5,93 ±2,87	1,18 ±0,21	1,23 ±0,4	3,53 ±1,29	0,01 ±0,01	0,13 ±0,04	16,44 ±3,03
Andrésy	0,28 ±0,01	0,18 ±0,05	7,82 ±2,76	1,31 ±0,32	1,41 ±0,45	5,45 ±0,18	0,02 ±0,01	0,19 ±0,04	27,70 ±4,77
Triel	0,20 ±0,01	0,21 ±0,08	9,01 ±5,17	1,52 ±0,16	1,33 ±0,35	4,94 ±1,84	0,01 ±0,01	0,16 ±0,04	24,76 ±4,61
Particulaires (µg/g)	**Cr**	**Co**	**Mn**	**Ni**	**Cu**	**Zn**	**Cd**	**Pb**	**Fe**
Marnay	38,84	5,01	299,28	20,08	20,08	70,97	0,19	16,45	13389,13
Bougival	70,22	9,35	585,09	49,26	49,26	284,48	1,43	85,80	26592,50
Andrésy	72,85	9,58	537,37	36,62	88,21	349,41	1,50	90,36	29996,71
Triel	70,16	10,01	715,71	41,32	73,96	286,58	1,32	80,18	28133,27

- *Eaux brutes et compartiment dissous*

En Seine, un enrichissement amont-aval des teneurs en métaux dans les eaux brutes et le compartiment dissous est observé.

Il faut noter qu'à Andrésy, les teneurs en Cr, Cu, Zn, Cd, Pb et Fe sont les plus fortes et sont même supérieures à celles de Triel, qui est une station plus en aval.

- *Compartiment particulaire*

Dans le cas du compartiment particulaire, il est également observé un fort enrichissement amont-aval (multiplication par 2, voire par 3 ou 4, entre Marnay et les sites plus en aval) des particules. De plus, une contamination plus forte à Andrésy que sur les 3 autres sites est constatée pour Cr, Cu, Zn, Cd, Pb et Fe.

4.2.2. Contamination métallique de l'Orge

Les teneurs en métaux (totaux, dissous et particulaires) de l'Orge sont présentées dans le tableau 18.

Tableau 18 : Teneurs métalliques dans le compartiment dissous (µg/L) et particulaire (µg/g) analysés à l'ICP-MS en mode CCT, sur l'Orge.

Totaux (µg/L)	**Cr**	**Co**	**Mn**	**Ni**	**Cu**	**Zn**	**Cd**	**Pb**	**Fe**
Dourdan	0,77 ±0,25	0,42 ±0,18	92,42 ±34,49	1,28 ±0,37	3,48 ±0,49	6,95 ±0,42	0,02 ±0,01	0,90 ±0,31	663,95 ±208,38
Egly	0,88 ±0,18	0,37 ±0,13	60,96 ±11,81	1,37 ±0,08	4,22 ±0,39	9,47 ±0,88	0,03 ±0,00	1,23 ±0,34	526,65 ±168,79
Dissous (µg/L)	**Cr**	**Co**	**Mn**	**Ni**	**Cu**	**Zn**	**Cd**	**Pb**	**Fe**
Dourdan	0.085 ±0,01	0,21 ±0,06	79,94 ±12,48	0,67 ±0,01	0,68 ±0,06	2,40 ±0,62	0,01 ±0,001	0,06 ±0,02	47,80 ±14,90
Egly	0,12 ±0,01	0,16 ±0,01	42,81 ±1,02	0,95 ±0,17	0,95 ±0,17	1,94 ±0,16	0,005 ±0,0005	0,09 ±0,01	25,18 ±4,18
Particulaires (µg/g)	**Cr**	**Co**	**Mn**	**Ni**	**Cu**	**Zn**	**Cd**	**Pb**	**Fe**
Dourdan	57,95	19,2	1045,95	32,96	36,63	175,89	0,59	58,83	29,7
Egly	51,68	9,12	763,5	34,46	58,32	228,26	0,99	59,23	21,7

- *Métaux totaux et compartiment dissous*

Le gradient de contamination, d'amont en aval, des métaux totaux et dissous n'est pas systématiquement observé (Tableau 12). En effet, pour Cr, Co et Cd, les valeurs restent stables d'amont en aval. Ni, Cu et Pb présentent un gradient d'enrichissement amont-aval. A l'inverse, les plus fortes concentrations en Mn et Fe, sur le site amont, sont d'origine naturelle et s'expliquent par le lessivage des sols forestiers majoritaires en amont du bassin (Figure 29) qui a été démontré par Le Pape (2012).

- *Compartiment particulaire*

Dans les cas du Ni, du Cu, du Zn, du Cd et du Pb, une augmentation d'amont en aval sur les sites de l'Orge des teneurs métalliques particulaires est observée. A l'inverse pour Cr, Co et Mn une diminution entre l'amont et l'aval (Tableau 12) est constatée.

Sur les deux sites, les teneurs métalliques mesurées dans les particules sont relativement faibles comparées aux résultats d'un travail réalisé sur 1 an en 2011 (Le Pape *et al.*, 2012) (exception du Cu). Il faut noter des valeurs en Cr, Zn et Pb plus faibles de 50 %, de 33 % et de 20 % respectivement. Lors des campagnes de prélèvements, nous sommes en période hydrologique de dilution des contaminants (Le Pape *et al.*, 2012) car les prélèvements ont été réalisés après des épisodes pluvieux important d'automne (Figure 32) et hors pluies, c'est-à-dire hors lessivage des sols urbains potentiellement contaminés (Le Pape *et al.*, 2012). Ainsi, la période de prélèvement peut expliquer le fait que la contamination particulaire en certains métaux comme le Cr, le Zn et le Plomb soit plus faible que la moyenne mesurée par Le Pape et *al.* (2012) sur une année.

4.2.3. Synthèse de la contamination métallique en Seine

Des études statistiques ont été réalisées sur les sites avals de la Seine (Bougival, Andrésy et Triel) et il a été montré que les contaminations métalliques dissoutes et particulaires n'étaient pas significativement différentes (Test de Student, $p>0,05$) entre les sites avals.

Nous avons observé que la contamination métallique des sites en aval de la Seine n'est pas statistiquement différente selon le site (Test de Student, $p>0,05$) (Section 4.2.2.). Ainsi, les valeurs des sites avals (Bougival, Triel-sur-Seine et Andrésy) ont été regroupées. Puis, nous avons constaté que les sites avals sur la Seine pour les métaux particulaires totaux et extraits sont systématiquement plus contaminés que le site amont, Marnay (Figure 42).

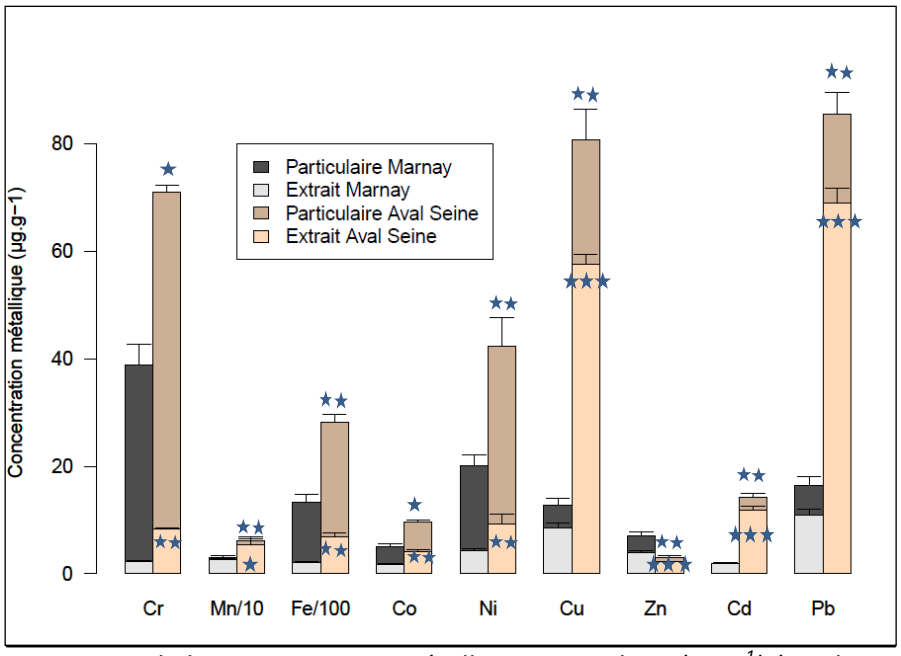


Figure 42 : Comparaison de la contamination métallique particulaire (µg.g^{-1}) (1 valeur et l'écart type est le pourcentage d'erreur de l'analyse (10 %)) et extraite (HCl 1N)(moyenne de trois extractions et écart type des 3 extractions) entre Marnay et les sites avals (test de Student ✿ p<0,05, ✿ ✿ p<0,01 et ✿ ✿ ✿ p<0,001).

Pour l'eau, la majorité des métaux totaux sont en plus grande concentration sur les sites avals de la Seine à l'exception du cobalt, du nickel et du cadmium. Par contre, les métaux dans les phases dissoutes et labiles, qui sont en plus grande concentration dans les sites avals, sont moins nombreux. En ce qui concerne la phase dissoute, il y a seulement le cuivre, le chrome et le plomb, et en ce qui concerne la phase labile, seulement le cuivre et le zinc (Figure 43).

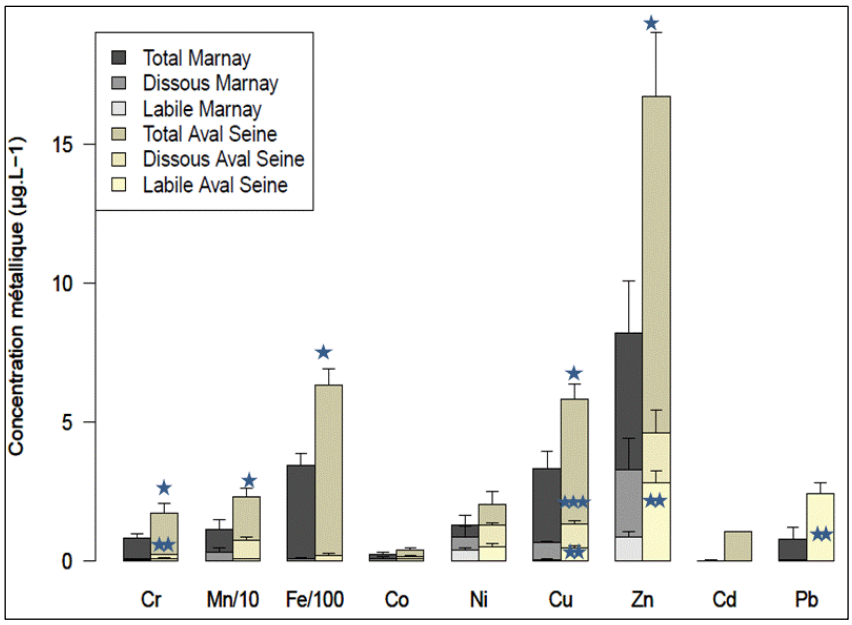


*Figure 43 : Comparaison de la contamination métallique totale (µg.L^{-1}) (moyenne et écart type de 2 mesures), dissoute (moyenne et écart type de 2 mesures) et labile (moyenne et écart type de 3 mesures de DGTs) entre Marnay et les sites avals (test de Student * p<0,05, ** p<0,01 et *** p<0,001).*

Les valeurs de contaminations métalliques dissoutes et particulaires sont similaires à une étude réalisée sur Marnay, Bougival et Triel en en Seine courant 2009 (Priadi *et al.*, 2011b). Les valeurs de contamination en métaux dans le compartiment dissous des sites de Dourdan et d'Egly sur l'Orge sont similaires à une étude réalisée sur l'Orge sur une année entre 2010-2011 (Le Pape *et al.*, 2012). Ce n'est pas le cas pour le compartiment particulaire.

Ainsi, globalement, les valeurs de contaminations obtenues dans cette étude sont du même ordre de grandeur que les moyennes mesurées sur un an, à l'exception de la phase particulaire dans l'Orge amont.

4.2.4. Synthèse de la contamination métallique sur l'Orge

Sur l'Orge, il n'y a pas de différence significative (Test de Student, p >0,05) de contamination de l'eau, en métaux totaux, dissous et labiles, entre le site amont : Dourdan et celui aval : Egly. En revanche, il y a une différence significative (Figure 44) en ce qui concerne le cuivre et le cadmium total particulaires et pour le fer, le cuivre, le zinc et le cadmium extraits.

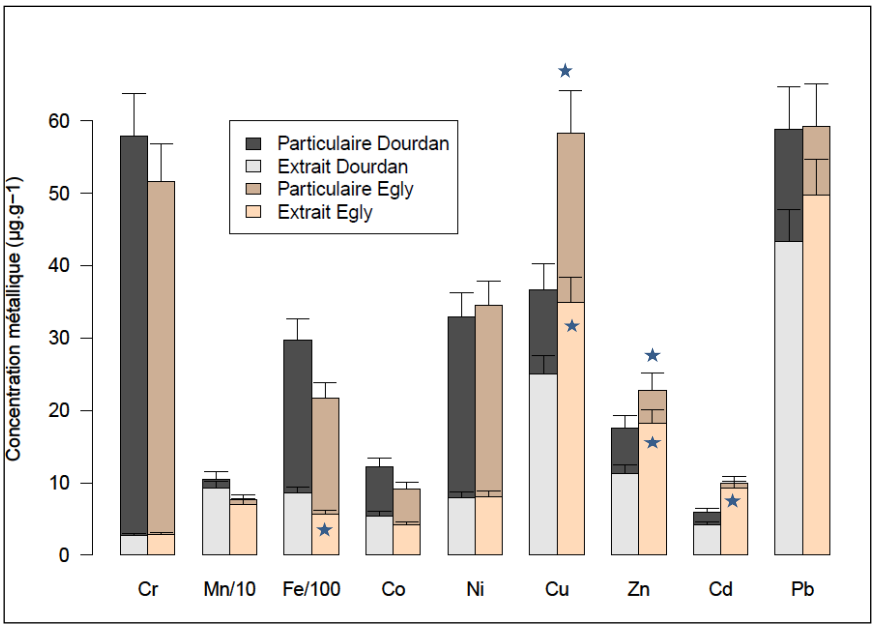


*Figure 44 : Comparaison de la contamination métallique particulaire (µg.g^{-1}) (1 valeur et l'écart type est le pourcentage d'erreur de l'analyse (10 %)) et extraite (moyenne de trois extractions et écart type des 3 extractions) entre Dourdan et Egly (test de Student * p<0,05).*

4.2.5. Contamination métallique des tissus mous des dreissènes

La contamination des moules en Cr, Ni, Cu, Cd et Zn sur les sites en Seine est comparable à de récents travaux (Bourgeault *et al.*, 2011) et les valeurs de contamination des moules avant transplantations sont les moyennes de 2 mesures (à chaque fois 10 moules regroupées), alors que celles sur les sites sont la valeur unique de 15 moules regroupées (Tableau 19), car il n'y avait pas assez de matériel pour faire des réplicats.

*Tableau 19 : Teneurs métalliques dans les tissus mous des dreissènes (µg/g) analysés à l'ICP-MS en mode CCT, en Seine et sur l'Orge. *n'a pas pu être analysé en mode CCT et n'a pas été analysé autrement.*

Moules (µg/g)	Cr	Co	Mn	Ni	Cu	Zn	Cd	Pb	Fe
Moules avant transplantation	0,7 ±0,44	0,56 ±0,09	12,15 ±4,39	4,18 ±0,16	8,85 ±2,74	95,29 ±12,78	0,42 ±0.15	0.35 ±0.15	*
Marnay	0,67	0,76	11,32	6,41	11,46	106,43	0,76	0,25	176,81
Bougival	0,69	0,73	13,44	5,42	10,81	100,34	0,32	0,43	231,76
Andrésy	0,61	0,83	13,04	4,78	10,87	121,38	0,42	0,34	291,59
Triel	0,66	0,68	14,67	4,96	9,80	102,63	0,37	0,26	238,92
Dourdan	0,69	0,94	40,36	6,72	11,47	123,03	0,51	0,32	351,29
Egly	0,63	0,83	50,34	4,97	18,14	127,34	0,54	0,60	350,21

Les contaminations en Co, Mn et Pb par les dreissènes sont des contaminations non étudiées à notre connaissance dans des travaux *in situ* en rivières.

Sur l'Orge les contaminations des organismes en Cr, Ni, Cu, Zn, et Pb sont identiques à celles en Seine. Mais dans le cas du Co, du Mn, du Zn et du Fe, la contamination est plus forte ; 1,15 fois plus élevée, 4 fois plus élevée, 1,20 fois plus élevée et presque 2 fois plus élevée respectivement, dans les tissus des moules exposées sur l'Orge par rapport aux concentrations dans les tissus de moules exposées en Seine.

Sur les deux cours d'eau, il a été constaté que les teneurs en métaux mesurées dans les tissus des moules ne suivent pas le gradient de contamination du milieu. En effet, les moules bioaccumulent plus de Ni, Cu et Cd sur Marnay que sur les autres sites, alors que les teneurs totales, dissoutes et particulaires sont moins élevées à Marnay. Sur l'Orge, pour Cr, Co, Ni et Fe, il a été constaté que le site le moins impacté par l'urbanisation à savoir Dourdan, présente quand même les plus fortes teneurs bioaccumulées par les moules.

Globalement, les caractéristiques physico-chimique de l'eau (pH, conductivité, anions cations, etc.) sur les sites les plus en aval le long de la Seine et le long de l'Orge changent par rapport aux sites amont (Marnay sur la Seine et Dourdan sur l'Orge) et sont représentatives d'une contamination anthropique. Le site d'Andrésy juste en aval de la STEP qui traite la majorité des effluents d'Ile-de-France est le plus impacté. Les contaminations métalliques particulaires et dissoutes sont finalement croissantes d'amont en aval. La contamination des tissus mous des moules n'est pas aussi marquée par rapport à leur localisation. Les moules de Marnay (site amont en Seine) bioaccumulent plus certains métaux que les moules en aval.

5. Relation entre la contamination des milieux et la bioaccumulation et les limites du modèle de bioaccumulation

5.1. Sites sur la Seine

La contamination croissante entre le site de Marnay et les sites plus avals en Seine est comparée à la bioaccumulation des métaux par les organismes. Il s'avère que la bioaccumulation des métaux par les organismes n'est pas représentative de la plus forte contamination aval, à certaines exceptions près. En effet, pour le manganèse, le fer et le plomb, qui sont significativement plus accumulés en aval, la corrélation est positive (Tableau 20). Il existe par ailleurs une corrélation négative (Tableau 20) dans le cas du nickel, du cuivre et du cadmium. Ces trois métaux sont plus fortement présents dans les sites avals et sont pourtant moins accumulés par les moules à l'aval.

Tableau 20 : Corrélations linéaire, exponentielle et puissance mises en évidence entre les teneurs métalliques mesurées (totales, dissoutes, labiles, particulaires et particulaires extraites) et les teneurs bioaccumulées par les organismes en Seine.

**corrélation exponentielle, **corrélation puissance*

Métaux	Total	Dissous	Labile	Particulaire	Particulaire extrait
Cr	Constant R^2=0,6000	Constant R^2=0,3744	<	<	Constant R^2=0,3145
Mn	<	Positive R^2=0,8177	Positive R^2=0,5096	<	<
Fe	Positive R^2=0,3789	Positive R^2=0,8436	o	Positive R^2=0,4951	Positive R^2=0,6458
Co	<	<	<	<	<
Ni	<	Négative R^2=0,9389	Négative R^2=0,5031	<	<
Cu	Négative R^2=0,3795	Négative R^2=0,3448	<	Négative R^2=0,3476	Négative R^2=0,4940
Zn	<	Positive R^2=0,4227	<	<	<
Cd	Négative R^2=0,6909	<	Négative R^2=0,5318	Négative R^2=0,9267	Négative R^2=0,9897
Pb	Positive R^2=0,3653	<	Positive R^2=0,3672**	Positive R^2=0,4062*	Positive R^2=0,4235*

< : pas de corrélation significative les R^2 sont inférieurs à 0,1 et visuellement aucune tendance n'est observée
O : aucune corrélation n'a pu être déterminée car les teneurs en métaux labiles n'ont pas été déterminées pour ce métal

La corrélation entre le zinc dissous et les teneurs retrouvées dans les tissus mous des moules en Seine est à noter. En effet, elle a déjà été démontrée dans une autre étude sur d'autres bivalves marins (Sakellari *et al.*, 2013). De plus, il a été montré que la voie dissoute était la voie de bioaccumulation majoritaire pour le Zn pour des bivalves marins (Chong and Wang, 2001) et ceci s'explique par le fait que le zinc est transporté par une voie simple d'internalisation (associé à un liguant puis transporté à travers la membrane).

Nous avons également observé des corrélations plus fortes entre la phase particulaire extraite et les teneurs dans les tissus des organismes par rapport aux corrélations entre la phase particulaire totale et les teneurs dans les tissus des moules.

Ces résultats concordent avec ceux d'une étude en méditerranée, qui a montré une plus forte corrélation entre les métaux labiles (DGTs) et mobiles (extraits à HCl à 1N) et la bioaccumulation (Sakellari *et al.*, 2013) qu'entre les métaux totaux et les métaux bioaccumulés.

Il existe également des corrélations négatives, notamment pour les métaux comme le nickel, le cuivre et le cadmium (cf. paragraphe 5.2.).

5.2. Sites sur l'Orge

Finalement la contamination des moules en métaux est significativement plus forte à Egly en cuivre et en plomb mais pas en nickel car la contamination des moules est plus forte à Dourdan (Figure 45).

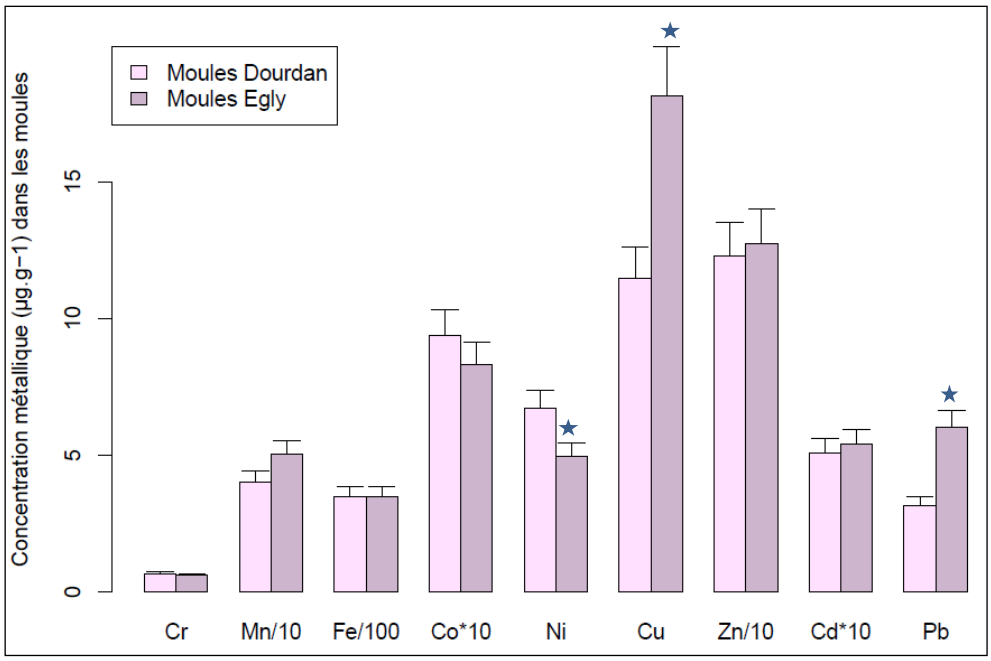


*Figure 45: Comparaison de la bioaccumulation des métaux pour les moules à Dourdan (µg.g^{-1}) (une mesure et un écart type dû à la variabilité de la mesure (10 %)) et à Egly (une mesure et un écart type dû à la variabilité de la mesure (10 %)) (test de Student * p<0,05 et * * p<0,01).*

Ainsi, sur les sites de l'Orge, la bioaccumulation des métaux par les moules ne suit pas les variations de contamination des milieux en métaux.

Les corrélations négatives entre les teneurs en métaux sur les sites et celles bioaccumulées notamment dans le cas du nickel (sur la Seine et sur l'Orge) peuvent s'expliquer par des phénomènes de régulations qui sont pris en compte par le modèle biodynamique.

Il semble, finalement, que les données de bioaccumulation ne soient pas systématiquement, et ce pour tous les métaux, en relation avec la contamination des sites. L'absence de lien entre la bioaccumulation brute et la contamination des milieux a déjà été fait pour d'autres études, également en Seine (Bourgeault, 2010).

Ainsi par la suite, nous allons voir si l'interprétation des concentrations en métaux au moyen du modèle biodynamique permet de relier les concentrations bioaccumulées aux teneurs dans le milieu. Car il a été montré l'existence d'une relation entre la contamination du milieu et l'influx des métaux vers les organismes (Bourgeault, 2010) lorsque les variations biologiques (excrétion et croissance) sont prises en compte. L'influx est calculé en faisant l'hypothèse que les organismes ont atteint l'équilibre avec le milieu et donc :

$$\frac{dC_{org}}{dt} = \underbrace{k_u \cdot C_d + AE \cdot IR \cdot C_p}_{\text{Influx}} - \underbrace{(k_e + g) \cdot C_{org}}_{\text{Efflux}} = 0$$

Et l'influx est égal à :

$$I = (k_e + g) \cdot C_{org} \qquad (17)$$

Or, les poids secs des organismes exposés sur les différents sites et les indices de conditions qui sont le rapport du poids sec des tissus sur le poids total sec (tissus et coquille) ont été évalués après 14 jours d'exposition et ont été comparés au poids sec et IC initiale de l'ensemble des moules (Figure 46).

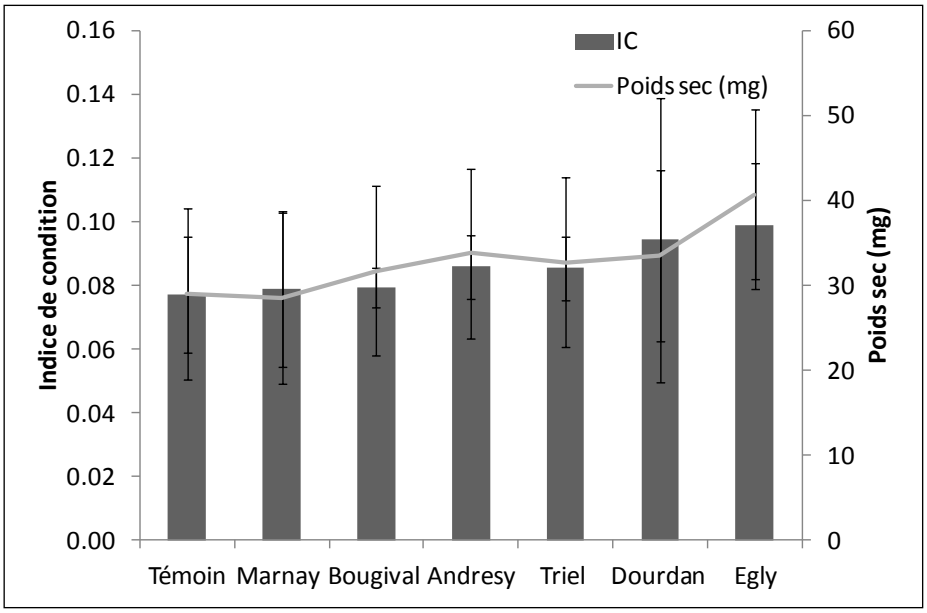


Figure 46 : Comparaison des poids secs et des IC des moules exposées (calculés sur 15 moules) après 14 jours sur différents sites au poids sec et à l'IC initiale (Témoin) évalués avant l'exposition sur un ensemble de moules (20). Il n'y a pas de différence significative entre les valeurs de poids secs et d'IC finaux par rapport à ceux témoins. (Test de Student,p>0,.05)

Il n'y a pas de différence significative du poids sec et de l'IC (Test de Student, P>0,05) entre l'état initial (Témoin) et après 14 jours d'exposition quel que soit le site donc le taux de croissance est nul, c'est-à-dire g=0.

L'influx est donc égal à :

$$I = k_e \cdot C_{org} \quad (18)$$

Or il a été supposé que le taux d'excrétion (k_e) est une constante. Ainsi, le calcul de l'influx revient à multiplier les teneurs bioaccumulées par une constante. Par conséquent, les relations entre ce qui est bioaccumulé ou l'influx et la contamination des milieux ne sont donc pas modifiées, les corrélations sont identiques.

Ainsi, la prise en compte de l'influx, lorsque l'on suppose que les organismes sont à l'équilibre, ne modifie pas les corrélations observées entre les métaux bioaccumulés et la contamination du milieu.
Il existe donc une corrélation positive entre la contamination des milieux en manganèse, fer, zinc et plomb et la bioaccumulation. A l'inverse, la corrélation est négative pour le nickel, le cuivre et le cadmium et il n'y a pas de corrélation pour le cobalt.

Les corrélations négatives ou absences de corrélation qui sont aussi observées lorsque l'on prend en compte le modèle peuvent être révélatrices d'une régulation du métal comme précédemment montré dans une étude (Sakellari *et al.*, 2013).
De plus, il a déjà été observé en Seine, une plus forte bioaccumulation des métaux sur un site à priori moins contaminée (Marnay) (Bourgeault, 2010) et nous observons la même chose, ainsi les corrélations négatives peuvent également s'expliquer par une biodisponibilité différentes des métaux selon les sites.

5.3. Validation et limites du modèle de bioaccumulation : jeux de données in situ

D'après le modèle biodynamique, la concentration dans l'organisme est fonction des concentrations dans le milieu selon l'équation suivante :

$$\frac{dC_{org}}{dt} = k_u \cdot C_d + AE \cdot IR \cdot C_p - (k_e + g) \cdot C_{org}$$

Intégrée entre les dates t_0 et $t_{jour\ 14}$ et en faisant les hypothèses suivantes :

- k_u, k_e, AE sont constantes sur 14 jours

- Le taux de croissance (g) est constant sur 14 jours, cela a été vérifié car il a été montré que l'indice de condition, IC, n'est pas significativement différent entre t_0 et $t_{jour\ 14}$
- le taux d'ingestion (IR) utilisé est un IR moyen sur 14 jours
- C_p et C_d sont constants ou sont intégratives,

la relation suivante est obtenue (Guan and Wang, 2006) :

$$C_{org}\left(t_{jour14}\right) = C_{org}\left(t_0\right)\cdot e^{-\left(k_e+g\right)\left(t_{jour14}-t_0\right)} + C_{org-équilibre}\cdot\left(1-e^{-\left(k_e+g\right)\left(t_{jour14}-t_0\right)}\right) = C_{org\ prédit} \quad (19)$$

Avec

$$C_{org-équilibre} = \frac{k_u\cdot C_d + AE\cdot IR\cdot C_p}{k_e} \quad (20)$$

$C_{org\ prédit}$ est la quantité de métaux prédite retrouvée dans les tissus des moules après 14 jours d'exposition en partant du principe que les organismes ne sont pas à l'équilibre avec le milieu. $C_{org\ équilibre}$ est la quantité prédite retrouvée dans les tissus des moules après 14 jours d'exposition mais en faisant l'hypothèse, cette fois, que les organismes sont à l'équilibre avec le milieu. Cette hypothèse permet de simplifier les calculs.

Les concentrations en métaux mesurées dans les dreissènes ont été comparées aux concentrations prédites par le modèle, en supposant ou non l'équilibre. Les concentrations prédites ont été calculées de différentes façons :

- Soit tous les paramètres ont tous été pris dans la littérature (k_e, k_u, AE et IR) (Tableau 9)
- Soit certains paramètres ont été extraits de l'expérimentation en laboratoire (AE et IR notamment) (Chapitre 2)

Et en ce qui concerne les valeurs en métaux dissous et particulaires (C_d et Cp) :

- soit les valeurs totales ont été testées
- soit ce sont les valeurs supposées biodisponibles, c'est-à-dire labiles car mesurées par la DGT pour la part dissoute et celles issues de l'extraction à HCl 1N pour la part de métaux particulaires, qui ont été testées.

Et l'efficacité d'assimilation (AE) utilisée a été :

- soit tirée de la littérature

- soit expérimentale en laboratoire : déterminée suite au pulse-chase (Chapitre 2)
- soit expérimentale *in situ* c'est-à-dire calculée selon la formule suivante :

$$AE_{calculé} = \frac{C_{org\,mesuré} \cdot k_e - C_d \cdot k_u}{IR.C_p} \quad (21)$$

Par ailleurs, lorsque l'AE est calculée, les paramètres du modèle, k_u et k_e, ont été pris dans la littérature (Tableau 21), les teneurs en C_d ont été assimilées aux métaux labiles mesurés avec les DGT et les teneurs en C_p ont été assimilées aux métaux extraient à l'HCl à 1N. Egalement, le taux d'ingestion (IR) choisi a été celui mesuré sur chacun de site, selon la méthode décrite dans la section 3 ci-dessous et enfin le $C_{org\text{-}mesuré}$ correspond aux teneurs en métaux retrouvées et analysées dans les tissus mous des organismes.

Tableau 21 : Valeurs des constantes d'assimilation par voie dissoute (k_u) et d'excrétion (k_e) tirées de la littérature.

Constantes biodynamiques	Cd*	Cr*	Zn**	Ni***	Cu[iv]
k_u ($L.g^{-1}.j^{-1}$)	$FR \cdot \frac{0.134}{1+10^{3.5} \cdot [Ca]+10^{7.6} \cdot [Zn]}$ [v]	1.15*	1.047**	$FR \cdot \frac{0.034}{1+10^{3.6} \cdot [Ca]}$ [v]	0.163
k_e	0.012 ±0.001*	0.015 ±0.003*	0.018 ±0.003**	0.019***	0.022[iv]

*Roditi et Fischer 99 (moyenne de la k_e de CrIII et CrIV obtenue par voie dissoute et trophique respectivement et moyenne trophique et dissoute pour Cd), **Wang et al 96 (*M. edulis),* ****Zaroogian et Johnson (moyenne de la k_e voie dissoute et de la k_e voie trophique obtenue pour M.edulis),* [iv]*Mersch et al 93 et* [v]Bourgeault et al 2010.

Le modèle biodynamique a été testé avec les données obtenues sur les 6 sites d'exposition. Ainsi, les quantités en métaux mesurées dans les tissus des organismes exposés *in situ* et celles prédites par le modèle ont été comparées.

Dans un premier temps, l'hypothèse que les organismes sont en équilibre avec le milieu a été faite. Cette hypothèse a été faite car une étude précédente a montré que les teneurs bioaccumulées au bout de 14 jours par des organismes encagés sur l'Orge n'étaient pas significativement différentes de celles bioaccumulées après 58 jours (Bourgeault *et al.*, 2010b). Nous vérifierons la pertinence de cette hypothèse dans la conclusion (paragraphe 8.2.1).

En faisant cette hypothèse, le $C_{org\ prédit}$ est calculé selon l'équation suivante, rappel équation (20) :

$$C_{org\ prédit} = \frac{k_u \cdot C_d + AE \cdot IR \cdot C_p}{k_e} = C_{org\ équilibre}$$

Ensuite, dans toutes les simulations les k_u et les k_e ont été tirées de la littérature (Tableau 9). Suivant les simulations, les AE et les IR sont soit tous les deux issus de la littérature et d'expériences en laboratoire, soit l'un issu de la littérature (IR) et l'autre d'une expérience *in situ* (AE)(Bourgeault *et al.*, 2011), soit tous les deux issus de mesures terrains : AE Bourgeault (2011) et IR lors de ce chapitre. Et enfin, en ce qui concerne les concentrations en métaux utilisées, soit ce sont les valeurs totales qui ont été testées, soit ce sont les C_p extraits et les C_d labiles, c'est-à-dire mesurées avec la DGT.

Il s'avère que si les constantes sont majoritairement tirées d'expérimentations *in situ* (AE et IR) (Figure 48, B), l'efficacité de prédiction du modèle est améliorée. Dans ce cas, 47 % des valeurs sont correctement prédites contre 20 % des valeurs, lorsque l'AE n'est pas tiré d'une expérimentation *in situ* mais d'une expérimentation en laboratoire (Figure 47, A).

Les valeurs correctement prédites sont les valeurs comprises entre la droite 1 :1 (prédiction=estimation) et les droites qui représentent le facteur de déviation de 2.

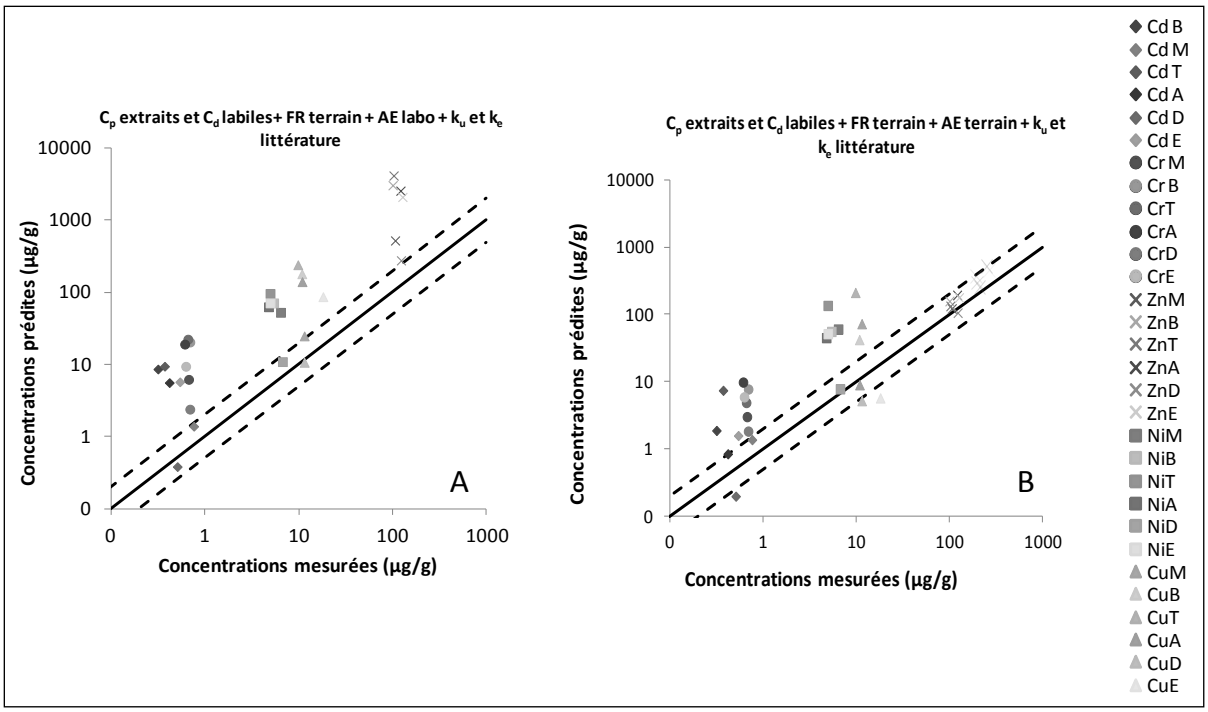


Figure 47 : Comparaison des concentrations prédites aux concentrations mesurées sur les 6 sites pour tous les métaux avec des AE laboratoire et des IR terrain, C_p extraits et C_d labiles et k_u et k_e de la littérature (figure A) et l'AE laboratoire est remplacé par un AE terrain (Figure B). Les droites en pointillées représentent le facteur de déviation égal à 2 par rapport à la droite pleine 1 :1.

D'autres simulations ont été réalisées en faisant varier tous les paramètres d'entrée.

Dans le cas où tous les paramètres AE, IR et k_e et k_u sont évalués en laboratoire et que les teneurs en métaux, dissous et particulaires, sont les teneurs totales, l'efficacité de prédiction est de 3 % seulement (Figure 48, A). Si les teneurs totales sont remplacées par les teneurs labiles (DGT) et extraites (extraction HCl 1N) alors l'efficacité de prédiction passe à 13 % (Figure 48, B).

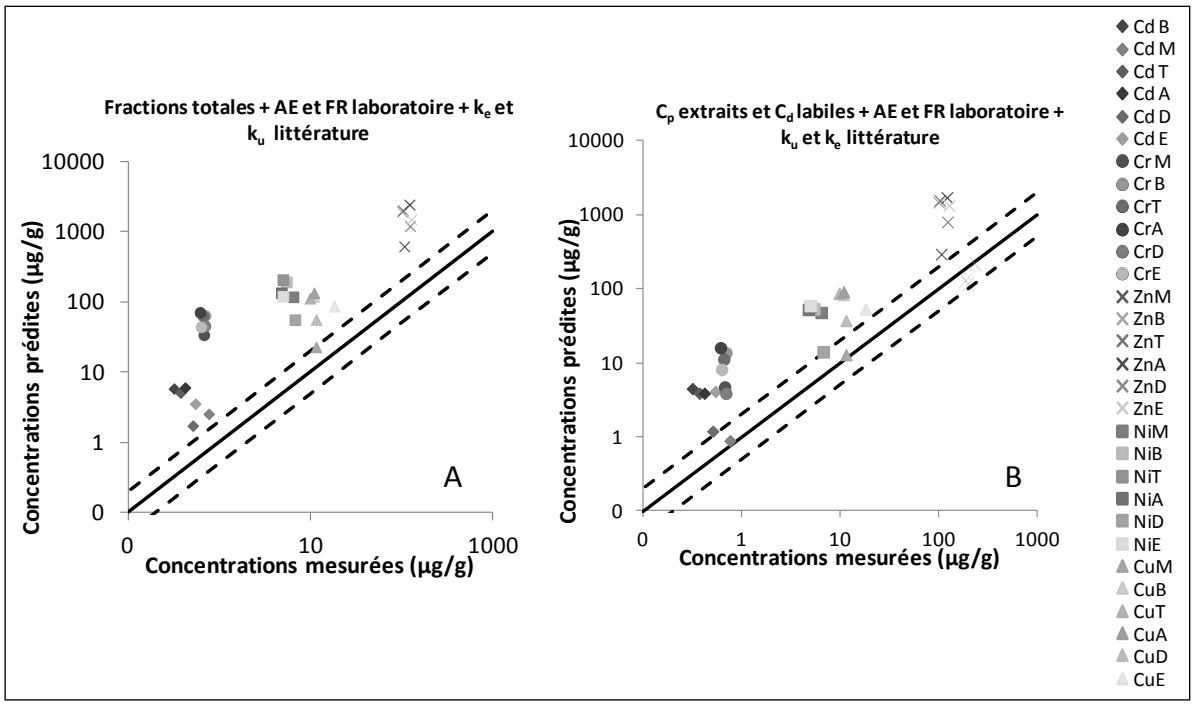


Figure 48 : Comparaison des concentrations prédites aux concentrations mesurées sur les 6 sites pour tous les métaux avec des AE laboratoire et des IR laboratoire, C_p et C_d totaux et k_u et k_e de la littérature (figure A) comparées avec les C_p extraits (extraction HCl) et C_d labiles (DGT) (Figure B). Les droites en pointillées représentent le facteur de déviation égal à 2 par rapport à la droite pleine 1 :1.

L'efficacité de prédiction reste cependant inférieure à quand les AE et IR sont évalués sur le terrain (Figure 47, B).

Le résultat de l'efficacité de prédiction de toutes les simulations réalisées est présenté sous forme d'un schéma synthétique (Figure 49). Il s'avère que le choix des teneurs labiles et extraites, plutôt que totales, améliore la prédiction ainsi que le choix des valeurs déterminées sur le terrain, plutôt qu'en laboratoire.

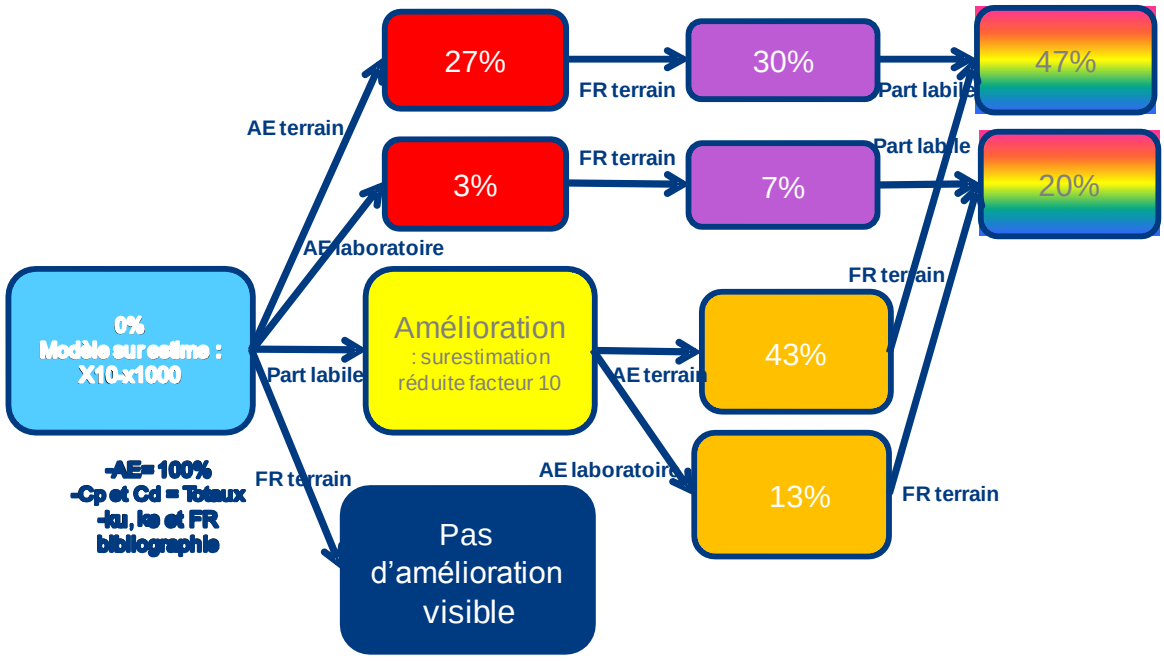


Figure 49 : Schéma présentant les pourcentages de prédictions correctes du modèle suivant les différentes simulations effectuées.

Ces observations confirment un travail précédent qui montre l'amélioration de la prédiction du modèle lorsque les métaux extraits et les AE terrains sont utilisés (Bourgeault *et al.*, 2011).

Malgré tout, l'estimation par le modèle reste peu satisfaisante, avec un maximum de seulement 43 % de valeurs correctement estimées. De plus, il est intéressant de noter que le modèle a tendance à majorer les valeurs.

Lors de ces simulations du modèle, la teneur en métaux prédite avait été calculée en considérant que les organismes étaient à l'équilibre, soit selon l'équation suivante qui est l'équation (20) :

$$C_{org-équilibre} = \frac{k_u \cdot C_d + AE \cdot IR \cdot C_p}{k_e} = C_{org\ prédit}$$

Dans le cas où l'équilibre n'est pas atteint, les teneurs prédites en métaux, dans les moules, se calculent selon l'équation suivante ; rappel de l'équation (19) :

$$C_{org}(t_{jour14}) = C_{org}(t_0) \cdot e^{-(k_e+g)\cdot(t_{jour14}-t_0)} + C_{org-équilibre} \cdot \left(1 - e^{-(k_e+g)\cdot(t_{jour14}-t_0)}\right) = C_{org\ prédit}$$

Ainsi l'efficacité de prédiction du modèle a été évaluée suite à ce nouveau calcul et il est constaté que les teneurs en métaux prédites, dans les organismes, sont inférieures d'un facteur 5, 2-3, 3-4 et 4-6 respectivement pour le cadmium ; le chrome, le cuivre et le nickel par rapport au cas où l'hypothèse d'un état d'équilibre entre organisme et milieux est faite. Les teneurs sont du même ordre de grandeur pour le zinc (Figure 50).

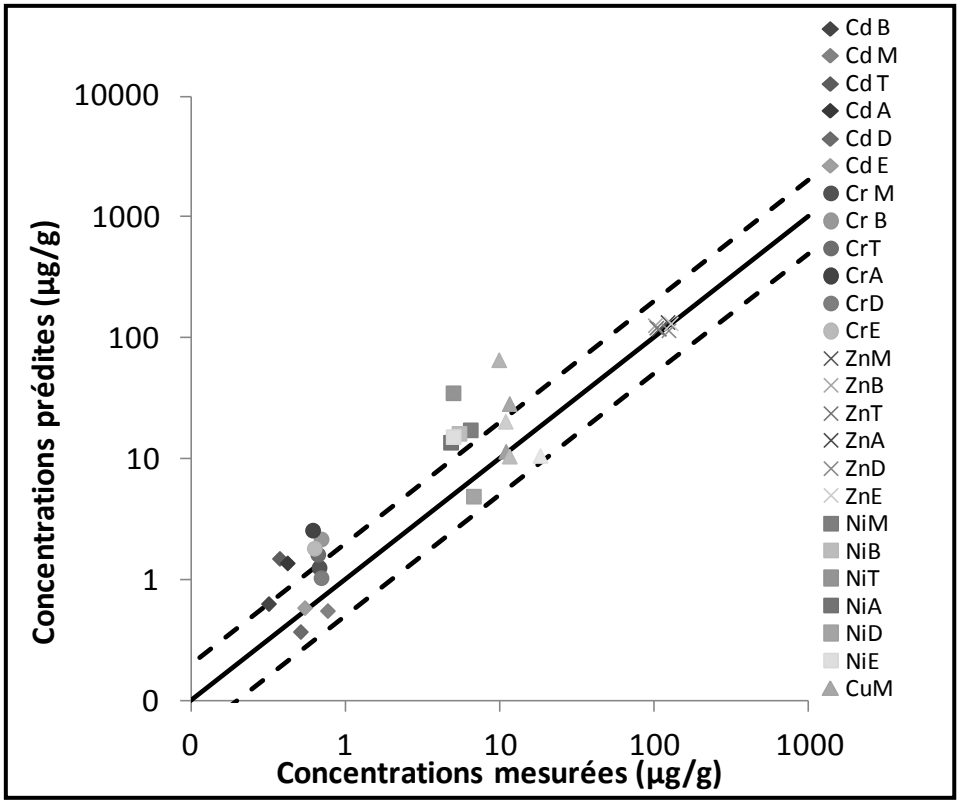


Figure 50 : Comparaison des concentrations prédites aux concentrations mesurées sur les 6 sites pour tous les métaux avec des AE terrain et des IR terrain, C_p extraits et C_d labiles et k_u et k_e de la littérature en faisant l'hypothèse que les moules ne sont pas à l'équilibre avec le milieu après 14 jours d'exposition. Les droites en pointillées représentent le facteur de déviation égal à 2 par rapport à la droite pleine 1 :1.

Ainsi, l'efficacité de prédiction du modèle est de 60 %. Elle est augmentée de presque 20 % par rapport au 47 % obtenue lorsque l'état d'équilibre est supposé (Figure 48).
Ce résultat semble montrer que les organismes n'ont pas atteint un état d'équilibre avec le milieu, en termes d'échanges métalliques.

Notre résultat semble en opposition avec une étude antérieure sur l'Orge (Bourgeault *et al.*, 2010b) qui a montré que la biaoccumulation des métaux par les moules n'était pas

significativement différente entre le jour 15 et les points suivants : 29, 42 et 58 jours. Ce résultat serait donc à confirmer.

Cependant le fait que l'équilibre n'est pas atteint n'est pas la seule hypothèse à remettre en question lors de l'utilisation du modèle biodynamique.

Nous avons constaté que lorsque les AE et IR étaient évalués sur le terrain plutôt qu'en laboratoire, l'efficacité de prédiction du modèle était améliorée, cela peut être également le cas pour les k_u et les k_e. Il est également possible de supposer que les k_u et k_e utilisées ne sont pas adaptées, car elles ont été déterminées en laboratoire.

En ce qui concerne les k_u, ils ont été déterminés, à notre connaissance, uniquement en laboratoire et en milieu inorganique et sans prendre en compte un impact éventuel de la phase particulaire. Cette voie est importante pour les bivalves et à l'heure actuelle aucune étude n'a étudié l'impact de la présence de particules sur la valeur de la k_u

Enfin, les k_e sont également déterminées en laboratoire et cela peut également biaiser leur estimation.

En effet, la détermination de la k_e en laboratoire peut entrainer, soit une sur évaluation de ce dernier, soit une sous-évaluation. En effet, les moules étant nourries *ad libidum* en laboratoire, la k_e est alors potentiellement surévaluée. A l'inverse, si les particules ne sont pas données en trop grosse quantité et si la qualité des particules est très bonne, la totalité des particules seront alors assimilées et elles seront peu excrétées (Widdows, 1978), ainsi la k_e peut être sous-évaluée.

La bioaccumulation des métaux par les moules, après 14 jours, n'est pas systématiquement reliée à la contamination croissante d'amont en aval des milieux le long des cours d'eau. Pour certains métaux, comme pour le cuivre, la corrélation entre la contamination du milieu et la bioaccumulation est même négative et peut s'expliquer par des phénomènes de régulation ou par une biodisponibilité différente des métaux selon les sites.

Le modèle de bioaccumulation permet une prédiction maximale des teneurs bioaccumulées lorsque les paramètres d'entrée sont déterminés *in situ* ou lorsque la biodisponibilité des métaux est prise en compte (ne pas travailler avec les teneurs totales en métaux dissous et particulaire). Cependant le modèle est encore perfectible. Il est important de considérer que l'équilibre des métaux entre les organismes et le milieu n'est pas systématiquement atteint et également que les k_u et k_e, uniquement évalués en laboratoire, sont sensiblement moins bien évalués que l'AE et l'IR qui sont potentiellement évalués en conditions moins contrôlées.

6. Limites de l'évaluation de l'AE *in situ*

En parallèle des tests réalisés sur le modèle de bioaccumulation, un AE *in situ* a été estimé afin de valider une méthode d'estimation de l'AE *in situ,* développée par Bourgeault (2011). L'AE a été calculé selon l'équation 21, en rappel :

$$AE_{calculé} = \frac{C_{org\ mesuré} \cdot k_e - C_d \cdot k_u}{IR.C_p}$$

Les valeurs obtenues, par métal et par site, sont données ci-dessous (Tableau 22).

Tableau 22 : Valeurs des AE estimés à l'équilibre par métal et par site en utilisant des C_d labiles et C_p extraits et des IR terrains et les k_e et k_u de la littérature.

AE (%)	Cr	Cd	Zn	Ni	Cu
Marnay	-2,3	**3,6**	**3,8**	-22,3	**4,1**
Bougival	-0,6	-0,9	**0,6**	-12,7	**0,5**
Triel	-0,4	-0,8	**0,4**	-6,7	**0,4**
Andrésy	-0,8	-2,6	**1**	-30	**0,7**
Dourdan	-13,3	**2,7**	**12,1**	-103	**10,1**
Egly	-2,1	-2,4	**1,3**	-25,6	**1,3**

Le formalisme du modèle ne fonctionne pas puisque la majorité des AEs estimées est négative.

Soit la valeur $C_{org\,mesuré} \cdot k_e$ est sous-estimée, soit la quantité bioaccumulée par voie dissoute Cd.k_u est surestimée, soit ce n'est pas la bonne équation qui est prise en compte. En effet, cette équation fait l'hypothèse que les moules sont à l'équilibre avec le milieu.

Si $C_{org\,mesuré} \cdot k_e$ est sous-estimé c'est parce que la k_e est sous-estimée (Cf section 5.3.) car il est evalué en laboratoire où la nourriture fournie est de trop bonne qualité, ainsi les organismes n'excrètent que très peu car tout est assimilé et donc la ke est sous-estimée.

Si la valeur Cd.k_u est sur estimé :

- soit la k_u utilisée n'est pas correcte et est trop élevée
- soit la totalité des métaux labiles, évalués par les DGTs, ne sont pas totalement biodisponibles pour les organismes.

Cela semble peu probable car de nombreuses études ont démontré la pertinence des DGTs en laboratoire (Tusseau-Vuillemin *et al.*, 2004; Pellet *et al.*, 2009) et en mésocosmes (Bourgeault *et al.*, 2013).

Peut-être aurait-il fallut calculer l'AE en prenant en compte l'équation qui part du principe que les organismes ne sont pas à l'équilibre avec le milieu.

Ainsi, nous avons calculé l'AE *in situ* selon l'équation suivante, extrapolée de l'équation n°19 :

$$AE = \left(\frac{\left(C_{org\,mesuré(t=14)} - C_{org\,mesuré(t=0)} . e^{-k_e.14}\right)}{1 - k_e e^{-k_e.14}} . k_e - k_u . C_d \right) . \frac{1}{IR . C_p} \qquad (22)$$

Tableau 23 : Valeurs des AE estimées hors équilibre par métal et par site en utilisant les C_d et C_p labiles les IR terrains et les k_e et k_u de la littérature.

AE (%)	Cr	Cd	Zn	Ni	Cu
Marnay	-3	**20,5**	**1,0**	-17,3	**3,0**
Bougival	-1,9	-1,5	-1,4	-11,1	**0,2**
Triel	-0,9	-0,7	-0,7	-6,5	**0,0**
Andrésy	-3,4	-0,7	-0,9	-16,6	**0,1**
Dourdan	-10,4	**29,6**	**9,0**	**18,8**	**7,2**
Egly	-5,6	-0,7	-0,4	-17,5	**3,3**

Malgré ce nouveau calcul, les valeurs d'AE ne sont toujours pas formalisables (Tableau 23), puisqu'on obtient des AEs négatifs. Ainsi la prise en compte de l'état d'équilibre des organismes avec le milieu influence peu l'évaluation de l'AE *in situ*.

L'AE n'a pas pu être évaluée *in situ* comparé à une étude (Bourgeault *et al.*, 2011) qui a travaillé, en partie, avec les mêmes sites et avec des teneurs en contaminant globalement identiques. L'élément critique qui diffère est que l'évaluation de l'AE dans l'étude de Bourgeault (2011) a été réalisée grâce à un jeu d'échantillons plus grand : 11 mesures étalées sur 11 mois. Ce jeu d'échantillon a permis l'évaluation de l'AE, hors conditions d'équilibre, en utilisant une procédure d'optimisation. Cette procédure d'optimisation repose sur la méthode des moindres carrés qui permet de comparer les mesures expérimentales au modèle mathématique, ainsi les incertitudes liées à la mesure sont corrigées. Cependant, cette approche ne peut pas être utilisée avec aussi peu de données.
Dans ce cas, le jeu de données du premier mois de l'étude de Bourgeault (2011) a été utilisé en suivant notre méthodologie d'estimation des AEs afin de vérifier si dans ces conditions les AEs obtenus ne sont pas formalisables, et il s'avère que c'est le cas (Tableau 24).

Tableau 24 : Valeurs des AE estimées hors équilibre par métal et par site en utilisant les C_d et C_p labiles les IR terrains et les k_e et k_u de la littérature et les valeurs bioaccumulées après 1 mois d'exposition.

AE (%)	Cr	Cd	Zn	Ni	Cu
Marnay	**64**	-134	**34**	-39	**91**
Bougival	-6	-157	-6	-72	104
Triel	**30**	-48	**2**	-35	202

Ce constat souligne l'importance de l'exposition sur une plus longue période afin d'obtenir un jeu de données plus conséquent.

Il semble donc que l'évaluation de la biodisponibilité *in situ* puisse se faire indépendamment de l'état d'équilibre des moules par rapport au milieu d'exposition. Par contre, il semble nécessaire d'avoir un jeu de données de taille conséquente afin de pouvoir gommer les incertitudes expérimentales inhérentes au fait que les paramètres du modèle sont évalués en laboratoire (k_e et k_u) et qu'ils sont très certainement fluctuants durant l'exposition.

7. Conclusions et perspectives

7.1. Conclusions générales

L'objectif de cette étude était d'évaluer la biodisponibilité particulaire *in situ,* en se basant sur la capacité du modèle biodynamique à rendre compte de la contamination métallique des organismes par rapport à celle du milieu, et en mesurant le taux de filtration *in situ*. La mesure *in situ* du taux de filtration visait à déterminer les paramètres (qualité des particules, quantité des particules ou caractéristiques chimiques, etc.) influençant ce dernier.

En ce qui concerne la mesure du taux de filtration, il a finalement été mesuré dans un système *ex situ*, clos et en mesurant la décroissance des particules, car nous avons montré que cette mesure est plus représentative du FR réel que la mesure basée sur la décroissance de la chlorophylle.

En conclusion, il s'avère que les taux de filtration ne sont pas significativement différents entre les sites. Ils sont compris entre 40 et 80 $mL.moule^{-1}.h^{-1}$, seul le taux de filtration à Dourdan est plus faible. Il est compris entre 6 et 28 $mL.moule^{-1}.h^{-1}$. Ce plus faible FR est associé à une forte teneur en carbone dissous et en fer et manganèse dissous et particulaire. Cependant aucune corrélation n'a été faite et il n'a pas été possible de relier le FR à un état physico-chimique particulier des sites, eau et particules prises en compte.

Le site d'Andrésy situé en aval des rejets de la station d'épuration Seine Aval, qui est la STEP qui traite les eaux usées de plus de 8 millions de franciliens, présente un constat intéressant. En effet une très faible variabilité des FRs est mesurée. La variabilité est inférieure à 10 % contre 40 % pour les autres sites. Il est possible de penser que l'impact des rejets domine les fluctuations naturelles de la qualité de l'eau et des particules, ce qui entraine une réponse homogène des organismes.

Les quantités de métaux bioaccumulées par les moules sont représentatives d'autres mesures sur l'Orge et sur la Seine. Cependant les quantités bioaccumulées ne sont pas systématiquement plus fortes en aval par rapport à l'amont alors que la contamination est généralement plus forte en aval. En calculant l'influx avec le modèle biodynamique le même constat a été fait. Ces résultats similaires entre bioaccumulation et influx permettent de

supposer que certains métaux sont régulés par les organismes ou alors que la biodisponibilité de certains métaux n'est pas toujours assez bien évaluée par le modèle.

Le modèle biodynamique semble donc avoir ses limites. Ces limites sont dues au fait que les paramètres primordiaux du modèle, comme l'AE, ne sont pas encore tous déterminés pour chaque métal pour la dreissène. Par ailleurs, d'autre paramètres, comme les k_u et les k_e, sont déterminées systématiquement en laboratoire, et pas *in situ* ce qui peut biaiser leur évaluation. De plus, lors de l'utilisation du modèle il a été supposé que les paramètres du modèle étaient constants, aucune étude n'a montré le contraire mais ce n'est certainement pas le cas surtout pour les concentrations en métaux dans le milieu et les constantes biologiques (k_u, k_e, IR et AE)

Enfin concernant l'estimation de la biodisponibilité *in situ,* il n'a pas été possible d'évaluer un AE fiable. Nous avons démontré que cette impossibilité reposait sur un jeu de données insuffisant. Par conséquent la durée d'exposition des organismes doit être supérieure à 14 jours. Dans l'idéal l'exposition doit être de 2-3 mois comme certaines études de biomonitoring (Bervoets, 2005) afin de pouvoir évaluer des AE *in situ* de façon fiable.

7.2. Perspectives

Actuellement afin, d'améliorer la prédiction du modèle biodynamique il serait judicieux d'évaluer les constantes d'assimilation (k_u) et les constantes d'excrétion (k_e) pour tous les métaux avec la dreissène. Car il existe encore des constantes qui n'ont été déterminées seulement avec d'autres bivalves marins, *M. edulis,* et qui sont utilisées dans le modèle dans le cas de la dreissène. C'est le cas des constantes d'excrétion et d'assimilation du zinc et de la constante d'excrétion du nickel. De plus, ces évaluations étant réalisées en laboratoire, il serait intéressant de compléter cette première approche par une étude en conditions réelles.

En effet, il semblerait que les k_e soit dépendantes de la nature des particules. Nous avons ainsi émis l'hypothèse que dans le cas des k_e, ces derniers sont fonctions de la nature et de la quantité des particules. En effet, il a été montré que la quantité de fèces et pseudo-fèces excrétées varie lorsque la qualité et la quantité des particules fluctuent (Reeders *et al.*, 1989; Madon *et al.*, 1998). Or comme le k_e est lié à la production de pseudo-fèces et fèces, il va

également varier en fonction des particules. Cette hypothèse serait à confirmer ou à infirmer.

Au final, il serait intéressant d'évaluer ces deux paramètres dans des conditions semi contrôlées, par exemple en mésocosmes, en travaillant avec différents types de particules naturelles, éventuellement recontaminées à des teneurs contrôles en métaux. Ceci permettrait d'évaluer l'impact de la qualité et de la quantité des particules sur les valeurs de k_u et de k_e.

Finalement, dans le but de pouvoir estimer à la fois (1) un AE *in situ,* (2) un FR de façon ponctuelle afin qu'il soit représentatif des variations naturelles et afin (3) d'utiliser la dreissène comme un biomoniteur efficace il serait important de :

- Travailler avec une durée d'exposition optimale. Cette durée d'exposition doit être égale au minimum à 6 à 8 semaines, afin d'optimiser le biomonitoring (Bervoets *et al.*, 2005a) et également suffisamment longue afin de pouvoir avoir un jeu de données conséquent afin d'évaluer l'AE *in situ* comme dans l'étude de Bourgeault (2011) qui a quand même travaillé sur 11 mois. L'idéal étant donc de travailler sur une période d'exposition qui ne s'étale pas sur plusieurs saisons afin de limiter les variations du FR liés aux conditions climatiques et aux fluctuations de la quantité et de la qualité des particules.

  Ainsi, il semble qu'une durée d'exposition de 4 mois, équivalente à une saison, satisfasse les différentes contraintes.

En conclusion, afin d'évaluer la biodisponibilité *in situ* et de mesurer le taux de filtration *ex situ*, il serait nécessaire de (1) finaliser l'estimation des paramètres du modèle biodynamique qui ne sont pas encore tous évalués pour l'organisme modèle la dreissène et (2) améliorer leur évaluation, car ces derniers sont trop souvent évalués uniquement en laboratoire et pas assez en conditions moins contrôlées (3) prolonger l'exposition des organismes afin d'augmenter le nombre de données récoltées.

Conclusions et perspectives

L'objectif de retour au bon état chimique et écologique des masses d'eau est attendu en 2015, suite à la loi européenne de 2000 : la Directive Cadre sur l'eau. Dans le contexte actuel, il semble nécessaire de développer des outils efficaces afin d'évaluer l'impact des contaminants métalliques sur les organismes aquatiques. En effet, en l'état, les analyses chimiques et les bioindicateurs mis en place ne permettent pas une évaluation optimale de cet impact. Les analyses chimiques sont ponctuelles et les bioindicateurs permettent uniquement de constater l'état sans en évaluer l'origine. Au final, ces mesures ne considèrent pas la contamination métallique fixée sur les particules dans le milieu. Et pourtant, les particules concentrent les métaux par adsorption. Ainsi, l'enrichissement métallique de particules contaminées peut, dans certains cas et suivant le métal, être dix fois supérieur aux teneurs naturelles en métal, dans les milieux non impactés. Pour certains métaux, la plus grande partie des métaux dans le milieu aquatique est associée aux particules.

Afin de mieux comprendre les interactions entre les contaminants et les organismes aquatiques, il est nécessaire de développer (1) la compréhension des différentes formes chimiques prises par les contaminants : la spéciation et (2) la mesure de la biodisponibilité. L'évaluation de cette dernière est délicate car elle dépend à la fois de la spéciation du métal et à la fois du comportement et de la physiologie des organismes.

Depuis plusieurs années, les études écotoxicologiques s'intéressent à l'utilisation d'organismes afin d'avoir une représentation optimale de l'effet des contaminants. L'utilisation d'un organisme est complémentaire des analyses chimiques ponctuelles, puisqu'elle donne une image intégrative de la pollution en prenant en compte les réponses biologiques de l'organisme face à une contamination du milieu. Le biomonitoring se développe dans ce sens car il permet de suivre la réponse d'organismes mis en contact avec le milieu naturel pollué. En particulier, une technique de biomonitoring repose sur l'étude de la bioaccumulation des métaux par un organisme aquatique. Le mécanisme d'accumulation est la première réponse d'un organisme à la contamination. Ainsi, l'évaluation de cette bioaccumulation permet d'avoir une estimation des contaminants biodisponibles dans le milieu. Cependant, le lien contamination biodisponible et bioaccumulation n'est pas direct. Il est dépendant du type de contamination : dissoute ou particulaire par exemple, des caractéristiques physico-chimiques du milieu, des traits de vie de l'organisme aquatique :

prédateur, détritivore, filtreur par exemple, et aussi de leurs activités biologiques : l'activité de filtration par exemple. En étudiant la biodisponibilité, il est possible d'améliorer la compréhension du lien existant entre contamination et bioaccumulation.

Dans le but d'améliorer la compréhension de la biodisponibilité des métaux particulaires, dans des systèmes aquatiques anthropisés et en majorité sous influence des activités urbaines un organisme modèle la dreissène a été choisi. La dreissène ou moule zébrée est un bivalve filtreur, en contact permanent avec les particules potentiellement contaminées et assez étudié en laboratoire. et sur le terrain, loin derrière les bivalves marins cependant. De plus, il est ubiquiste, résistant aux contaminants métalliques et bioaccumule les métaux dissous et particulaires. Ainsi, toutes ces caractéristiques en font un biomoniteur idéal afin d'étudier la biodisponibilité des métaux et *in fine* leur éventuelle bioaccumulation.

Dans ce contexte, ce travail a été mené selon deux approches :

- Une approche méthodologique, mise en œuvre en laboratoire, afin de déterminer la biodisponibilité particulaire, a été adaptée afin de mesurer l'efficacité d'assimilation (AE) et le taux d'ingestion (IR) des dreissènes
- Une approche terrain a permis de récupérer un jeu de données afin de tester une méthode d'évaluation de la biodisponibilité *in situ.*

L'approche de laboratoire reposait sur la technique du pulse-chase feeding couplée aux isotopes stables métalliques : ^{53}Cr, ^{62}Ni, ^{65}Cu, ^{67}Zn et ^{106}Cd. Au vu des difficultés analytiques (interférences) et méthodologiques (faible transfert des métaux des particules dopées vers les organismes), il apparait que la méthode du pulse-chase, développée avec succès pour d'autres organismes aquatiques détritivores (micro escargots aquatiques) n'est pas adaptée pour les organismes filtreurs lorsque les isotopes stables sont utilisés.
Ce qui est limitant, ce n'est pas la contamination multi métallique des algues qui a été un succès malgré les faibles teneurs initiales du milieu de dopage qui étaient faibles afin d'être représentatives de la réalité environnementale, mais plutôt l'absence de forte bioaccumulation des métaux par les moules en raison notamment d'une faible durée d'exposition.

Une autre approche qui tire les leçons des résultats mitigés de la précédente approche, a été proposée. Cette approche sera à tester car elle permet, dans un premier temps, d'allonger le temps d'exposition des organismes filtreurs qui est trop court, dans le cas du pulse-chase lorsque l'on travaille avec des teneurs en isotopes stables très basses.

Et permet dans un second temps de potentiellement limiter les interférences polyatomiques qui ont compliqué l'estimation des métaux présents, à de faibles niveaux, dans les échantillons. Les interférences ont un impact qui est d'autant plus fort que les concentrations dans les échantillons sont faibles. En effet, cette approche reposerait sur une technique de modification des rapports isotopiques naturels dans les matrices, proposée par Croteau (2013), cette modification des rapports isotopiques rendrait toute modification du rapport isotopique, même faible, plus facilement visible.

L'approche terrain repose sur l'utilisation du modèle biodynamique de Luoma et sur une mesure *ex situ* du taux de filtration. La mesure *ex situ* permet de réaliser une partie des analyses directement sur le terrain, ce qui permet de travailler avec des échantillons plus représentatifs de la réalité du milieu. Le jeu de données a également permis de tester l'efficacité de prédiction du modèle biodynamique afin de valider son utilisation pour évaluer l'efficacité d'assimilation in situ.

L'approche terrain, qui se résume à une approche de type biomonitoring, a été réalisée sur des sites sur la Seine et sur l'Orge et a permis de récolter des informations sur, l'état physico-chimique et la contamination métallique particulaire et dissoute : totale et supposée biodisponible (DGT et extraction sélective) des sites, et aussi sur la bioaccumulation métallique des moules après 14 jours d'exposition.

Cependant, le trop petit jeu de données (peu de données sur un même site, et une seule mesure de bioaccumulation par site) n'a pas permis d'estimer la biodisponibilité *in situ*.

Il a été montré le temps minimum d'exposition des organismes était de 4 mois minimum dans l'idéal, afin d'augmenter le nombre de mesures ponctuelles et intégratives, dans le but d'obtenir de valeurs moyennées et donc robustes.

Cependant, l'approche réalisée sur le terrain a permis d'identifier des pistes à suivre afin d'améliorer le biomonitoring à l'aide de la dreissène. En effet, la bioaccumulation des métaux par les organismes ne suit pas systématiquement la contamination des milieux. Ceci peut s'expliquer par des phénomènes de régulation des métaux par les organismes et

également par une mauvaise estimation de la biodisponibilité des métaux. Cette estimation ainsi que d'autres paramètres du modèle (IR, k_u et $k_{e)}$ sont systématiquement évalués en laboratoire ce qui peut entrainer des biais dans l'efficacité de prédiction du modèle.
Enfin, ce jeu de données, associé au modèle biodynamique, a permis de prédire la bioaccumulation des métaux de façon relativement fiable, comprise entre 45 et 60 % d'efficacité. Malgré tout, ce résultat est perfectible.

Si les résultats des deux approches mises en œuvre sont comparés, il s'avère que le taux d'ingestion (IR) moyen obtenu en laboratoire est de 0,05±0,003 $g.g^{-1}_{\text{poids sec tissus}}.j^{-1}$ alors que le taux d'ingestion des particules obtenu sur le terrain est en moyenne de 0,5±0,4 $g.g^{-1}_{\text{poids sec tissus}}.j^{-1}$ soit dix fois plus grand. Cette très grande différence peut s'expliquer par la différence de qualité nutritionnelle des particules fournies lors du pulse-chase feeding (Cain et *al.*, 2011). En effet, lors de l'expérimentation en laboratoire un unique type de particule, des algues âgées de 14 jours ont été fournies aux moules alors que sur le terrain le taux d'ingestion a été calculé en se basant sur un mélange de particules ou seston naturel.
De façon plus générale, l'approche en laboratoire permet d'évaluer des taux d'ingestion et des efficacités d'assimilation des métaux plus instantanée que l'approche sur le terrain. Car sur le terrain, les taux d'ingestion et les efficacités d'assimilation sont finalement moyennées puisque les particules sont diverses et les teneurs en métaux sont variables.

L'ensemble de ce travail a révélé les voies à suivre afin d'améliorer l'utilisation du modèle biodynamique de Luoma (2005) comme outil de prédiction de la bioaccumulation des métaux par les moules. Le modèle serait à priori perfectible, notamment en améliorant la détermination des paramètres utilisés. De plus, lors de l'utilisation du modèle, *in situ*, il s'est avéré que la bibliographie ne fournit pas, à l'heure actuelle, la totalité des paramètres relatifs à chaque métal pour la moule étudiée.
De plus, les paramètres sont déterminés en laboratoire. Il serait donc intéressant de concevoir des expériences afin de les déterminer en mésocosmes ou en conditions semi-contrôlées, c'est-à-dire dans un contexte plus représentatif de la réalité.

Perspectives :

Dans l'objectif final d'évaluer la biodisponibilité des métaux particulaires des masses d'eau, il est nécessaire d'approfondir les recherches menées lors de cette thèse et d'envisager d'autres perspectives de recherche :

- A court terme, afin d'approfondir les recherches menées en laboratoire, il serait nécessaire d'abandonner la technique du pulse-chase sur la dreissène avec des isotopes stables métalliques en innovant sur le design de l'expérience. En effet, il faudra tester la technique d'enrichissement inverse en isotopes non naturels des matrices étudiées (moules et nourriture) afin de modifier le rapport isotopique naturel. Et il faudra, en parallèle, utiliser un système en flux continu afin d'empêcher la contamination du milieu d'exposition ce qui permet d'augmenter la durée d'exposition des moules à la nourriture contaminée. Cette méthodologie devrait permettre d'évaluer la biodisponibilité particulaire de chaque métal avec différents types et quantités de particules.
- A moyen terme, il serait intéressant de développer un protocole normalisé afin d'évaluer en laboratoire les paramètres du modèle : k_u, k_e, AE et IR pour chaque métal et pour la dreissène. Cette normalisation permettrait de déterminer les paramètres de façon similaire. Elle permettrait également de s'assurer que ces évaluations sont reproductibles d'un laboratoire à un autre. Ceci passerait donc par la définition d'un milieu d'exposition de référence, d'organismes de taille standard, de particules de référence par exemple. Ensuite il faudrait comprendre comment moduler ces paramètres déterminés en laboratoire afin de les utiliser sur le terrain.

  Il serait également intéressant d'approfondir la notion d'effet cocktail, en estimant les valeurs k_u et k_e dans des conditions d'exposition multimétalliques et non systématiquement monométallique des organismes. En comparant l'exposition métal par métal à l'exposition multimétallique, des tendances de type effets protecteurs ou de type effets synergiques des polluants entre eux sur les organismes seront potentiellement observés.

- A long terme, il semblerait également intéressant d'évaluer la totalité des paramètres du modèle AE, IR et aussi k_u et k_e en conditions non contrôlées.

    - Nous avons tenté d'évaluer, lors de ce travail de thèse, un IR *in situ*. De plus, nous avons également voulu valider un protocole d'estimation d'AE *in situ*. Ce travail étant perfectible, il serait à réitérer en prenant en compte nos recommandations :
        - Concernant l'évaluation de l'IR, totalement *in situ*, il est nécessaire de travailler avec des prototypes si possible à petite échelle (quelques mètres de long maximum mais en y mettant plusieurs milliers d'individus afin que le dimensionnement soit réaliste y compris en rivière.
        - Concernant l'évaluation de l'AE *in situ*, il est nécessaire de récolter un nombre de données suffisant. Pour ce faire, la translocation des organismes doit se faire sur un minimum de 4 mois et les mesures doivent être réalisées une fois par mois. Les données récoltées sur les 2 premiers mois permettent alors d'estimer un AE, puis les données récoltées sur les deux derniers mois permettent de corriger l'estimation de l'AE.
    - Enfin, dans le cas de l'estimation des k_u et des k_e hors laboratoire, aucune approche n'a été testée lors de ce travail. Ainsi, le protocole entier serait à définir et à tester.

- De façon plus générale, il serait intéressant de tester l'outil dreissène comme bioindicateur de la biodisponibilité des métaux à plus grande échelle.

  Avant tout, il serait intéressant de valider ou d'invalider la possibilité d'évaluer la biodisponibilité *in situ*. Par exemple, il serait intéressant de récupérer le jeu de données conséquent obtenu suite à un projet qui s'est étalé sur deux ans et qui a permis de récolter des données relatives à la contamination métallique du milieu et à la bioaccumulation des métaux par la dreissène[2]. En effet, ce projet a étudié l'impact d'un curage de barrage sur la remise en suspension des métaux et des contaminants

[2] Projet Marco en collaboration avec EDF, Chatou.

organiques. L'étude d'impact a été rendue possible grâce à une comparaison de la bioaccumulation des contaminants par la dreissène avant, pendant et après le curage.

Une fois cette validation réalisée l'outil dreissène pourrait être utilisé comme biomoniteur à une échelle nationale. En effet, au sein de l'équipe dans laquelle j'ai réalisé ce travail, dans le cadre d'une étude nationale[3], un invertébré aquatique détritivore, *Gammarus pulex,* est utilisé pour évaluer la contamination métallique de 20 sites dans la moitié nord de la France. Il serait intéressant de proposer l'ajout de la dreissène comme bioindicateur dans cette campagne. Ainsi l'outil dreissène comme bioindicateur de la biodisponibilité des métaux particulaires pourrait être testé à plus grande échelle que celle d'un unique bassin versant.

[3] Projet BioMarqu'Indic en collaboration avec l'équipe écotoxicologie d'IRSTEA à Lyon.

Bibliographie

Ackerman, J.D., 1999. Effect of velocity on the filter feeding of dreissenid mussels (Dreissena polymorpha and Dreissena bugensis): Implications for trophic dynamics. Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences 56, 1551-1561.

Ahlf, W., Drost, W., Heise, S., 2009. Incorporation of metal bioavailability into regulatory frameworks-metal exposure in water and sediment. Journal of Soils and Sediments 9, 411-419.

Amiard, J.C., Geffard, A., Amiard-Triquet, C., Crouzet, C., 2007. Relationship between the lability of sediment-bound metals (Cd, Cu, Zn) and their bioaccumulation in benthic invertebrates. Estuarine, Coastal and Shelf Science 72, 511-521.

Andral, B., Galgani, F., Tomasino, C., Bouchoucha, M., Blottiere, C., Scarpato, A., Benedicto, J., Deudero, S., Calvo, M., Cento, A., Benbrahim, S., Boulahdid, M., Sammari, C., 2011. Chemical contamination baseline in the Western basin of the Mediterranean sea based on transplanted mussels. Archives of Environmental Contamination and Toxicology 61, 261-271.

Andral, B., Stanisiere, J.Y., Sauzade, D., Damier, E., Thebault, H., Galgani, F., Boissery, P., 2004. Monitoring chemical contamination levels in the Mediterranean based on the use of mussel caging. Marine Pollution Bulletin 49, 704-712.

Arifin, Z., Bendell-Young, L.I., 2000. Influence of a selective feeding behaviour by the blue mussel Mytilus trossulus on the assimilation of 109Cd from environmentally relevant seston matrices. Marine Ecology Progress Series 192, 181-193.

Baker, S.M., Levinton, J.S., 2003. Selective feeding by three native North American freshwater mussels implies food competition with zebra mussels. Hydrobiologia 505, 97-105.

Baker, S.M., Levinton, J.S., Kurdziel, J.P., Shumway, S.E., 1998. Selective feeding and biodeposition by zebra mussels and their relation to changes in phytoplankton composition and seston load. Journal of Shellfish Research 17, 1207-1213.

Baker, S.M., Levinton, J.S., Ward, J.E., 2000. Particle transport in the zebra mussel, Dreissena polymorpha (Pallas). Biological Bulletin 199, 116-125.

Ball, A.L., Borgmann, U., Dixon, D.G., 2006. Toxicity of a cadmium-contaminated diet to Hyalella azteca. Environmental Toxicology and Chemistry 25, 2526-2532.

Baral, A., Engelken, R., Stephens, W., Farris, J., Hannigan, R., 2006. Evaluation of aquatic toxicities of chromium and chromium-containing effluents in reference to chromium electroplating industries. Archives of Environmental Contamination and Toxicology 50, 496-502.

Batley, G.E., Apte, S.C., Stauber, J.L., 2004. Speciation and bioavailability of trace metals in water: Progress since 1982. Australian Journal of Chemistry 57, 903-919.

Bayne, B.L., Hawkins, A.J.S., Navarro, E., Iglesias, J.I.P., 1989. Effects of seston concentration on feeding, digestion and growth in the mussel *Mytilus edulis*. Marine Ecology Progress Series 55, 47-54.

Bayne, B.L., Iglesias, J.I.P., Hawkins, A.J.S., Navarro, E., Heral, M., Deslous-Paoli, J.-M., 1993. Feeding behaviour of the mussels, Mytilus edulis: responses to variations in quantity and organic content of the seston. Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom 73, 813-829.

Bervoets, L., Voets, J., Covaci, A., Chu, S., Qadah, D., Smolders, R., Schepens, P., Blust, R., 2005a. Use of transplanted zebra mussels (Dreissena polymorpha) to assess the bioavailability of microcontaminants in flemish surface waters. Environmental Science and Technology 39, 1492-1505.

Bervoets, L., Voets, J., Smolders, R., Blust, R., 2005b. Metal accumulation and condition of transplanted zebra mussel (Dreissena polymorpha) in metal polluted rivers. Aquatic Ecosystem Health and Management 8, 451-460.

Bibby, R.L., Webster-Brown, J.G., 2005. Characterisation of urban catchment suspended particulate matter (Auckland region, New Zealand); a comparison with non-urban SPM. Science of the Total Environment 343, 177-197.

Bibby, R.L., Webster-Brown, J.G., 2006. Trace metal adsorption onto urban stream suspended particulate matter (Auckland region, New Zealand). Applied Geochemistry 21, 1135-1151.

Bodiguel, X., Maury, O., Mellon-Duval, C., Roupsard, F., Le Guellec, A.M., Loizeau, V., 2009. A dynamic and mechanistic model of PCB bioaccumulation in the European hake (Merluccius merluccius). Journal of Sea Research 62, 124-134.

Borcherding, J., Wolf, J., 2001. The influence of suspended particles on the acute toxicity of 2-chloro-4-nitro-aniline, cadmium, and pentachlorophenol on the valve movement response of the zebra mussel (Dreissena polymorpha). Archives of Environmental Contamination and Toxicology 40, 497-504.

Bourgeault, A., 2010. Bioaccumulation par *Dreissena polymorpha* : quel reflet de la contamination chimique du milieu ? Expérimentation-Observation-Modélisation. Ecotoxicology. UPMC, Paris.

Bourgeault, A., Ciffroy, P., Garnier, C., Cossu-Leguille, C., Masfaraud, J.F., Charlatchka, R., Garnier, J.M., 2013. Speciation and bioavailability of dissolved copper in different freshwaters: Comparison of modelling, biological and chemical responses in aquatic mosses and gammarids. Science of the Total Environment 452-453, 68-77.

Bourgeault, A., Gourlay-Francé, C., Ayrault, S., Tusseau-Vuillemin, M.H., 2012. Bioaccumulation of waterborne Ni in Dreissena polymorpha: A stable isotope experiment to assess the effect of zinc, calcium, and dissolved organic matter. Environmental Toxicology and Chemistry 31, 819-827.

Bourgeault, A., Gourlay-Francé, C., Priadi, C., Ayrault, S., Tusseau-Vuillemin, M.H., 2011. Bioavailability of particulate metal to zebra mussels: Biodynamic modelling shows that assimilation efficiencies are site-specific. Environmental Pollution 159, 3381-3389.

Bourgeault, A., Gourlay-Francé, C., Tusseau-Vuillemin, M., 2010a. Modeling the effect of water chemistry on the bioaccumulation of waterborne cadmium in zebra mussels. Environmental Toxicology and Chemistry 29, 2182-2189.

Bourgeault, A., Gourlay-Francé, C., Vincent-Hubert, F., Palais, F., Geffard, A., Biagianti-Risbourg, S., Pain-Devin, S., Tusseau-Vuillemin, M.H., 2010b. Lessons from a transplantation of zebra mussels into a small urban river: An integrated ecotoxicological assessment. Environmental Toxicology 25, 468-478.

Buzier, R., Tusseau-Vuillemin, M.H., Mouchel, J.M., 2006. Evaluation of DGT as a metal speciation tool in wastewater. Science of the Total Environment 358, 277-285.

Cain, D., Croteau, M.N., Luoma, S., 2011. Bioaccumulation dynamics and exposure routes of Cd and Cu among species of aquatic mayflies. Environmental Toxicology and Chemistry 30, 2532-2541.

Calow, P., Fletcher, C.R., 1972. A new radiotracer technique involving 14C and 51Cr, for estimating the assimilation efficiencies of aquatic, primary consumers. Oecologia 9, 155-170.

Campbell, P.G.C., Chapman, P.M., Hale, B.A., 2006. Risk assessment of metal in the environment Chemicals in the environment: Assessing and managing risk, pp. 102-131.

Campbell, P.G.C., Errécalde, O., Fortin, C., Hiriart-Baer, V.P., Vigneault, B., 2002. Metal bioavailability to phytoplankton - Applicability of the biotic ligand model. Comparative Biochemistry and Physiology - C Toxicology and Pharmacology 133, 189-206.

Cánovas, C.R., Olias, M., Vazquez-Suñé, E., Ayora, C., Nieto, J.M., 2012. Influence of releases from a fresh water reservoir on the hydrochemistry of the Tinto River (SW Spain). Science of the Total Environment 416, 418-428.

Chabukdhara, M., Nema, A.K., 2012. Heavy metals in water, sediments and aquatic macrophytes: River Hindon, India. Journal of Hazardous, toxic and radioactive waste, 273-281.

Chon, H.S., Ohandja, D.G., Voulvoulis, N., 2012. The role of sediments as a source of metals in river catchments. Chemosphere 88, 1250-1256.

Chong, K., Wang, W.X., 2001. Comparative studies on the biokinetics of Cd, Cr, and Zn in the green mussel Perna viridis and the Manila clam Ruditapes philippinarum. Environmental Pollution 115, 107-121.

Clearwater, S.J., Farag, A.M., Meyer, J.S., 2002. Bioavailability and toxicity of dietborne copper and

zinc to fish. Comparative Biochemistry and Physiology - C Toxicology and Pharmacology 132, 269-313.

CommissionDirective, 1993. Technical Guidance Document in support of the Commisssion Directive 93/67/EEC on Risk.

Cornu, S., Clozel, B., 2000. Extractions séquentielles et spéciation des éléments trace métalliques dans les sols naturels. Analyse critique. Etude et gestion des sols 7, 179-189.

Coughlan, J., 1969. The estimation of filtering rate from the clearance of suspensions. Marine Biology 2, 356-358.

Croteau, M.N., Cain, D.J., Fuller, C.C., 2013. Novel and nontraditional use of stable isotope tracers to study metal bioavailability from natural particles. Environmental Science and Technology 47, 3424-3431.

Croteau, M.N., Dybowska, A.D., Luoma, S.N., Valsami-Jones, E., 2011. A novel approach reveals that zinc oxide nanoparticles are bioavailable and toxic after dietary exposures. Nanotoxicology 5, 79-90.

Croteau, M.N., Luoma, S.N., 2008. A biodynamic understanding of dietborne metal uptake by a freshwater invertebrate. Environmental Science and Technology 42, 1801-1806.

Croteau, M.N., Luoma, S.N., 2009. Predicting dietborne metal toxicity from metal influxes. Environmental Science and Technology 43, 4915-4921.

Croteau, M.N., Luoma, S.N., Pellet, B., 2007. Determining metal assimilation efficiency in aquatic invertebrates using enriched stable metal isotope tracers. Aquatic Toxicology 83, 116-125.

Croteau, M.N., Luoma, S.N., Topping, B.R., Lopez, C.B., 2004. Stable metal isotopes reveal copper accumulation and loss dynamics in the freshwater bivalve Corbucula. Environmental Science and Technology 38, 5002-5009.

Davison, W., Zhang, H., 1994. In situ speciation measurements of trace components in natural waters using thin-film gels. Nature 367, 546-548.

De Schamphelaere, K.A.C., Janssen, C.R., 2002. A biotic ligand model predicting acute copper toxicity for Daphnia magna: The effects of calcium, magnesium, sodium, potassium, and pH. Environmental Science and Technology 36, 48-54.

Deschamps, T., Beanzaazoua, M., Bussière , B., Delem, T., Mbonimpa, M., 2006. Mécanismes de rétention des métaux lourds en phase solide : cas de la stabilisation des sols contaminés et des déchets industriels. Vertigo 7.

Dupont, J.-P., Guézennec, L., Lafite, R., Le Hirre, P., Lesueur, P., 2001. Matériaux fins : le cheminement des particules en suspension. Ifremer, Seine-Aval, p. 39.

Duval, J.F.L., Pinheiro, J.P., Van Leeuwen, H.P., 2008. Metal speciation dynamics in monodisperse soft colloidal ligand suspensions. Journal of Physical Chemistry A 112, 7137-7151.

Elbaz-Poulichet, F., Seidel, J.L., Casiot, C., Tusseau-Vuillemin, M.H., 2006. Short-term variability of dissolved trace element concentrations in the Marne and Seine Rivers near Paris. Science of the Total Environment 367, 278-287.

Elder, J.F., 1988. Metal biogeochemistry in surface-water systems: a review of principles and concepts. US Geological Survey Circular.

Elliott, P., Aldridge, D.C., Moggridge, G.D., 2008. Zebra mussel filtration and its potential uses in industrial water treatment. Water Research 42, 1664-1674.

Fan, W., Wang, W.X., 2003. Extraction of spiked metals from contaminated coastal sediments: A comparison of different methods. Environmental Toxicology and Chemistry 22, 2659-2666.

Ferreira, D., Ciffroy, P., Tusseau-Vuillemin, M.H., Bourgeault, A., Garnier, J.M., 2013. DGT as surrogate of biomonitors for predicting the bioavailability of copper in freshwaters: An ex situ validation study. Chemosphere 91, 241-247.

Filgueira, R., Labarta, U., Fernandez-Reiriz, M.J., 2006. Flow-through chamber method for clearance rate measurements in bivalves: Design and validation of individual chambers and mesocosm. Limnology and Oceanography: Methods 4, 284-292.

Fisher, N.S., Hook, S.E., 2002. Toxicology tests with aquatic animals need to consider the trophic transfer of metals. Toxicology 181-182, 531-536.

Gagnon, C., Turcotte, P., Vigneault, B., 2009. Comparative study of the fate and mobility of metals discharged in mining and urban effluents using sequential extractions on suspended solids. Environmental Geochemistry and Health 31, 657-671.

Galimany, E., Ramón, M., Ibarrola, I., 2011. Feeding behavior of the mussel Mytilus galloprovincialis (L.) in a Mediterranean estuary: A field study. Aquaculture 314, 236-243.

Geffard, O., Geffard, A., Chaumot, A., Vollat, B., Alvarez, C., Tusseau-Vuillemin, M.H., Garric, J., 2008. Effects of chronic dietary and waterborne cadmium exposures on the contamination level and reproduction of Daphnia magna. Environmental Toxicology and Chemistry 27, 1128-1134.

Gitan, R.S., Eide, D.J., 2000. Zinc-regulated ubiquitin conjugation signals endocytosis of the yeast ZRT1 zinc transporter. Biochemical Journal 346, 329-336.

Gobas, F.A.P.C., Morrison, H.A., 2000. Bioconcentration and biomagnification in the aquatic Environment. Handbool of property Estimation Methods for Chemicals. Boetling R.S. mackay (Eds), CRC press, Boca Raton, FL, pp. 189-281.

Gossiaux, D.C., Landrum, P.F., Fisher, S.W., 1998. The assimilation of contaminants from suspended sediment and algae by the zebra mussel, Dreissena polymorpha. Chemosphere 36, 3181-3197.

Gourlay, C., Miège, C., Noir, A., Ravelet, C., Garric, J., Mouchel, J.M., 2005. How accurately do semi-permeable membrane devices measure the bioavailability of polycyclic aromatic hydrocarbons to Daphnia magna? Chemosphere 61, 1734-1739.

Griscom, S.B., Fisher, N.S., Luoma, S.N., 2000. Geochemical influences on assimilation of sediment-bound metals in clams and mussels. Environmental Science and Technology 34, 91-99.

Grizzle, R.E., Greene, J.K., Luckenbach, M.W., Coen, L.D., 2006. A new in situ method for measuring seston uptake by suspension-feeding bivalve molluscs. Journal of Shellfish Research 25, 643-649.

Grosbois, C., Courtin-Nomade, A., Martin, F., Bril, H., 2007. Transportation and evolution of trace element bearing phases in stream sediments in a mining - Influenced basin (Upper Isle River, France). Applied Geochemistry 22, 2362-2374.

Guan, R., Wang, W.X., 2006. Multiphase biokinetic modeling of cadmium accumulation in Daphnia magna from dietary and aqueous sources. Environmental Toxicology and Chemistry 25, 2840-2846.

Gutierrez, M.F., Gagneten, A.M., Paggi, J.C., 2011. Acute and chronic effects of copper, chromium and insecticide-endosulfan on littoral cladocera, Pseudosida variabilis. Fresenius Environmental Bulletin 20, 3286-3294.

Hansen, B.W., Dolmer, P., Vismann, B., 2011. In situ method for measurements of community clearance rate on shallow water bivalve populations. Limnology and Oceanography: Methods 9, 454-459.

Hart, B.T., Day, G., Sharp-Paul, A., Beer, T., 1988. Water quality variations during a flood event in the Annan River, North Queensland. Australian Journal of Marine & Freshwater Research 39, 225-243.

Hassler, C.S., Slaveykova, V.I., Wilkinson, K.J., 2004. Discriminating between intra- And extracellular metals using chemical extractions. Limnology and Oceanography: Methods 2, 237-247.

Hassler, C.S., Wilkinson, K.J., 2003. Failure of the biotic ligand and free-ion activity models to explain zinc bioaccumulation by Chlorella kesslerii. Environmental Toxicology and Chemistry 22, 620-626.

Hédouin, L., Metian, M., Lacoue-Labarthe, T., Fichez, R., TeyssiÃ©, J.L., Bustamante, P., Warnau, M., 2010. Influence of food on the assimilation of selected metals in tropical bivalves from the New Caledonia lagoon: Qualitative and quantitative aspects. Marine Pollution Bulletin 61, 568-575.

Hoffman, D.J., Rattner, B.A., Burton, G.A., Cairns, J., 2003. Hanbook of Ecotoxicology. Lewis Publishers, CRC Press LLC.

Horgan, M.J., Mills, E.L., 1997. Clearance rates and filtering activity of zebra mussel (Dreissena

polymorpha): Implications for freshwater lakes. Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences 54, 249-255.

Irving, E.C., Baird, D.J., Culp, J.M., 2003. Ecotoxicological responses of the mayfly Baetis tricaudatus to dietary and waterborne cadmium: Implications for toxicity testing. Environmental Toxicology and Chemistry 22, 1058-1064.

Kamunde, C., Grosell, M., Higgs, D., Wood, C.M., 2002. Copper metabolism in actively growing rainbow trout (Oncorhynchus mykiss): Interactions between dietary and waterborne copper uptake. Journal of Experimental Biology 205, 279-290.

Kevin, G.T., Philip, N.O., Ramon, J.B., Celso, G., 2008. pp. 83-135.

Komjarova, I., Blust, R., 2008. Multi-metal interactions between Cd, Cu, Ni, Pb and Zn in water flea Daphnia magna, a stable isotope experiment. Aquatic Toxicology 90, 138-144.

Komjarova, I., Blust, R., 2009a. Application of a stable isotope technique to determine the simultaneous uptake of cadmium, copper, nickel, lead, and zinc by the water flea Daphnia magna from water and the green algae Pseudokirchneriella subcapitata. Environmental Toxicology and Chemistry 28, 1739-1748.

Komjarova, I., Blust, R., 2009b. Effect of Na, Ca and pH on simultaneous uptake of Cd, Cu, Ni, Pb, and Zn in the water flea Daphnia magna measured using stable isotopes. Aquatic Toxicology 94, 81-86.

Larner, B.L., Palmer, A.S., Seen, A.J., Townsendd, A.T., 2008. A comparison of an optimised sequential extraction procedure and dilute acid leaching of elements in anoxic sediments, including the effects of oxidation on sediment metal partitioning. Analytica Chimica Acta 608, 147-157.

Le Pape, P., 2012 Etude de la dynamique, des sources et de la spéciation des éléments traces dans le bassin versant de l'Orge (Essone, France). .

Le Pape, P., Ayrault, S., Michelot, J.L., Monvoisin, G., Noret, A., Quantin, C., 2013. Building an isotopic hydrogeochemical indicator of anthropogenic pressure on urban rivers. Chemical Geology 344, 63-72.

Le Pape, P., Ayrault, S., Quantin, C., 2012. Trace element behavior and partition versus urbanization gradient in an urban river (Orge River, France). Journal of Hydrology 472-473, 99-110.

Le, T.T.Y., Leuven, R.S.E.W., Hendriks, A.J., 2011. Modeling metal bioaccumulation in the invasive mussels Dreissena polymorpha and Dreissena rostriformis bugensis in the rivers Rhine and Meuse. Environmental Toxicology and Chemistry 30, 2825-2830.

Lebrun, J.D., Demont-Caulet, N., Cheviron, N., Laval, K., Trinsoutrot-Gattin, I., Mougin, C., 2011. Secretion profiles of fungi as potential tools for metal ecotoxicity assessment: A study of enzymatic system in Trametes versicolor. Chemosphere 82, 340-345.

Lee, B.G., Griscom, S.B., Lee, J.S., Choi, H.J., Koh, C.-H., Luoma, S.N., Fisher, N.S., 2000. Influences of dietary uptake and reactive sulfides on metal bioavailability from aquatic sediments. Science 287, 282-284.

Lei, J., Payne, B.S., Wang, S.Y., 1996. Filtration dynamics of the zebra mussel, Dreissena polymorpha. Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences 53, 29-37.

Leivuori, M., 1998. Heavy metal contamination in surface sediments in the Gulf of Finland and comparison with the Gulf of Bothnia. Chemosphere 36, 43-59.

Leivuori, M., Vallius, H., 1998. A case study of seasonal variation in the chemical composition of accumulating suspended sediments in the central Gulf of Finland. Chemosphere 36, 2417-2435.

Li, L., Xu, Z., Wu, J., Tian, G., 2010. Bioaccumulation of heavy metals in the earthworm Eisenia fetida in relation to bioavailable metal concentrations in pig manure. Bioresource Technology 101, 3430-3436.

Li, L.Y., Hall, K., Yuan, Y., Mattu, G., McCallum, D., Chen, M., 2009. Mobility and bioavailability of trace metals in the water-sediment system of the highly urbanized brunette watershed. Water, Air, and Soil Pollution 197, 249-266.

Lottin, D., 2009. Bioaccumulation des métaux par voie trophique chez une moule d'eau douce (*Dreissena polymorpa*). Université Paris Diderot Paris 7.

Lu, Y., Allen, H.E., 2001. Partitioning of copper onto suspended particulate matter in river waters. Science of the Total Environment 277, 119-132.

Luoma, S., Rainbow, P.S., 2008. Metal contamination in aquatic environments. Science and lateral management. Cambridge University Press.

Luoma, S.N., 1989. Can we determine the biological availability of sediment-bound trace elements? Sediment/water interactions. Proc 4th symposium, Melbourne, 1987, 379-396.

Luoma, S.N., Johns, C., Fisher, N.S., Steinberg, N.A., Oremland, R.S., Reinfelder, J.R., 1992. Determination of selenium bioavailability to a benthic bivalve from particulate and solute pathways. Environmental Science and Technology 26, 485-491.

Luoma, S.N., Rainbow, P.S., 2005. Why is metal bioaccumulation so variable? Biodynamics as a unifying concept. Environmental Science and Technology 39, 1921-1931.

Madon, S.P., Schneider, D.W., Stoeckel, J.A., Sparks, R.E., 1998. Effects of inorganic sediment and food concentrations on energetic processes of the zebra mussel, Dreissena polymorpha: Implications for growth in turbid rivers. Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences 55, 401-413.

Manceau, A., Lanson, B., Drits, V.A., 2002. Structure of heavy metal sorbed birnessite. Part III: Results from powder and polarized extended X-ray absorption fine structure spectroscopy. Geochimica et Cosmochimica Acta 66, 2639-2663.

Markert, 2008. From biomonitoring to integrated observation of the environment-The multi-markered bioindication concept ECOLOGICAL CHEMISTRY AND ENGINEERING S 15, 316-333.

Markert, B.A., Breure, A.M., Zechmeister, H.G., 2003. Chapter 1 Definitions, strategies and principles for bioindication/biomonitoring of the environment. In: B.A. Markert, A.M.B., Zechmeister, H.G. (Eds.), Trace Metals and other Contaminants in the Environment. Elsevier, pp. 3-39.

Marttila, H., Saarinen, T., Celebi, A., Kløve, B., 2013. Transport of particle-associated elements in two agriculture-dominated boreal river systems. Science of the Total Environment 461–462, 693-705.

Mc Geer, J., Henningsen, G., Lanno, R., Fisher, N., Sappington, K., Drexler, J., 2004. Issue paper on the bioavailability and bioaccumulation of metals. Eastern Research Group, Inc., Lexington, USA.

Mendonça, V.M., Sprung, M., Castro, M., Canário, A., 2011. Particle retention efficiency of a coastal ecosystem in the Northeastern Atlantic Ocean. Wetlands 31, 1175-1185.

Meybeck, M., Horowitz, A.J., Grosbois, C., 2004. The geochemistry of Seine River Basin particulate matter: Distribution of an integrated metal pollution index. Science of the Total Environment 328, 219-236.

Meybeck, M., Lestel, L., Bonté, P., Moilleron, R., Colin, J.L., Rousselot, O., Hervé, D., de Pontevés, C., Grosbois, C., Thévenot, D.R., 2007. Historical perspective of heavy metals contamination (Cd, Cr, Cu, Hg, Pb, Zn) in the Seine River basin (France) following a DPSIR approach (1950-2005). Science of the Total Environment 375, 204-231.

Meyer, J.S., Adams, W.J., Brix, K.V., Luoma, S.N., Mount, D.R., Stubblefield, W.A., Christopher, M.W. (Eds.), 2005. Toxicity of dietborne metals to aquatic organisms. Society of Evironmental Toxicology and Chemistry (SETAC), Pensacola.

Morel, F.M.M., 1983. Principles of aquatic chemistry. New York.

Nalepa, T.F., Schloesser, D.W. (Eds.), 1993. Zebra Mussels Biologiy, impacts, and controls. Lewis Publishers.

Neng, Y., Culver, D.A., 1999. Estimating the effective clearance rate and refiltration by zebra mussels, Dreissena polymorpha, in a stratified reservoir. Freshwater Biology 41, 481-492.

Ollivier, P., Radakovitch, O., Hamelin, B., 2011. Major and trace element partition and fluxes in the Rhône River. Chemical Geology 285, 15-31.

Pellet, B., 2009. Facteurs de contrôle de la contamination d'organismes modèles en milieu aquatique multicontaminé.

Pellet, B., Geffard, O., Lacour, C., Kermoal, T., Gourlay-FrancÃ‰, C., Tusseau-Vuillemin, M.H., 2009. A

model predicting waterborne cadmium bioaccumulation in gammarus pulex: the effects of dissolved organic ligands, calcium, and temperature. Environmental Toxicology and Chemistry 28, 2434-2442.

Pelletier, E., Campbell, P.G.C., 2008. L'écotoxicologie aquatique- comparaison entre les micropolluants organiques et les métaux-constats actuels et défis pour l'avenir. Journal of Water Science 21, 173-197.

Pernet-coudrier, B., Clouzot, L., Varrault, G., Tusseau-vuillemin, M.H., Verger, A., Mouchel, J.M., 2008. Dissolved organic matter from treated effluent of a major wastewater treatment plant: Characterization and influence on copper toxicity. Chemosphere 73, 593-599.

Pinheiro, J.P., Minor, M., Van Leeuwen, H.P., 2005. Metal speciation dynamics in colloidal ligand dispersions. Langmuir 21, 8635-8642.

Poikane, R., Carstensen, J., DahllÃ¶f, I., Aigars, J., 2005. Distribution patterns of particulate trace metals in the water column and nepheloid layer of the Gulf of Riga. Chemosphere 60, 216-225.

Pradit, S., Gao, Y., Faiboon, A., De Galan, S., Baeyens, W., Leermakers, M., 2013. Application of DET (diffusive equilibrium in thin films) and DGT (diffusive gradients in thin films) techniques in the study of the mobility of sediment-bound metals in the outer section of Songkhla Lake, Southern Thailand. Environmental Monitoring and Assessment 185, 4207-4220.

Priadi, C., Ayrault, S., Pacini, S., Bonte, P., 2011a. Urbanization impact on metals mobility in riverine suspended sediment: Role of metal oxides. International Journal of Environmental Science and Technology 8, 1-18.

Priadi, C., Bourgeault, A., Ayrault, S., Gourlay-Francé, C., Tusseau-Vuillemin, M.H., Bonté, P., Mouchel, J.M., 2011b. Spatio-temporal variability of solid, total dissolved and labile metal: Passive vs. discrete sampling evaluation in river metal monitoring. Journal of Environmental Monitoring 13, 1470-1479.

Priadi, C.R., 2010 Decembre. Caractérisation des phases porteuses : métaux particulaires en Seine. University Paris Sud 11.

Prins, T.C., Dankers, N., Smaal, A.C., 1994. Seasonal variation in the filtration rates of a semi-natural mussel bed in relation to seston composition 1. Journal of Experimental Marine Biology and Ecology 176, 69-86.

Prins, T.C., Smaal, A.C., Pouwer, A.J., Dankers, N., 1996. Filtration and resuspension of particulate matter and phytoplankton onan intertidal mussel bed in the Oosterschelde estuary (SW Netherlands). Marine Ecology Progress Series 142, 121-134.

Pueyo, M., Rauret, G., Lück, D., Yli-Halla, M., Muntau, H., Quevauviller, P., López-Sánchez, J.F., 2001. Certification of the extractable contents of Cd, Cr, Cu, Ni, Pb and Zn in a freshwater sediment following a collaboratively tested and optimised three-step sequential extraction procedure. Journal of Environmental Monitoring 3, 243-250.

Québec, C.d.e.e.a.e.d., 2012. Terminologie recommandée pour l'analyse des métaux Ministère du Développement durable, de l'Environnement et des Parcs du Québec, Québec, p. 15p.

Rainbow, P.S., Luoma, S.N., Wang, W.X., 2011. Trophically available metal - A variable feast. Environmental Pollution 159, 2347-2349.

Ramade, F. (Ed), 2007. Introduction à l'écotoxicologie : fondements et applications.

Reeders, H.H., Bij de Vaate, A., 1990. Zebra mussels (Dreissena polymorpha): a new perspective for water quality management. Hydrobiologia 200-201, 437-450.

Reeders, H.H., Bij De Vaate, A., Slim, F.J., 1989. The filtration rate of Dreissena polymorpha (Bivalvia) in three Dutch lakes with reference to biological water quality management. Freshwater Biology 22, 133-141.

Reinfelder, J.R., Fisher, N.S., 1991. The assimilation of elements ingested by marine copepods. Science 251, 794-796.

Reinfelder, J.R., Wang, W.X., Luoma, S.N., Fisher, N.S., 1997. Assimilation efficiencies and turnover rates of trace elements in marine bivalves: A comparison of oysters, clams and mussels. Marine Biology 129, 443-452.

Riisgård, H.U., 2001. On measurement of filtration rates in bivalves - The stony road to reliable data: Review and interpretation. Marine Ecology Progress Series 211, 275-291.

Rodgher, S., Espíndola, E.L.G., 2008. The influence of algal densities on the toxicity of chromium for Ceriodaphnia dubia Richard (Cladocera, Crustacea). Brazilian Journal of Biology 68, 341-348.

Rodgher, S., Espíndola, E.L.G., Simões, F.C.F., Tonietto, A.E., 2012. Cadmium and chromium toxicity to pseudokirchneriella subcapitata and microcystis aeruginosa. Brazilian Archives of Biology and Technology 55, 161-169.

Roditi, H.A., Fisher, N.S., 1999. Rates and routes of trace element uptake in zebra mussels. Limnology and Oceanography 44, 1730-1749.

Roditi, H.A., Fisher, N.S., SaÃ±udo-Wilhelmy, S.A., 2000. Field testing a metal bioaccumulation model for zebra mussels. Environmental Science and Technology 34, 2817-2825.

Roy, S., Gaillardet, J., Allègre, C.J., 1999. Geochemistry of dissolved and suspended loads of the Seine river, France: Anthropogenic impact, carbonate and silicate weathering. Geochimica et Cosmochimica Acta 63, 1277-1292.

Sakellari, A., Karavoltsos, S., Theodorou, D., Dassenakis, M., Scoullos, M., 2012. Bioaccumulation of metals (Cd, Cu, Zn) by the marine bivalves M. galloprovincialis, P. radiata, V. verrucosa and C. chione in Mediterranean coastal microenvironments: association with metal bioavailability. Environmental Monitoring and Assessment, 1-13.

Sakellari, A., Karavoltsos, S., Theodorou, D., Dassenakis, M., Scoullos, M., 2013. Bioaccumulation of metals (Cd, Cu, Zn) by the marine bivalves M. galloprovincialis, P. radiata, V. verrucosa and C. chione in Mediterranean coastal microenvironments: Association with metal bioavailability. Environmental Monitoring and Assessment 185, 3383-3395.

Schäfer, J., Norra, S., Klein, D., Blanc, G., 2009. Mobility of trace metals associated with urban particles exposed to natural waters of various salinities from the Gironde Estuary, France. Journal of Soils and Sediments 9, 374-392.

Schneider, D.W., Madon, S.P., Stoeckel, J.A., Sparks, R.E., 1998. Seston quality controls zebra mussel [Dreissena polymorpha] energetics in turbid rivers. Oecologia 117, 331-341.

Smaal, A.C., 1997. The uptake and release of suspended and dissolved material by oysters and mussels in Marennes-Oleron Bay. Le materiel en suspension dissous absorbe et rejete par les huitres et les moules dans la baie de Marennes-Oleron 10, 23-30.

Snape, I., Scouller, R.C., Stark, S.C., Stark, J., Riddle, M.J., Gore, D.B., 2004. Characterisation of the dilute HCl extraction method for the identification of metal contamination in Antarctic marine sediments. Chemosphere 57, 491-504.

Sofyan, A., Shaw, J.R., Birge, W.J., 2006. Metal trophic transfer from algae to cladocerans and the relative importance of dietary metal exposure. Environmental Toxicology and Chemistry 25, 1034-1041.

Soto, D.X., Roig, R., Gacia, E., Catalan, J., 2011. Differential accumulation of mercury and other trace metals in the food web components of a reservoir impacted by a chlor-alkali plant (Flix, Ebro River, Spain): Implications for biomonitoring. Environmental Pollution 159, 1481-1489.

Spliethoff, H.M., Hemond, H.F., 1996. History of toxic metal discharge to surface waters of the Aberjona Watershed. Environmental Science and Technology 30, 121-128.

Taylor, K.G., Owens, P.N., 2009. Sediments in urban river basins: A review of sediment-contaminant dynamics in an environmental system conditioned by human activities. Journal of Soils and Sediments 9, 281-303.

Tessier, A., Campbell, P.G.C., 1987. Partitioning of trace metals in sediments: Relationships with bioavailability. Hydrobiologia 149, 43-52.

Thévenot, D.R., Lestel, L., Tusseau-Vuillemin, M.H., Gonzalez, J.L., Meybeck, M., 2009. Les métaux dans le bassin de la Seine. Fascicule du PIREN Seine.

Thévenot, D.R., Moilleron, R., Lestel, L., Gromaire, M.C., Rocher, V., Cambier, P., Bonté, P., Colin, J.L., de Pontevès, C., Meybeck, M., 2007. Critical budget of metal sources and pathways in the Seine River basin (1994-2003) for Cd, Cr, Cu, Hg, Ni, Pb and Zn. Science of the Total Environment 375, 180-203.

Thorpe, A., Harrison, R.M., 2008. Sources and properties of non-exhaust particulate matter from road traffic: A review. Science of the Total Environment 400, 270-282.

Tusseau-Vuillemin, M.-H., Gourlay, C., Lorgeoux, C., Mouchel, J.-M., Buzier, R., Gilbin, R., Seidel, J.-L., Elbaz-Poulichet, F., 2007. Dissolved and bioavailable contaminants in the Seine river basin. Science of the Total Environment 375, 244-256.

Tusseau-Vuillemin, M.H., Gilbin, R., Bakkaus, E., Garric, J., 2004. Performance of diffusion gradient in thin films to evaluate the toxic fraction of copper to Daphnia magna. Environmental Toxicology and Chemistry 23, 2154-2161.

Uher, E., Combe, M., Mazeas, F., Bertrand, C., Compère, C., Tusseau-Vuillemin, M., Gourlay-Francé, C., 2013. Modeling the Impact of Biofouling on DGT Measurement in Freshwater. SETAC, Glasgow.

Uher, E., Zhang, H., Santos, S., Tusseau-Vuillemin, M.H., Gourlay-Francé, C., 2012. Impact of biofouling on diffusive gradient in thin film measurements in water. Analytical Chemistry 84, 3111-3118.

Uthe, J.F., Bligh, E.G., 1971. Preliminary Survey of Heavy Metal Contamination of Canadian Freshwater Fish. Journal of the Fisheries Research Board of Canada 28, 786-788.

Vanderploeg, H.A., Johengen, T.H., Liebig, J.R., 2009. Feedback between zebra mussel selective feeding and algal composition affects mussel condition: Did the regime changer pay a price for its success? Freshwater Biology 54, 47-63.

Vanderploeg, H.A., Liebig, J.R., Carmichael, W.W., Agy, M.A., Johengen, T.H., Fahnenstiel, G.L., Nalepa, T.F., 2001. Zebra mussel (Dreissena polymorpha) selective filtration promoted toxic Microcystis blooms in Saginaw Bay (Lake Huron) and Lake Erie. Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences 58, 1208-1221.

Velasco, L.A., Navarro, J.M., 2005. Feeding physiology of two bivalves under laboratory and field conditions in response to variable food concentrations. Marine Ecology Progress Series 291, 115-124.

Vignati, D.A.L., Dominik, J., Beye, M.L., Pettine, M., Ferrari, B.J.D., 2010. Chromium(VI) is more toxic than chromium(III) to freshwater algae: A paradigm to revise? Ecotoxicology and Environmental Safety 73, 743-749.

Voets, J., Bervoets, L., Blust, R., 2004. Cadmium Bioavailability and Accumulation in the Presence of Humic Acid to the Zebra Mussel, Dreissena polymorpha. Environmental Science and Technology 38, 1003-1008.

Wang, W.X., Fisher, N.S., 1997. Modeling metal bioavailabilty for marine mussels. Reviews of Environmental Contamination and Toxicology 151, 39-65.

Wang, W.X., Fisher, N.S., 1999a. Assimilation efficiencies of chemical contaminants in aquatic invertebrates: A synthesis. Environmental Toxicology and Chemistry 18, 2034-2045.

Wang, W.X., Fisher, N.S., 1999b. Delineating metal accumulation pathways for marine invertebrates. Science of the Total Environment 237-238, 459-472.

Wang, W.X., Fisher, N.S., Luoma, S.N., 1996. Kinetic determinations of trace element bioaccumulation in the mussel Mytilus edulis. Marine Ecology Progress Series 140, 91-113.

Wang, W.X., Rainbow, P.S., 2006. Subcellular partitioning and the prediction of cadmium toxicity to aquatic organisms. Environmental Chemistry 3, 395-399.

Wang, X.W., Fisher, N.S., Luoma, S.N., 1995. Assimilation of trace elements ingested by the mussel Mytilus edulis: effects of algal food abundance. Marine Ecology Progress Series 129, 165-176.

Widdows, J., 1978. Combined Effects of Body Size, Food Concentration and Season on Physiology of Mytilus-Edulis. Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom 58, 109-124.

Widdows, J., Brinsley, M.D., Bowley, N., Barrett, C., 1998. A benthic annular flume for in situ measurement of suspension feeding/biodeposition rates and erosion potential of intertidal cohesive sediments. Estuarine, Coastal and Shelf Science 46, 27-38.

Winter, J.E., 1978. Review on Knowledge of Suspension-Feeding in Lamellibranchiate Bivalves, with Special Reference to Artificial Aquaculture Systems. Aquaculture 13, 1-33.

Wong, C.S.C., Wu, S.C., Duzgoren-Aydin, N.S., Aydin, A., Wong, M.H., 2007. Trace metal contamination of sediments in an e-waste processing village in China. Environmental Pollution 145, 434-442.

Wu, Y., Bartell, S.M., Orr, J., Ragland, J., Anderson, D., 2010. A risk-based decision model and risk assessment of invasive mussels. Ecological Complexity 7, 243-255.

Zaldívar, J.M., Marinov, D., Dueri, S., Castro-Jiménez, J., Micheletti, C., Worth, A.P., 2011. An integrated approach for bioaccumulation assessment in mussels: Towards the development of Environmental Quality Standards for biota. Ecotoxicology and Environmental Safety 74, 244-252.

Zhou, Q., Zhang, J., Fu, J., Shi, J., Jiang, G., 2008. Biomonitoring: An appealing tool for assessment of metal pollution in the aquatic ecosystem. Analytica Chimica Acta 606, 135-150.

Annexes

Annexe n°1 : Bilan de masse suite au pulse-chase feeding

Ce sont les résultats des moyennes des bilans de masse réalisées sur les trois béchers avec le moins d'algues (Figure 52, A) et avec les trois béchers avec le plus d'algues (Figure 52,B).

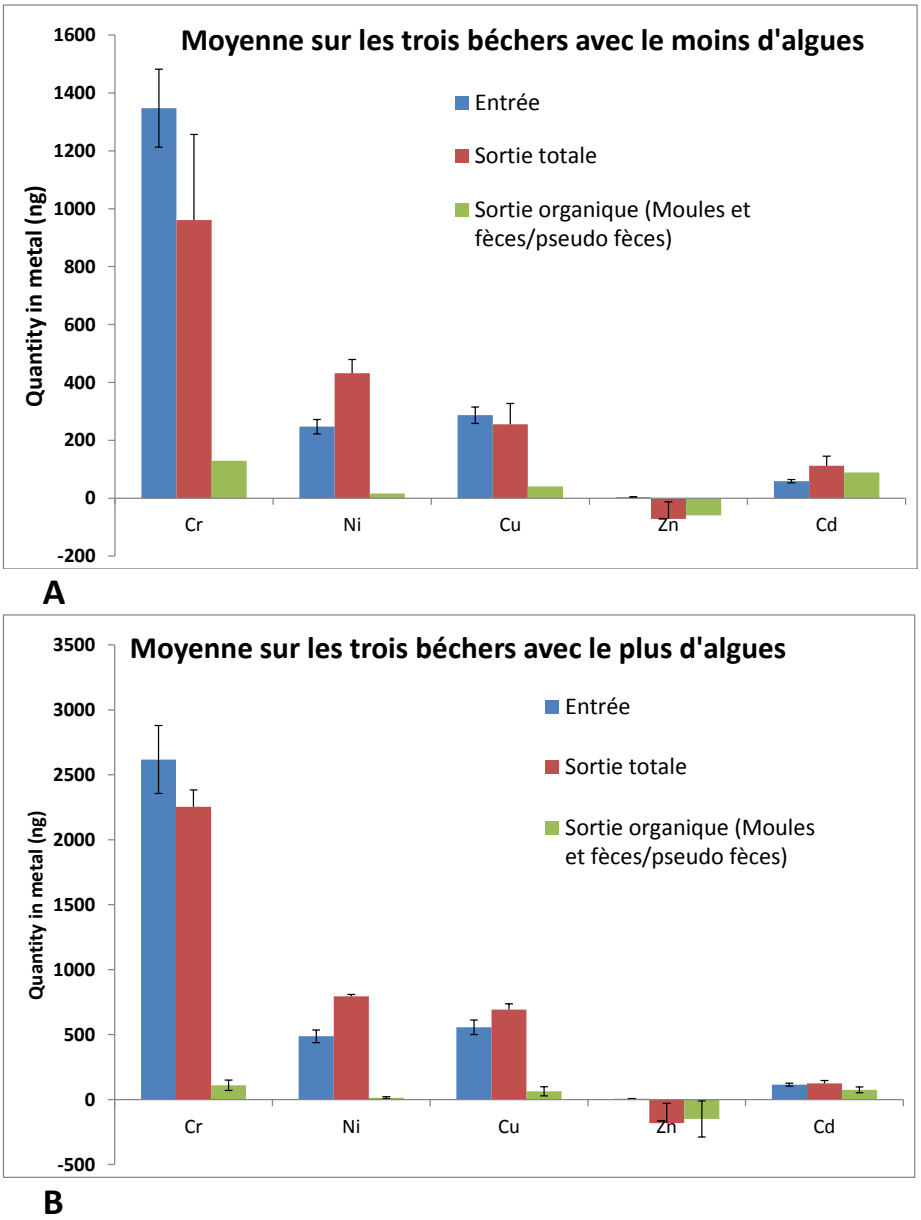


Figure 52 : Moyenne des bilans de masse en métaux (ng) (écart type représenté par les barres verticales) pour les trois réplicats des béchers avec 8mg/L d'algues (le moins d'algues) (Figure 52, A) et pour les béchers avec 15mg/L d'algues (le plus d'algues) (Figure 52, B).

Annexe n°2 : Protocole de minéralisation des eaux brutes

Digestion acide des eaux brutes pour les métaux totaux en digiprep

Indice de classement	TRAIT-M-05
Date de mise à jour	15/12/2008

I. Introduction

La présente méthode décrit la digestion acide des eaux brutes non filtrées pour l'analyse des métaux totaux en ICP-AES, GFAAS, FAAS et ICP-MS. Le but est de digérer la phase particulaire de l'eau brute, composée de sédiments en suspension, débris végétaux ou organiques divers. L'utilisation de la combinaison HCl/HNO_3 (eau régale) est nécessaire pour attaquer toutes les fractions.

II. Matériel

- Bloc chauffant Digiprep Jr
- Sonde de température digiprobe
- Digitubes en PP 50 mL
- Verres de montre en PP

III. Réactifs et étalons

- HNO_3 suprapur Merck 65 %
- HCl suprapur Merck 30 %
- Eau ultra-pure

IV. Précautions

Manipuler toutes les étapes sous hotte aspirante, avec blouse, gants, lunettes

V. Préparation du matériel

Le matériel est utilisé tel quel.

VI. Echantillonnage et conservation des échantillons avant digestion

Les échantillons sont prélevés directement dans les tubes SCP Sciences à bouchon bleu de 50 mL. Ils sont acidifiés à 1 % (v/v) au retour terrain avec HNO_3 sp en attendant leur traitement.

VII. Protocole de digestion

1. Evaporation de l'eau

- Placer les tubes à traiter dans le bloc digiprep. Préparer un tube blanc réactifs avec de l'eau ultra-pure acidifiée à 1 % en HNO_3.
- Veiller à ce que la sonde digiprobe soit dans sa cavité dans le bloc chauffant.
- Sélectionner le programme "**Evap 8h**" et lancer.
  → Lancer ce programme de préférence la nuit, l'évaporation des 50 mL étant très lente.
  → Eviter d'aller à sec

2. Digestion eau régale

- Le lendemain matin : il est préférable que le résidu soit inférieur à 1 ou 2 mL pour une meilleure attaque : continuer l'évaporation si nécessaire. L'évaporation sera différente suivant la composition de l'eau : les eaux les plus minéralisées seront les plus lentes à s'évaporer, il faudra éventuellement retirer les flacons prêts au fur et à mesure.
- Reprendre dans 2 mL HNO_3 / 8 mL HCl sous hotte. Mettre à reflux 2h à 85°C avec le programme "**Reflux eau régale**", en couvrant les tubes avec les verres de montre en plastique

3. Evaporation eau régale

i. Après les 2h de reflux, retirer les verres de montre et sélectionner le programme "**Evap eau régale**". Evaporer jusqu'à arriver visuellement à environ 500 µL.
Il peut être nécessaire de retirer certains tubes au fur et à mesure de l'évaporation pour éviter d'aller à sec et de former ainsi des composés réfractaires.

4. Reprise HNO_3

i. Ajouter 500 µL de HNO_3 et évaporer jusqu'à 500 µL environ avec le programme "**Evap HNO3**".

ii. A froid : ajouter 1 mL de HNO_3 et ajuster à 50 mL avec de l'eau ultra-pure.

Annexe n°3 : Protocole de digestion totale et d'extraction à l'HCl des MES

I. Introduction

Le protocole suivant permet d'évaluer les quantités en métaux présents dans les matières en suspensions (MES) : la quantité totale de métaux est évaluée par digestion totale rapide (48h) et la quantité de métaux biodisponibles par extraction à l'HCl.

II. Matériel

-Digiprep
-Hotte à flux laminaire
-Tubes en téflon

III. Réactifs et étalons

-Acide HCl supra pur 65 %, Merck

IV. Précautions

Manipuler toutes les étapes sous hotte aspirante, avec blouse, gants, lunettes.

V. Préparation préalable du matériel avant digestion et extraction

La digestion et l'extraction se font sur de la matière sèche.
Les MES sont d'abord collectées à l'aide de trappes à sédiments et conditionnées dans des bouteilles en verres ambrées dans le noir à 4°c avant traitement.
Puis elles sont siphonnées pour enlever l'eau surnageante, congelées pendant 48h (-80°C) et enfin lyophilisée pendant 24H. La matière sèche est finalement broyée au mortier pour être homogénéisée.

VI. Echantillonnage et conservation des échantillons avant digestion et extraction

Les échantillons séchés sont conservées dans des tubes de 15ml à fond conique au dessicateur.

VII. Protocole de digestion

La seconde méthode utilisée, et qui présente l'avantage d'être plus rapide, consiste en deux attaques successives de 100 mg d'échantillon à l'aide d'un mélange HF/HClO4 (respectivement 5 ml à 30 % et 1,5 ml à 67 %) à température ambiante pendant 2 heures. Ensuite, il y a évaporation à sec à 180°C, puis attaque du résidu sec à l'eau régale (HCl/HNO3) (respectivement 3,75 ml à 30 % et 1,25 ml à 67 %) et chauffage à 180°C jusqu'à évaporation totale. L'ensemble est ensuite repris dans HNO3 0.5 N pour analyse.

VIII. Protocole d'extraction

L'extration des métaux des MES est réalisée dans un contenant en téflon avec de l'HCL à 1N à 1 :20 (rapport poids/ volume) i.e si on travaille avec 1g de MES on met 20mL d'acide.
L'extraction est réalisée sur table agitante pendant 4h à température ambiante (20°c). Ce protocole permet d'extraire les métaux biodisponibles qui sont par ailleurs retrouvées dans les 3 premières fractions du BCR, Larner, 2008. .Ce protocole est reconnu par les travaux de Luoma, 1989 et de Snape, 2004.

Annexe n°4 : Protocole de minéralisation des tissus mous des moules

Digestion acide de tissus biologiques en digiprep

I. Introduction

La présente méthode décrit la digestion acide d'échantillons solides de type tissus biologiques pour l'analyse des métaux en ICP-AES, GFAAS, FAAS et ICP-MS. Dans le cas particulier de l'analyse minérale des tissus biologiques et donc des organismes, il faut éliminer la matrice organique tout en solubilisant les espèces métalliques. L'utilisation de HNO_3 permet d'atteindre ce but, accompagné d'eau oxygénée H_2O_2 comme agent oxydant. Tous les éléments de la matrice organique sont transformés en CO_2, H_2O et NO_2.

II. Matériel

- Bloc chauffant Digiprep Jr
- Sonde de température digiprobe
- Digitubes en PP 50 mL
- Verres de montre en PP

III. Réactifs et étalons

- HNO_3 suprapur Merck 65 %
- H_2O_2 suprapur Merck
- Eau ultra-pure

IV. Précautions

Manipuler toutes les étapes sous hotte aspirante, avec blouse, gants, lunettes.

V. Préparation du matériel

Le matériel est utilisé tel quel.

VI. Protocole de digestion

Le protocole de digestion est appliqué à des échantillons lyophilisés ou séchés à l'étuve.

- Ecrire les noms sur les flacons
- Pesée exacte du flacon vide : m_1
- Transfert du matériau à digérer dans le flacon
- Pesée exacte du flacon avec échantillon : m_2. Masse d'échantillon = m_2-m_1

Ajout des réactifs en fonction de la masse d'échantillon :

Masse échantillon (mg)	HNO_3	H_2O_2	H_2O
<100	2 mL	0,8 mL	17,2 mL
100 à 500	5 mL	2 mL	Ajustement 50 mL
500 à 1000	10 mL	4 mL	Ajustement 50 mL
> 1000		A tester	

- Ajout HNO_3 (voir tableau)
- Montée en température digiprep : programme "**MINE GAMMARES**", 1h de rampe jusqu'à 100 °C + 1h de palier. La sonde de température est laissée dans le bloc.
- Laisser refroidir
- Ajout H_2O_2 (voir tableau)
- Montée en température digiprep : programme "**MINE GAMMARES**", 1h de rampe jusqu'à 100 °C + 1h de palier. La sonde de température est laissée dans le bloc.
- Laisser refroidir
- Ajout H_2O (voir tableau)
- Pesée exacte du flacon avec minéralisat : m_3.

$$\text{Volume exact} = \frac{m_3 - m_1}{\mu_{HNO3\ 6.5\%}} \quad \text{avec } \mu_{HNO3\ 6.5\ \%} = 1{,}038$$

- Noter le pourcentage d'acide. Le minéralisat devra éventuellement être dilué avant analyse afin d'ajuster l'acidité à celle requise par la technique utilisée

- Dans le cas des tissus biologiques, le minéralisat doit être clair. Si ce n'est pas le cas, on peut :
  - laisser décanter et prélever à la pipette un volume à analyser
  - filtrer sur papier ou à la seringue

  Il faut cependant rechercher la cause de l'inefficacité de la digestion (résidus sabloneux, échantillon mal connu).

Annexe n°5 : Protocole de mesure des teneurs en chlorophylle a et en particules dans un échantillon d'eau de rivière

I. Introdution

Les échantillons d'eau sont analysés pour déterminer une concentration en chlorophylle (µg/L) et une quantité en particules.

II. Matériel

- -Fluorimètre portable (Aquapen C, Photon Systems Instruments)
- -Compteur à particules (Modèle Z1, Beckman Coulter)
- -Pipettes et bécher
- -Filtre seringue 0,2µm

III. Réactifs et étalon

- NaCl d'analyse

IV. Précautions

Au vu des quantités en particules dans les cours d'eau qui oscillent entre 2-3 $.10^4$ particules/mL et $2\text{-}3.10^5$ particules/mL il est nécessaire de diluer les échantillons 10 fois avant analyse avec le compteur à particules afin d'éviter un éventuel colmatage de la canule.

V. Préparation du matériel

Le matériel est utilisé tel quel.

VI. Echantillonnage et conservation des échantillons

Les échantillons d'eau prélevés sur le terrain sont conservés dans des bouteilles en verre préalablement lavées en machine et recouvertes de papier d'aluminium. Elles sont transportées en glacière avec des pains de glaces et conservées à 4°c jusqu'à l'analyse qui a lieu en laboratoire, moins de 24h après le prélèvement.

VII. Protocoles d'analyse de la chlorophylle (sur site) et des particules (en laboratoire)

1. Analyse de la chlorophylle

La détermination en chlorophylle se fait directement, sur le site,à la suite du prélèvement de l'eau grâce à un fluorimètre portable (Aquapen C, Photon Systems Instruments).



Photographie du fluorimètre portable.

Le fluorimètre va réaliser un test OJIP qui permet de déterminer la concentration en chlorophylle (µg/L).

Avant la mesure les réglages suivants sont effectués :
- Aller dans Réglages et régler :
    - f_color = 450 nm
    - f_pulse = 50 %
    - F_pulse = 70 %
    - A_pulse = 50 %
    - Repeat x1

Puis la mesure est réalisée :
- Aller dans Measurement et sélectionner OIJP.

OJIP (Chlorophylle fluorescence transient) est un test qui permet de mesurer la fluorescence de la chlorophylle en réponse à un flash lumineux dans l'obscurité. On obtient alors une courbe de fluorescence. L'appareil calcule l'aire sous la courbe (Fixed area) qui est enregistré par le logiciel de l'appareil. La donné de fixe area sera ensuite transférée et récupéré sur ordinateur.

L'appareil a été calibré, pour les mesures à l'aide d'un flash à 450nm, à l'aide d'une solution d'algues vertes : *C.reinharditii*.
La feuille de calibration donne un K1M : pente de la courbe chlorphylle (µg/L) = f(Fixed area) et un bruit de fond ou Offsets qui est l'aire sous la courbe d'un milieu de référence.
La concentration en chlorophylle est calculée selon l'équation suivante :

$$\left[Chlorophylle\right](\mu g/L) = K1M \times (Fixed\ area - offsets) \times 10^{-6}$$

avec
K1m = 16.9
Offsets= 76943

2. Analyse des particules

L'analyse des particules se fait grâce au compteur à particules.



Photographie du compteur à particules en fonctionnement.

Les préparations et réglages suivant sont à effectuer avant toute analyse d'un échantillon :
- Préparer l'électrolyte qui est une solution de NaCl à 10g/L.
- Changer le filtre seringue (0,2 µm) sur la réserve d'électrolyte.
- Allumer l'appareil (ON).
- Aller dans FONCTION.
- Effectuer 3 FILL-SYSTEM.
- Vérifier que la canule n'est pas bouchée (sur l'image en haut à droite).
- Dans SET-OUT : vérifier que l'appareil mesure les particules comprises entre 2 et 70 µm de diamètre.
- Analyser un blanc (solution d'électrolyte) et s'assurer qu'il y a moins de 100 particules. Faire plusieurs mesures (START dans le menu SET UP).
- Analyser la solution de contrôle. Faire plusieurs mesures.
    - Vortexer 10-15 secondes puis laisser reposer 10 minutes.
    - Mettre 200 µL de la solution et 20 mL d'électrolyte dans une cuve propre.
    - Agiter l'ensemble.
    - Dans le menu OUTPUT, entrer le facteur de dilution 101, l'unité et le type de résultat.
    - Dans le menu SETUP, entrer la plage de travail: 8 à 11 µm.
    - Faire plusieurs mesures.
    - Vérifier que le résultat affiche $1{,}003.10^6$ part/ml (+/- 10 %).

Ensuite l'analyse des échantillons peut démarrer
- Mettre 2mL de solution à tester et compléter jusqu'à 20mL avec la solution de référence.
- Dans le menu OUTPUT, entrer le facteur de dilution 10, l'unité et le type de résultat (régler sur quantité de particules).
- Dans le menu SETUP, entrer la plage de travail: supérieure à 2 µm.
- Dans le menu SETUP, appuyer sur START.
- Lire la quantité de particules trouvée qui s'affiche.

Annexe n°6 : Comparaison de notre design expérimental du pulse-chase à celui de Croteau et *al.*, 2007 et 2008 et Bourgeault, 2010.

Design expérimental	Présente recherche	Croteau et *al.*2007 et 2008	Bourgeault, 2010
Organisme testé	Bivalve filtreur : *Dreissena polymorpha*	Gastéropode d'eau douce *: Lymnaea stagnalis*	Bivalve filtreur : *Dreissena polymorpha*
Type de particules	Algues : *Pseudokirchneriella subcapitata*	Laitue	Algues : *Pseudokirchneriella subcapitata* Particules minérales : Smectite
Protocole de contamination de la nourriture	Algues contaminées pendant 8 jours après 4 jours de croissance	Laitue contaminée pendant 3 jours	Algues et particules contaminées pendant 48 heures
Isotopes testés	Cr^{53}, Ni^{62}, Cu^{65}, Zn^{67} et Cd^{106}	2007 : Cr^{53}, Cu^{65} et Cd^{106} 2008 : Ni^{62}, Cu^{65} et Cd^{106}	Cr^{53}, Ni^{62}, Cu^{65} et Cd^{106}
Durée du pulse	1h30	2h	2h
Durée du chase	48h	48h	72h
Avantages	- Bonne contamination des particules : faible désorption - Travail avec 5 isotopes métalliques en simultané	- Nourriture facile à contaminer - Organisme qui assimile beaucoup de nourriture contaminée en peu de temps	- Travail avec différents types de particules
Inconvénients	- Temps de pulse trop court	- Travail avec seulement 3 isotopes en simultané	- Mauvaise contamination des particules

Article

Environmentally realistic determination of metals assimilation efficiency in zebra (freshwater) mussels: *Dreissena polymorpha.*

Article en préparation pour Journal of hazardous material (à definer)

Violaine Emourgeon[a], Catherine Gourlay-Francé[a, b], Sophie Ayrault[c,]*, Marie-Hélène Tusseau-Vuillemin[d]

[a]IRSTEA, Unité recherche Hydrosystèmes et Bioprocédés, 1 rue Pierre Gilles de Gennes CS 10030, 92761 Antony, France
[b]Curent address : ANSES, 253 avenue du Général Leclerc 94701 Maisons-Alfort, France
[c]CEA/CNRS Laboratoire des Sciences du Climat et de l'Environnement, Vallée Bâtiment 12, Avenue de la Terrasse 91198 Gif sur Yvette, France
[d]IFREMER, Direction scientifique, 155 Rue Jean Jacques Rousseau, 92138 Issy-les-Moulineaux, France
*Corresponding author: sophie.ayrault@lsce.ipsl.fr

Abstract:

Dietborne metal uptake is a significant and often major route for the entry of metals into marine animals. For freshwater bivalves the dynamic processes governing metal biaoccumulation from diet are not fully understood. This work aims at studying the bioavailability and the bioaccumulation of particulate metals in terms of biodynamic by working with zebra mussel. We work at environmentally realistic concentrations but in laboratory with a freshwater mussel (*Dreissena polymorpha*). We used pulse-chase feeding technique coupled with enriched stable isotopes. Five isotopes of metal: 53 chromium, 62 nickel, 65 copper, 67 zinc and 106 cadmium are tested in cocktail to trace newly accumulated metals from diet, determined ingestion rate (IR) and assimilation efficiency (AE). Algae successfully accumulated (after 7 days) the five isotopes despite the environmental levels of metal (<20 $\mu g.L^{-1}$) in the exposition media (except for chromium 185 $\mu g.L^{-1}$). Dreissena were exposed to contaminated algae (1h30) and then to uncontaminated algae (48 h). Unfortunately mainly due to high levels of chromium in food (186$\mu g.g^{-1}$) and to the limits of the method, firstly tested with bivalves, evaluation of IR and AEs were complicated and values measured were low. IR ranged from 0.02 to 0.1 $\mu g.g_{\text{mussels dry weight}}^{-1}.d^{-1}$ these values are 10-fold lower than compare with other studies with Dreissena. AEs range from 0.5% to 18% depending on the metal and on organism response.

The analytical problems encounter and results obtained suggest that this method is not adapted to these organisms and that chromium toxicity should be tested to confirm or not its impact on feeding inhibition.

Keywords: Assimilation efficiency, Bioavailability, Stable isotope metals, Pulse-chase feeding, Freshwater mussels.

1. Introduction

Mollusk-based bioaccumulation is a widely used tool for metals biomonitoring in coastal pollution studies (Andral *et al.*, 2004). Zebra mussels, *Dreissena polymorpha*, are ubiquity species of rivers and lakes in Europe and have already been proposed as reference organism biomonitoring in fresh water bodies. They are filter-feeding bivalves that easily accumulate various contaminants including metals and this accumulation is relevant with spatial and temporal variations observed in ecosystems (Johns, 2011). Several studies already used *D.polymorpha* to assess water quality (Bervoets *et al.*, 2005a; Borcherding, 2006) by studying bioavailability of contaminants and especially of metals (Bervoets *et al.*, 2005b).

Using zebra mussels as biomonitoring tools for assessing bioavailability of metals implies to better understand bioaccumulation dynamics, which depend both on water chemistry and animal physiology (Soto *et al.*, 2011).

Identifying the major contamination pathway, waterborne or dietborne is a key point. Some studies deal with the importance of each pathway for invertebrates (Daphnia, mayfly) (Goulet *et al.*, 2007; Komjarova and Blust, 2009a; Cain *et al.*, 2011) but only few for bivalves (Hédouin *et al.*; Luoma *et al.*, 1992; Strady *et al.*, 2011) and even less for *Dreissena* (Roditi and Fisher, 1999).

The second point that needed to be identified precisely and studied is factors influencing bioaccumulation of metals. There are physicochemical factors independent from organisms and physiological factors link with comportment of organisms in response to natural variations. Concerning water and particles characteristics it is well accepted that physic-chemistry of water and particles and speciation of contaminants have a strong impact on bioaccumulation of contaminants by organisms (Luoma *et al.*, 1992; Griscom and Fisher, 2004; Voets *et al.*, 2004; Gourlay *et al.*, 2005; Ferreira *et al.*, 2009; Komjarova and Blust, 2009b; Bourgeault *et al.*, 2010a). However there is a lack of knowledge concerning physiology of organism and its impact on bioaccumulation of metal. Some studies show bivalves are able to adapt their biological processes such as ingestion rate (IR) of

particles and assimilation efficiency (AE) of metal particles to the quality of the environment (Wen-Xiong *et al.*, 1995; Decho and Luoma, 1996; Arifin and Bendell-Young, 2000; Tran *et al.*, 2002). Only very few studies (if any in our knowledge) are devoted to *Dreissena*.

Concerning bioaccumulation of metal by *Dreissena* , it is studied with *in situ* approaches (Roditi *et al.*, 2000; Bervoets *et al.*, 2005b; Bourgeault *et al.*, 2010b; Alcaraz *et al.*, 2011; Le *et al.*, 2011) and with laboratory exposures (Gossiaux *et al.*, 1998; Roditi and Fisher, 1999; Voets *et al.*, 2004; Bourgeault *et al.*, 2010a). Nevertheless most of laboratory exposures deal with waterborne contamination pathway. Studies on the bioaccumulation of metal by dietborne pathway for *Dreissena* remain scarce (Gossiaux *et al.*, 1998; Roditi and Fisher, 1999). Moreover a recent work has shown that the majority of metals are accumulated by the dietborne pathway by *Dreissena* in urban rivers (Bourgeault *et al.*, 2011). Since there is a lack of articles dealing with zebra mussel physiology and metal bioaccumulation, there is a paucity of data concerning assimilation efficiency (AE) of metal from food by *D. polymorpha*. Still, dietborne metal uptake is directly proportional to AE (Wang *et al.*, 1996; Luoma and Rainbow, 2005) thus it is necessary to properly assess it.

Recently, enriched stable isotopes methodology was used to calculate AE from food and IR of particles. This methodology is less heavy in a technical point of view and more environmental friendly then the radioactive techniques (Croteau *et al.*, 2007). This method has been tested with some metals like chromium, copper and zinc on invertebrates. This method needs to be tested with more metals and on species of bivalve which are known to adapt their feeding according to the food conditions and thus modulate the AE of particulate metal (Hédouin *et al.*, 2010).

The aim of this study is to investigate bioaccumulation of five metals: cadmium, copper, chromium, nickel and zinc by zebra mussel from dietborne exposition alone at environmental realistic concentrations. Experiments are lead with the enriched stable isotopes methodology and under controlled laboratory conditions. We assess IR of organic particles contaminated with five different metals and AE of these metals from food by zebra mussels. AE of metal are assessed together. This novel isotopic tracer using non-radioactive isotopes enables us to work also with Cu. Indeed Cu has

no suitable radioactive isotopes. Moreover it is an important metal because it is an essential metal that can also be a toxic metal.

2. Material and methods

2.1. Mussels collection and algae growth

Freshwater zebra mussels *Dreissena polymorpha* (80 individuals) were collected and calibrated (18-24 mm) in a low contaminated channel between the Meuse and the Rhine-Marne at Vertuzey, France (N 48.71584°-E 5.67396°).

They were transported to the laboratory in plastic barrel with water from the sampling site. In laboratory mussels were acclimated at 15°C, under a 10:14h illumination in a 12L aerated aquarium. Water was gradually replaced by mineral water (Nestlé Pure Life: Source des Acadias®). Mussels were fed with unicellular green algae *Pseudokirchneriella subcapitata*. These algae are unicellular cells of 4 µm of diameter and are known to be well assimilated by zebra mussels (Horgan and Mills, 1997). Mussels were acclimated to laboratory conditions for at least 7 days. They were gowned in plastic aerated barrels under a 10:14h illumination (Neon Sylvania Grolux T8 14W, UK) in a medium ASM_1 exempt of EDTA and Zn to allow a better spiking (culture medium: $CaCl_2$ 29.4 mg/L, $MgSO_4$ 49.3 mg/L, $MgCl_2$ 40.7 mg/L, K_2HPO_4 17.4 mg/L, $NaNO_3$ 170 mg/L, $FeCl_3$ 1.1 mg/L, $CuS0_4$ 0.186 µg/L, $CoCl_2$ 29 µg/L, $MnCl_2$ 1,4 mg/L, Na_2MoO_4 10 µg/L and H_3BO_3 2.5 mg/L). Iron cannot be suppressed because it is an essential metal (constituent of cytochroms) for respiration and photosynthesis of algae. Stable isotopes solutions were prepared from metallic compounds diluted in acid solution. Solids used were ^{53}Cr (97% purity, Euriso-top, France) partially diluted at 0.40 mg/L in a mixture of ultrapure acids $HF/HNO_3/HClO_4$ (1:5:3) at 120°C in a close container for 10 days, ^{62}Ni (98% purity, Euriso-top, France) diluted in pure HCl at 1.18 mg/L, ^{65}Cu (99% purity, Euriso-top, France) diluted in pure HCl at 500.00 mg/L, ^{67}Zn (>97% purity, Euriso-top, France) diluted in 9% of acid: 3% HCl and 6% of HNO_3 at 6.70 mg/L and ^{106}Cd (89% purity, Euriso-top, France) diluted in 2% of HNO_3 at 119.00 mg/L.

2.2. Algae labeling

Green algae were exposed to stable isotopes for 7 days after 6 days of culture, at the end of their exponential growth. This technique was done to enable metal to be internalized by algae (Knauer *et al.*, 1997). Algae were spiking every 2-3 days (Table 1).

Table 1: Goal and steps of spiking

Metal	Cd	Cr	Cu	Ni	Zn
Contamination expected of the medium ($mg.L^{-1}$)	1,8	4,0	12,0	10,0	3,0
3 spikings	90 µL in 600 mL	6 mL in 600 mL	14 µL in 600 mL	5 mL in 600 mL	27 µL in 600 mL
1st spiking (day 1)					
2nde spiking (day 3)	86 µL in 570 mL	1 mL in 570 mL	13 µL in 570 mL	5 mL in 570 mL	26 µL in 570 mL
3rd spiking (day 7)	77 µL in 500 mL	900 µL in 500 mL	12 µL in 500 mL	4,4 mL in 500 mL	23 µL in 500 mL

The stable isotope tracer solutions were added one by one at the culture medium, the pH of the medium was adjusted to 8-9 with NaOH after each spiking. After 7 days spiking the solution of algae was centrifuged (10-15min at 300rpm). The resuspended pellet was washed with EDTA for 1h to eliminate poorly adsorbed metals on the surface of the cells (Ball *et al.*, 2006). Finally algae were centrifuged again and pellet was resuspended in the culture medium. The density of the contaminated algae solution was measured by counting the number of algae cells using a hemocytometer and by measuring the absorbency at 680 nm with a spectrofluorimeter.

Unfortunately an error of non identified spiking occurs during the steps of spiking or during the realization of the stable isotope tracer solutions. The origin of the error has not been identified but final concentrations of chromium and zinc are not what expected.

2.3. Pulse-chase feeding experiment

The pulse chase feeding consists in exposing organisms to a short pulse of contaminated food followed by a longer time, a chase, of uncontaminated food. During the chase, the excretion of contaminants is followed. At the end of the experiment contaminated food is assimilated and it is possible to calculate AE.

2.3.1.Design

Five mussels were placed on a sieve in a 500ml acid washed chamber containing mineral water. The use of a sieve enables magnetic stirring to take place without disturbing mussel feces and pseudo-feces to be collected.

Mussels were exposed for 1h30 to algae spiked with ^{53}Cr, ^{62}Ni, ^{65}Cu, ^{67}Zn and ^{106}Cd. The exposition was limited to 1h30 to be as short as possible as gut passage time to permit the ingestion of significant amount of spiked food while limiting the formation of contaminated feces and pseudo feces. Indeed the gut passage time (GPT) is the time when 90% of the totality of each metal had been egested and was defined to last between 40-60min (Roditi and Fisher, 1999).

Two algae concentrations were tested (8 mg/L and 15 mg/L) each in triplicates: the lowest concentration of triplicates were named A8, B8 and C8 and the highest A15, B15 and C15. For each concentration, a controlled chamber: Ctr. 8 and Ctr. 15, in which mussels were exposed to uncontaminated algae was also prepared.

During the pulse step, algae were added in the chamber at two times (t=0 and t=40min) to counterbalance algae ingestion and to maintain algae concentration constant. Prior to algae addition, concentration of algae was measured by absorbance. Then the concentration of algae (mg/L) was calculated with two relationships, used one after the other:

$$10^6\, cells/mL = 0.7726 \times Absorbency - 0.0138,\ R^2 = 0.9954 \qquad \text{Equation 1}$$

$$10^6\, cells/mL = 58999 \times Concentration\ \ particles\,(mg/L) - 4744,\ R^2 = 0.9975 \qquad \text{Equation 2}$$

After 1h30 mussels within their sieve were removed from contaminated medium and placed in the uncontaminated medium for the depuration phase. Unlabelled algae were provided until 48h at controlled times (t=5h, t=8h, t=22h, t=31h and t=48h) to maintain algae concentration. Similarly, the remaining algae concentration was previously checked spectrophotometrically and the volume of algae solution was calculated accordingly.

At the end of the pulse, a parallel experiment with other mussels was realized. These new mussels were exposed for 1h30 to the filtered medium of the pulse.

2.3.2.Sampling

At the end of the pulse (t=1h30) and all along the chase at (t=5h, 8h, 22h, 31h and 48h) feces and pseudo feces were collected using pipette and placed on polycarbonate (PC) pre-weighted filters. Filters with feces or pseudo feces were dried at 60°C for 12h and weighted. Then filters were frozen at-80°C, before lyophilisation (Lyophilisator Christ, Alpha 2-4 LD plus).

At the end of the experiment, the five mussels in each beaker where dissected, soft tissues were pooled, weighted (wet weight) and frozen, -80°C. Then the pooled mussels were lyophilized and weighted (dry weight).

Controlled aliquots of water were taken at the end of the pulse as well at 4, 8, 22, 31 and 48 h. 10 mL water samples were filtered through a 0.45 µm PC filters (Nucleopore, Whatman) and acidified with concentrated nitric acid (Merck Suprapur 65%, 1% final concentration).

Algae were filtered on PC filters at the end of the pulse and of the chase. An aliquot of algae was rinsed for 10 min with 3mM EDTA. Then treated algae and non treated algae were filtered on PC filters. Finally filters with algae were treated the same way as filters with feces and pseudo feces.

For the parallel experiment the mussels and the water were sampled too at the end of the 1h30 exposition.

2.4. Samples preparation and analysis by ICP-MS

To minimize inadvertent metal contamination before experiments, all material used were soaked overnight in acid (10% nitric acid), rinsed 3 times in ultrapure water and dried in the clean room of the laboratory. Also lab wares and containers were polypropylene or Teflon only.

Freeze-dried samples (mussels soft tissues, filters with algae and feces and pseudo feces) were digested (Digiprep® Jr) in 50mL polypropylene tubes (Sarsted) with 2 mL concentrated $HN0_3$ at 65% and 0.8mL H_20_2 for soft tissues of mussel (less than 100mg). And for one filter with algae, feces or pseudo feces 5 mL concentrated $HN0_3$ at 65% and 2mL H_20_2 were used. Aliquots of 80 mg of the reference materials Mussel Tissue ERM-CE 278 (European Reference Material) and Bryophyte B.C.R n°60 (Community Bureau of Reference, B.C.R.) were used to validate the digestion method of the mussels and algae and feces (Table 1).

Then filtered water and digested samples were analyzed by inductively coupled plasma-mass spectrometry (ICP-MS) (ThermoFischer Scientific, XII Series) for the isotopes ^{50}Cr, ^{52}Cr, ^{53}Cr and ^{54}Cr, ^{58}Ni, ^{60}Ni, ^{61}Ni and ^{62}Ni, ^{63}Cu and ^{65}Cu, ^{66}Zn, ^{67}Zn, ^{68}Zn and ^{70}Zn and ^{106}Cd, ^{108}Cd, ^{110}Cd, ^{111}Cd, ^{112}Cd, ^{113}Cd and ^{114}Cd. An internal standard, Ge at 1µg/L, was used to prevent signal drift. To reduce isobaric interferences, a cell collision technique (CCT) was used with the He/H_2 (7.5%) collision gas. A reference river water material, SRM 1640a (NIST) (Standard Reference Material, USA) was used to control accuracy of the determination (Table 1).

2.5. Calculation of net accumulated tracers

The isotope tracing technique enabled us to track newly accumulated tracers. Indeed the stable isotope concentrations measured is the sum of the pre-existing load of isotopes (isotopes naturally present in the samples) plus the load of isotopes added by contamination. It was thus necessary to

subtract the pre-existing load of isotopes to get the net accumulated tracer. This method of calculation of accumulated tracer is taken from Croteau (2007). Briefly the most important was to determine abundance of each isotope by using signal intensity of each isotope in the calibration standard. If those measured abundances were too different from natural ones; pi = relative abundance of the natural isotope, because of interferences, the isotope considered was taken off our calculations and measured abundance was used for calculations. Thanks to those measured abundances we can calculate the load of isotopes newly added by contamination (ng) considering quantity of total accumulated tracers in the sample (ng) and natural abundance. Example of calculation with ^{53}Cr:

$$Quantity\ of\ {}^{53}Cr_{\ newly\ add} = Quantity\ of\ {}^{53}Cr_{\ in\ sample} - Quantity\ of\ {}^{53}Cr_{\ natural} \quad \text{Equation 1}$$

And quantity of ^{53}Cr natural was calculated regarding to quantity of ^{52}Cr which was the majority isotope of Cr and the measured abundance of ^{53}Cr i.e:

$$Quantity\ of\ {}^{53}Cr_{\ natural} = p^{{}^{53}Cr} \times Quantity\ of\ {}^{52}Cr_{in\ sample} \quad \text{Equation 2}$$

Finally we calculated the load of isotopes newly adding by:

$$Quantity\ of\ {}^{53}Cr_{\ newly\ add} = p^{{}^{53}Cr} \times Quantity\ of\ {}^{53}Cr_{in\ sample} - p^{{}^{53}Cr} \times Quantity\ of\ {}^{52}Cr_{in\ sample} \quad \text{Equation 3}$$

2.6. Polyatomic interferences

Despite a collision cell chamber was used to prevent interferences that result from the combination of sample matrices ions and which can affect the determination of ^{52}Cr the others minority isotopes as ^{106}Cd, ^{67}Zn, ^{63}Cu ^{62}Ni and ^{53}Cr can also easily interfered.

Concentration of zinc in standard reference material for river water is over predicted by 20% when interfered with ^{67}Zn (Table 2). Also, cadmium is over-predicted by ^{106}Cd by 2 times in algae matrices.

So a correction factor is used to adjust the background concentrations of zinc, for water, and for cadmium for algae, indeed those background concentrations had to be inferred with the ^{67}Zn and the

^{106}Cd respectively, Equ.5. The correction factor was 1.17 (±0.02, n=11) for the water for zinc and 3.44 (±1.46, n=2) for the algae for the cadmium.

Table 2: Comparison of metal concentration (µg.g^{-1} or µg.L^{-1}) inferred from the less abundant isotopes ^{106}Cd, ^{67}Zn, ^{65}Cu, ^{62}Ni and ^{53}Cr and compared with others isotopes for all reference materials and matrices (feces, algae and mussels).

	^{114}Cd	^{111}Cd	^{112}Cd	^{106}Cd	^{67}Zn	^{66}Zn	^{64}Zn	^{65}Cu	^{63}Cu	^{62}Ni	^{60}Ni	^{53}Cr	^{52}Cr	n
Relative natural abundance	28.7%	24.1%	24.1%	1.25%	4.1%	27.9%	48.63%	30.8%	69.2%	3.63%	26.2%	9.5%	83.8%	
ERM CE 278 mussels	0.29	0.31	0.29	0.34	64.75	70.66	66.17	8.17	8.13	0.97	0.96	0.47	0.46	1
± (deviation for measure)	0,05	0,07	0,06	0,07	6,48	6,36	7,94	0,65	0,65	0,10	0,08	0,08	0,04	
Certified value		**0.348±0.007**				**83.1±1.7**		**9.45±0.13**		**No reference**		**0.78±0.06**		
NIST 1640a	4.05	4.02	4.07	3.69	67.00	57.10	54.77	86.16	85.30	24.73	24.53	40.64	40.62	11
±	0.08	0.09	0.11	0.30	3.18	2.48	1.39	1.39	1.86	1.19	1.36	0.79	0.55	
Certified value		**3.961±0.07**				**55.20±0.32**		**85.07±0.48**		**25.12±0.12**		**40.22±0.28**		
ERM CE 278 Mussel tissue	1,97	1,89	2,05	2,08	252,13	270,53	251,17	49,64	48,52	37,22	37,04	21,74	21,76	3
±	0,08	0,06	0,08	0,18	8,76	9,58	8,32	6,86	7,06	1,06	0,83	0,26	0,46	
Certified Value		**2.20±0.10**				**313±8**		**51.2±1.9**		**No reference**		**No reference**		
Control mussel	1.13	1.17	1.15	1.32	107.51	115.37	109.68	13.93	13.93	8.07	8.29	1.24	1.16	1
± (deviation for measure)	0,19	0,28	0,23	0,26	10,75	10,38	13,16	1,11	1,11	0,64	0,83	0,16	0,09	
Unlabelled algae	4.23	4.16	4.16	9.84	50.34	55.04	53.03	14.20	12.56	39.45	32.78	65.13	43.00	2
±	3.04	2.96	2.96	4.02	0.75	0.58	0.57	4.66	4.60	1.38	0.09	8.25	2.62	
Feces (acclimatation)	8.51	8.45	8.45	7.48	484.94	525.30	507.72	255.94	249.80	333.74	327.75	535.00	528.68	5
±	5.70	5.35	5.35	5.81	336.45	367.95	344.05	246.19	240.45	230.84	233.45	313.59	306.24	

2.7. Calculation of ingestion rate and assimilation efficiency

Ingestion rate (IR) was determined. Different approaches can be used to calculated ingestion rate: mass balance and use of a tracer. We used the approach with tracer. This approach was already used by Croteau (Croteau *et al.*, 2007; Croteau and Luoma, 2008) for another organism. IR ($g.g^{-1}_{\text{dry weight mussels}}.d^{-1}$) was calculated using total amount of isotope egested in the feces during the pulse (Σ $isotopes_{feces}$), quantity of isotope per weight of algae ([isotope/m_{algae}), quantity of isotope in mussels ($isotopes_{mussels}$) and mussels' dry weight ($W_{mussels}$):

$$\mathrm{IR}_{\mathrm{isotope}} = \frac{\left(\frac{\sum isotopes_{\mathrm{feces}} + isotopes_{\mathrm{mussels}}}{\frac{isotopes}{m_{algae}}} \right)}{\mathrm{W}_{\mathrm{mussels}} \times \mathrm{time}}$$

Équation 4

For each metal assimilation efficiency (AE, %) was calculated as a ratio: mass of metal retained in the mussels after depuration ($tracer_{mussels}$ in ng) divided by amount of tracers retained by mussels and egested after depuration ($tracer_{feces}$ and $tracers_{pseudo\ feces}$ in ng), i.e. for ^{65}Cu:

$$AE_{^{65}Cu}(\%) = \frac{^{65}Cu_{mussels}}{^{65}Cu_{mussels} + ^{65}Cu_{feces} + ^{65}Cu_{pseudos feces}}$$

Équation 5

AE and IR are calculated for 5 pooled mussels.

3. Results

3.1. Analytical bias

Despite use of correction factors to erase the interferences when isotopes net values were calculated some results were negatives. This means that conservation of mass was not correct which prevent us to use all the results. All this difficulties warned us to be very careful with the interpretation of results.

3.2. Food spiking

Net tracer algae concentrations were 186, 54.1, 18.4, 1.1 and 0.8 $\mu g/g_{dry\ weight}$ for ^{53}Cr, ^{65}Cu, ^{62}Ni, ^{106}Cd and ^{67}Zn respectively. Algae contamination corresponded to the dissolve concentrations in medium of 185, 9.0, 18.2, 2.0 and 0.07 µg/L of dissolved ^{53}Cr, ^{65}Cu, ^{62}Ni, ^{106}Cd and ^{67}Zn respectively. The high ^{53}Cr and the very low ^{67}Zn contaminations were due to analytical issues during spiking. Nevertheless, it was verified in a concomitant study that the high concentration of ^{53}Cr did not modify algae growth. Unfortunately, the too low concentrations of zinc conducted us not to analyze results concerning zinc.

Net tracer levels in non-exposed algae were negligible (5, 2.6 and 1 $\mu g/g_{dry\ weight}$ for ^{53}Cr, ^{65}Cu and ^{62}Ni respectively, and <0.04 $\mu g/g_{dry\ weight}$ in algae for ^{106}Cd).

After the pulse experiment, the concentrations of metals in the remaining algae were for ^{53}Cr, ^{65}Cu, ^{62}Ni and ^{106}Cd respectively 186.4 (Standard deviation = 26), 67.3 (7.3), 13.6 (2.1) and 1.2 (0.5) $\mu g/g_{dry\ weight}$ (n=6). Those results were equivalent to those before the pulse when considering the standard deviation, indicating a low desorption of metals from algae.

As a consequence of the low desorption of metal from algae, dissolved ^{53}Cr, ^{62}Ni, ^{65}Cu and ^{106}Cd in the exposure media after the pulse were very low but anyway they were statistically higher compared to control medium (Fig. 1).

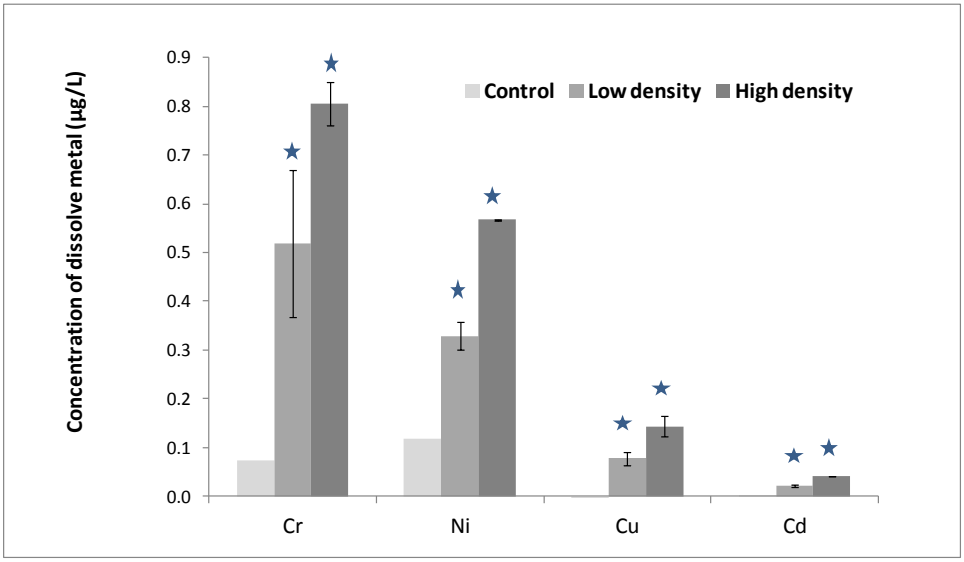


Figure 1: Comparison of concentration of dissolved metal (µg.L^{-1}) in media after the pulse compares to the control media (black bar). Control (no contaminated algae, concentration 8 mg.L^{-1}), low density (contaminated algae, low concentration 8 mg.L^{-1}) (light grey bar) and high density (contaminated algae, high concentration 15mg.L^{-1}) (dark grey bar) are the different conditions observed. Values are the average of replicates (n=3) and the vertical error bars correspond to the standard deviation of the average of the concentration of replicates. Statistically different from control value (Student-test , p<0.05).

3.3. Ejection and ingestion rate

Mussels defecated unassimilated tracers with similar patterns. The general tendency was characterize by a fast excretion in the first 30 min then followed by a slower excretion until the 48h period (Fig. 2). Kinetic observed is representative of the digestion by the fast way. In container A8 only two peaks at 4h and 30h kinetic were observed. They are representative of a slow digestion which is supposed to allow a better assimilation of metals (Nalepa and Schloesser, 1993).

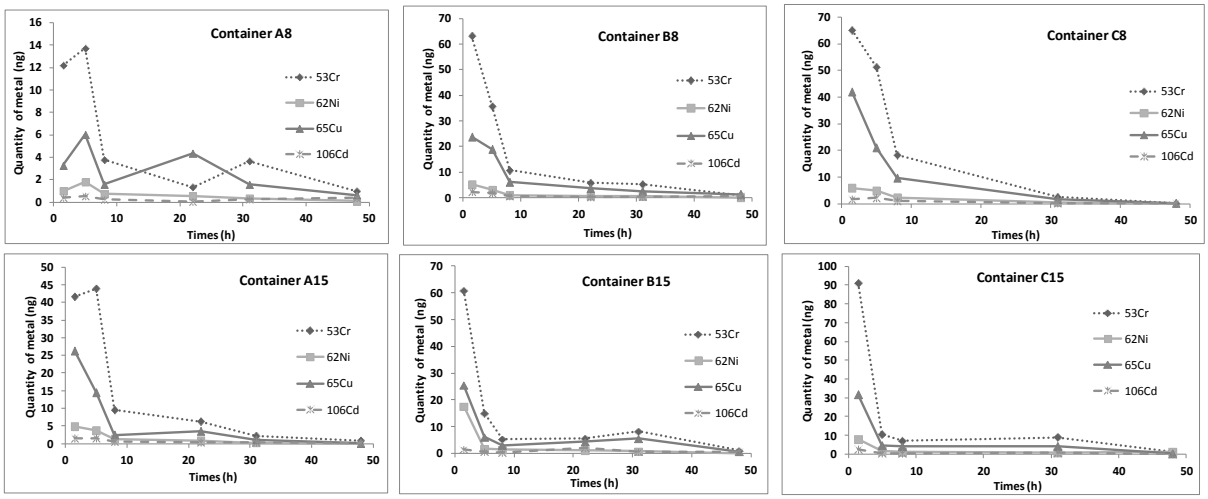


Figure 2: Defecation of the quantity (ng) of unassimilated tracers found in feces and pseudo feces was followed for 48h for each container and the evolution was presented with these figures. No measurement of ^{67}Zn was followed, it was under background level.

Observing how zebra mussels eject particles gives information concerning transfer of contaminants in organism. For example it gives the gut passage time (GPT), time necessary for ejection of 90% of the feces. GTP is observed because it gives the idea of how fast metals are going trough and it can give an idea about AE (Roditi and Fisher, 1999) even if no correlation has been done yet.

GPT's results were not very different between metals and between conditions. Highest GPT was for cadmium: 28h (±7.7 h, n=6) and lowest was for chromium: 15h (±6.9 h, n=6) (Fig. 3).

These results showed that metal transfer had been quite rapidly completed because the majority of kinetics observed in containers were the fast ones. Nevertheless those GTP were not the shortest measured, Roditi (1999) measured shorter GTPs for cadmium and chromium, 4.7 and 3h respectively, with *Dreissena polymorpha* too. These results cannot be used to conclude about the assimilation efficiency of metals. They only proved that a part of metals has been ingested by organisms.

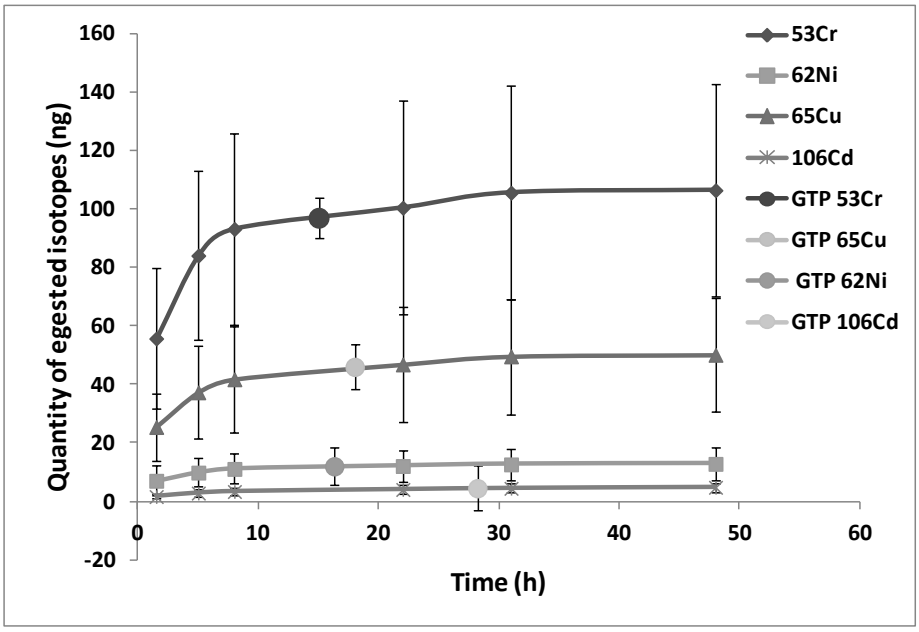


Figure 3: Cumulative loss of fives isotopes ^{53}Cr, ^{62}Ni, ^{65}Cu, and ^{106}Cd (ng) by mussels following the 1h30 of exposure to dietary contaminated algae. Values represent net quantity of each isotope in feces and were the average of the 6 containers. The average of the 6 containers for Gut Passage Time (h): time when 90% of the totality of each metal had been egested, are represented.

Food ingestion rate (IR) was considered using each isotope separately as a tracer and not only ^{53}Cr as a tracer because in our case ^{53}Cr was also assimilated by mussels.

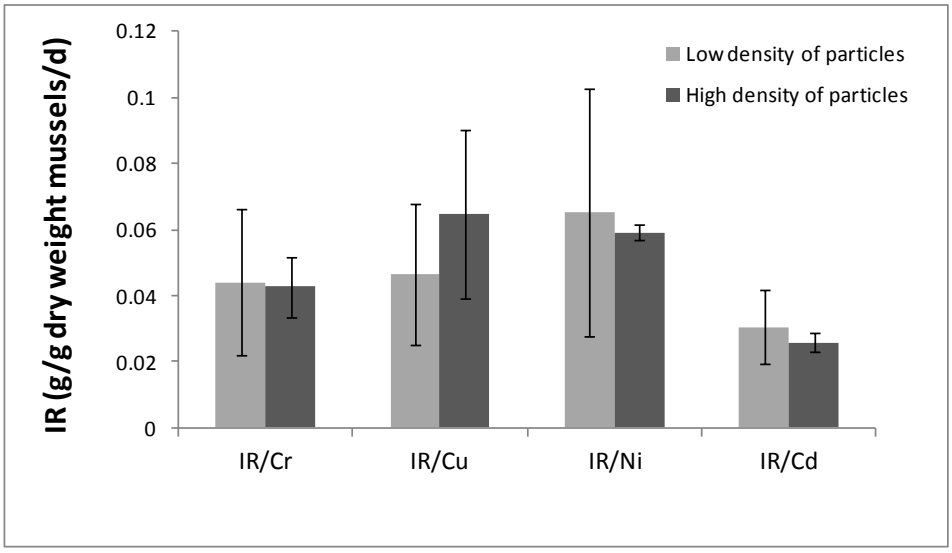


Figure 4: Calculation of ingestion rate (IR) ($g.g^{-1}_{dry\ weight\ mussels}.d^{-1}$) based on different tracers and calculated for two densities of particles (low density of particles 8mg.L^{-1} and high density of particles 15mg.L^{-1}). Values are the average of replicates (n=3) and the vertical error bars correspond to the standard deviation of the average.

Variation observed for IR was linked to the variation between containers. Comparison of IR calculated for different isotopes was coherent i.e we obtained IR between the same ranges for each container (Fig. 4).

3.4. Assimilation efficiency

Assimilation efficiency (AE) was lower for ^{53}Cr, than for ^{62}Ni, ^{65}Cu and Cd^{106} whatever the quantity of particles was (Fig. 5). Results were highly variable when considering containers especially for ^{106}Cd and ^{62}Ni. No significant difference were observed between the two different conditions (Student Test, $p<0.05$).

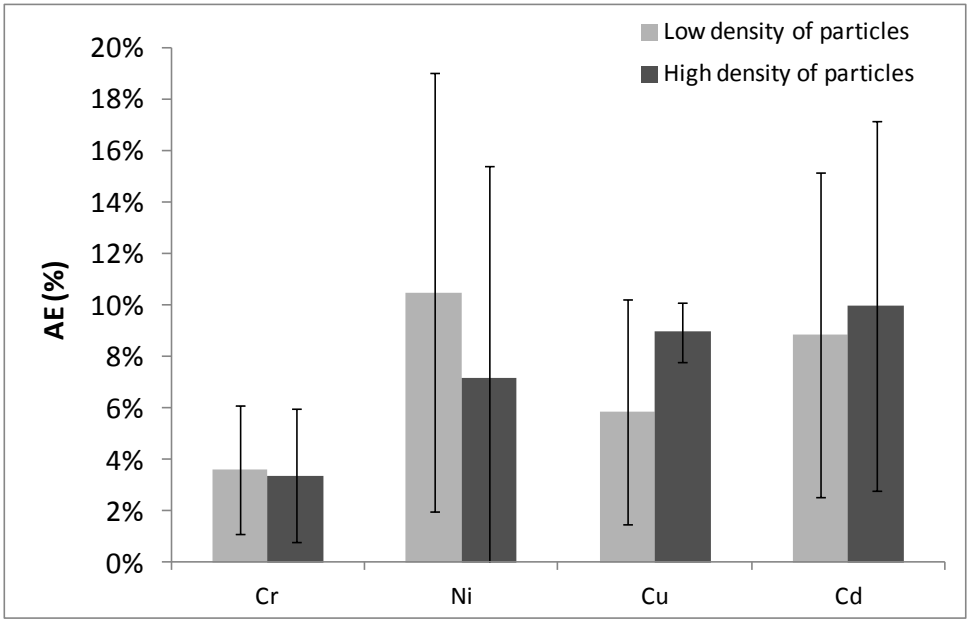


Figure 5: Calculation of assimilation efficiency (AE) (%) for each isotope. AE was calculated for different concentrations of contaminated food: low density (8mg.L^{-1} of particles of algae) and high density (15 mg.$L^{-1}$of particles of algae). Values are the average of replicates (n=3) and the vertical error bars correspond to the standard deviation of the average.

4. Discussion

The improvement of knowledge on biological factors governing bioaccumulation of metal by dietborn pathway for freshwater bivalves contributes to progress in the understanding of particulates metal bioavailability. Dreissena polymorpha are more often used for freshwater biomonitoring. However the knowledge of their interaction with contaminated particles and their biological constant governing metal accumulations are still limited.

Our results show that it is not easy to determine those constants in laboratory and we want to estimate the limits of the approach used.

4.1. Spiking performances

The algae were finally multi contaminated with 4 metals at concentrations equivalent to environmental concentrations in the Seine River (Tusseau-Vuillemin *et al.*, 2007; Thévenot *et al.*, 2009; Priadi *et al.*, 2011) and in the Orge River (Le Pape *et al.*, 2012). Contamination of algae with a very low level of cadmium in solution was successful. For only 2.0 µg/L of cadmium in spiked media in algae got 1.1 $\mu g/g_{dry\ weight}$ whereas others studies (Sofyan *et al.*, 2006; Goulet *et al.*, 2007; Geffard *et al.*, 2008) report that bioaccumulation in algae with a medium contamination under 5 µg/L was not achieved. This difference may be explained by better bioconcentration factor (BCF) in our experiment compare to theirs. That higher BCF could be explained by a longer exposition of the algae to the spiked media (at least 7 days in our experiment) against 4 days in theirs.

After 7 days of exposure, BCF using measured metal concentration in water ($L/kg_{dry\ weight}$) for ^{53}Cr, ^{62}Ni, ^{65}Cu, and ^{67}Zn were respectively 1005, 1015, 6034, and 11,143. BCF of ^{53}Cr was a new result. Spiking performances of algae with all metals together were different from the study performed by Komjarova and Blust (2009a) but could be explain by differences of concentrations of each metals in the spiked media. Nevertheless metals accumulation series with the BCF was constructed: Zn>Cu >Cr=Ni>Cd. These series were similar with those from the previous study: Cu>Zn<Pb>Cd>Ni. It confirmed that differences of spiking performances observed between the two studies were linked

with the difference proportion of each metal in spiked media. It could be concluded that our spiking protocol was optimal because it enabled to spike an algae with four different metals. This really nice multi metallic adsorption by *Pseudokirchneriella subcapitata* was confirmed by an internalization/adsorption ratio which is above 2 for all metals. Two groups could be done, the first group with non-essential metals chromium, nickel and cadmium with a ratio under 10: 7.1, 7.6 and 3.0 respectively and a second group with essential metals copper and zinc with a ratio above 10: 12.5 and 18.3 respectively. Moreover this high ratio was followed by a low percentage of desorption for the non-essential group between 20 and 50% (for cadmium) and a very low percentage of desorption for essential metals under 15% for both of them.

This good internalization can be interesting because in the literature it was linked with a high bioavailability, in the case of spiked phytoplankton for mayflies (Cain *et al.*, 2011). This situation will help to understand the processes that govern bioavailability. Finally spiking particles is not the part of our approach that will limit the most the estimation of proper AEs and IR.

4.2. Low bioaccumulation of metal

Figure 6 shows isotopic metals in the experimental mussels after 1h30 of exposition of contaminated algae. Experimental mussels were enriched in ^{53}Cr, ^{63}Ni, ^{65}Cu and ^{106}Cd compare to control. Enrichment was significant for ^{53}Cr, ^{62}Ni and ^{106}Cd only for low concentration of food. For ^{65}Cu enrichment was not significant. Some quantities cannot been evaluated in some container (one upon six for ^{62}Ni and two upon six for ^{65}Cu) because the mass balance was not correct and so calculations of net isotopes were not feasible. Those results were thus considered as a zero enrichment of mussels because ^{106}Cd concentrations were below the background levels.

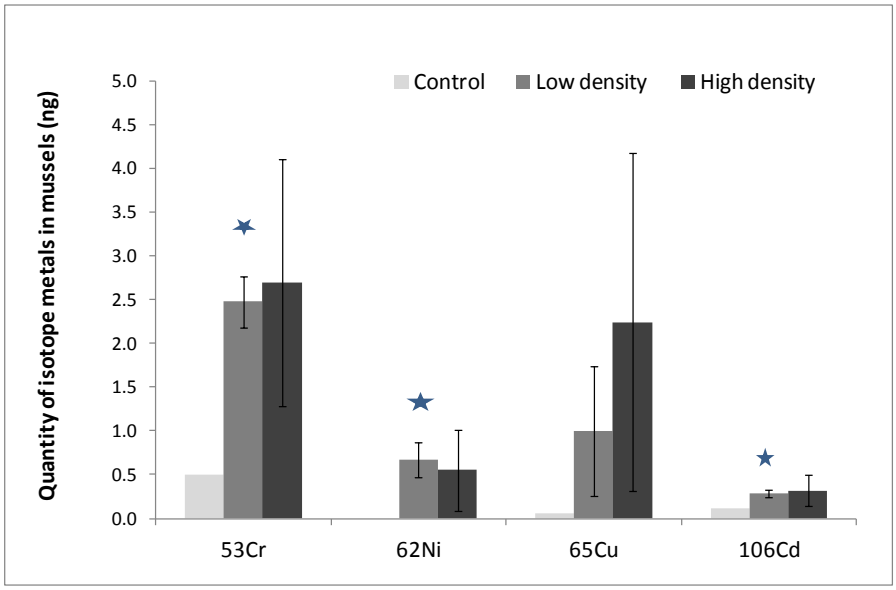


Figure 6: Tracer isotopes metals (ng) in mussels after 1h30 of trophic contamination with different foods: control pulse chase (mussels exposed to no contaminated algae, concentration 8 mg.L^{-1}) (grey), low density (mussels exposed to contaminated algae, low concentration 8 mg.L^{-1}) (dark grey) and high density (mussels exposed to contaminated algae, high concentration 15mg.L^{-1}) (light grey). Values are the average of replicates (n=3) and the vertical error bars correspond to the standard deviation of the average. Significant differences from control value (Student Test ✦ , p<0.05).

Then the impact of the depuration after 48h in the final concentration in body burden was calculated. Calculations were realized thank to the biodynamic model considering the loss kinetic describe in the biodynamic model of Luoma and Rainbow (2005):

$$\frac{dC_{org}}{dt}C_t = -k_e C_w \text{ so } \quad C_{org\,48h} = C_{org\,1h30} \cdot e^{-ke.t}$$

And C_{org} ; concentration of metals in mussels body burdens (µg.g $_{dry\ weigt}^{-1}$), k_e : loss constant (d^{-1}) and t: time (day) here 48 h (2 days). Loss constants (k_e) have been taken in literature for each metal: 0.011 d^{-1} for cadmium and chromium, 0.019 d^{-1} for nickel and 0.022 d^{-1} for copper (Zaroogian and Johnson, 1984; Mersch *et al.*, 1993; Roditi and Fisher, 1999).

This depuration might decrease the metal body burdens in mussels. Results demonstrated that elimination was negligible (Table 3).

Table 3: Trophic pathway: results of bioaccumulation in mussels measured after trophic exposure: comparison at 1h30 and 48h (correction of elimination take into account) (ng/$g_{dry\ weight}$). <BL: calculated accumulated metals lower than background levels.

Metals measured in mussels body burdens after 1h30 (ng/$g_{dry\ weigh}$t)					Metal in mussels body burdens after elimination by depuration, at 48h (ng/$g_{dry\ weigh}$t)			
	Cr	Ni	Cu	Cd	Cr	Ni	Cu	Cd
A8	26.6	9.9	18.8	3.5	26.0	9.5	18.0	3.4
B8	31.2	6.5	<BL	3.2	30.5	6.3	<BL	3.2
C8	34.4	7.4	18.9	3.5	31.7	7.2	18.1	3.5
A15	57.7	14.4	48.1	7.2	56.5	13.8	46.0	7.1
B15	12.1	<BL	36.1	2.3	11.9	<BL	35.6	2.2
C15	30.0	6.5	<BL	2.1	29.3	6.2	<BL	2.1

These results shows that metals are not enough accumulated by mussels. It can be linked with the design of experiment, less than 2 hours of exposition of mussel to low contaminated particles is maybe not enough to enable a high accumulation of metals by mussels. So it prevents us from measuring proper AEs and IR. It can also be linked with the biological parameters as ingestion rate or assimilation efficiency that are too small because of no optimal conditions such as chromium toxicity.

4.3. Low ingestion rate and toxicity of chromium

IR based on each spiked isotope for the four elements were calculated, similarly to previously published studies (Croteau *et al.*, 2007; Croteau and Luoma, 2008). IR for *D. polymorpha* based on the quantity of stable isotopes found in the organism was calculated for the second time (Bourgeault, 2010) and our average value of IR 0.047±0.027 $g.g^{-1}_{\ dry\ weight\ mussels}.d^{-1}$ was ten time lower than the IR estimated with the same algae by Bourgeault (2010) 0.52 ±0.30 $g.g^{-1}_{\ dry\ weight\ mussels}.d^{-1}$ (n=8). The difference can be explained by the high concentration of chromium which can decrease the

appetition of mussels for algae, due to a potential toxicity (Borcherding and Wolf, 2001). One study had already shown that high levels of metals associated with particles: cadmium at 157 $\mu g.g^{-1}$, copper at 2 628 $\mu g.g^{-1}$ or nickel at 102$\mu g.g^{-1}$ decreased by 10 fold ingestion rate of mayflie (Croteau and Luoma, 2009). No data were available for chromium particles avoidance behavior for aquatic organisms and *Dreissena* in particular. But a recent study has shown hexavalent-chromium toxicity toward neonates of crustaceans (Daphnia) from freshwater bodies (Arzate-Cárdenas and Martínez-Jerónimo, 2011). Moreover toxicity of both forms of chromium, hexavalent and trivalent, has already been shown for different aquatic organisms: a fish and a daphnia (Baral *et al.*, 2006) and an algae *Pseudokirchneriella subcapitata* too (Rodgher and Espíndola, 2008). Toxicity of chromium can explain reduced ingestion rate values.

Other estimation of IR for zebra mussel has already been done using radioactive tracers by Roditi (2000) allowing a comparison with our results. Their IR was equal to 0.41±0.23 g $g.g^{-1}_{\text{dry weight mussels}}.d^{-1}$. The discrepancy between our results and theirs could be explained by the variability of the FR with the particle type (Roditi and Fisher, 1999). Here, green micro algae *Pseudokirchneriella subcapitata* were used, whereas Roditi and Fisher (2000) calculated a mean of FR obtained with three different foods: diatom, cyanophyte and a natural bacteria assemblage. *P. subcapitata* had been chosen because this microalgae of this size was preferentially filtered by *Dreissena* (Juhel *et al.*, 2006) but giving only one type of particle to mussels cannot provide them sufficient nutritive food compare to a natural seston assemblage (Cain *et al.*, 2011).

Finally the quality of the food given: nutritional qualities and level of metal contamination can explain the low IR.

4.4. Assimilation efficiency and waterborne pathway

Only a few measurements of chromium and cadmium AE in mussel can be compared with our study. No AE for copper and nickel already exist for *Dreissena.* In our work assimilation efficiencies of

elements from foods ranged from 9% to 10 % for cadmium and from 4% to 3% for chromium, these values were in the lower part compared with another study (Roditi and Fisher, 1999). AE in this study varied between 19-72% for cadmium and 4.7-49% for chromium, these higher variations of AE were linked with the different types of particles used. Moreover in our work, the values of AE obtained for copper and nickel were low 6-9% and 11-7% respectively but they were the first ones for *Dreissena polymorpha*. The two AE given for each metal were for low quantity of particles (8mg/L) and high (15mg/L) respectively. But no significant differences in AE were observed when a variation of quantity of food occurred.

With the study of Roditi (1999) only one other study (Wen-Xiong *et al.*, 1995) calculated AE by dietborne pathway for *M.edulis.*

Concerning contamination of mussels by dissolved pathway alone a contamination was measured for ^{53}Cr, ^{62}Ni, ^{65}Cu and ^{106}Cd. This contamination was very low and very variable between replicates and not statistically different (Student test, $p<0.05$) from controls mussels. It seemed that the load of metal found in mussel after the pulse chase exposure was not in majority due to waterborne pathway. But it was necessary to confirm that majority of isotopes found in mussels were predominently accumulated from dietborne pathway.

Calculation of the metal influx from dissolve solution by multiplying the unidirectional metal uptake rate constant from solution (k_u) by the dissolved tracer concentration was done. Assuming that exposure lasted for 1h30, the mussels accumulated a quantity of metal from the waterborne pathway. This quantity was compared with final body burdens of mussels after depuration (Figure 6 with Table 4).

*Table 4: Calculated quantities of metal accumulated (ng) by mussel from the dissolve pathway and constant of assimilation k_u taken from literature: *(Roditi and Fisher, 1999), **(Bourgeault et al., 2012), ***(Bourgeault et al., 2010a).*

Calculated metal mussels body burdens by dissolved pathway after 1h30 (ng)				
	^{53}Cr	^{62}Ni	^{65}Cu	^{106}Cd
A8	3.50	0.09	0.05	0.27
B8	2.17	0.09	0.04	0.22
C8	1.95	0.08	0.05	0.20
A15	5.17	0.17	0.12	0.56
B15	3.41	0.13	0.07	0.41
C15	4.59	0.16	0.11	0.53
k_u (l.g-1.d-1)	1.25±0.8*	0.07±0.05**	1.05±0.05**	2.76±0.5***

Results (Table 4) for ^{62}Ni and ^{65}Cu were 10 and 5 times lower then compare with values found in the mussels after time of depuration of pulse-chase experiment (Figure 6). For ^{53}Cr and ^{106}Cd values found were in same average. This may be explain because mussels accumulated ^{53}Cr and ^{106}Cd in majority by the dissolve pathway; despite low contamination of water and very low values of isotopes measured in body burden of mussels exposed only to water. Another explanation is that the k_u chosen here do not match. Contamination by dissolve pathway occurs only for the ^{53}Cr and the ^{106}Cd. Cr are known to be preferentially accumulated from dissolve phase by *Dreissena* but not cadmium (Roditi *et al.*, 2000). So these results unlighted that chromium and cadmium are less accumulated by the dietborne route. Low values of BCF of these two metals in algae are a plausible explanation. Indeed there is a high concentration of chromium in algae and a very low concentration of cadmium and finally they are both less accumulated by the dietborne pathway. Indeed previous studies (Komjarova and Blust, 2009a) shows that the more a metal has a high BCF the more it is accumulated by dietborne pathway. These results show that the waterborne pathway complicated estimation of AE of dietborne pathway because accumulation of metal by waterborne is not negligible. But comparing bioaccumulation of metal by waterborne with dietborne pathway is complicated because there is no particle in medium when dealing with waterborne exposition and absence of particle can modify physiological comportment of organisms (Reeders *et al.*, 1989).

These results show that AE calculated for those two metals for dietborne route are debatable; they have been calculated considering that all isotopes found in mussels are only coming from the spiked

food and it is not true. Indeed AE calculated were representative of a global contamination of mussels including dietborne and waterborne pathway.

Our study illustrates that enriched metal stable isotope tracers are relevant to follow the basic property of food processing for mussels as already shown in other invertebrate aquatic organisms (Croteau *et al.*, 2007). This methodology, offer opportunities for expanding studies of metal biodynamic with metallic cocktails, at very low levels of contamination for a mussel from freshwater bodies. Nevertheless, this methodology seems to shows its limits because with mussels the distinction between waterborne and dietborne pathway vary. Indeed mussel are able to select their particles and to change their way of feeding depending on the toxicity of the particles (Borcherding and Wolf, 2001).

Moreover the exposition time of less than two hour is too short to measure high levels of body burdens contamination which is complicating evaluation of assimilation efficiency and ingestion rate. Moreover the toxic feeding inhibition effect of chromium has potentially modulated these values and need to be properly evaluated.

To conclude we can say that understanding the biological processes that modulate dietborne metal uptake depends on the species, the particles and needs to be more studied for *Dreissena polymorpha*.

Alcaraz, C., Caiola, N., Ibáñez, C., 2011. Bioaccumulation of pollutants in the zebra mussel from hazardous industrial waste and evaluation of spatial distribution using GAMs. Science of the Total Environment 409, 898-904.

Andral, B., Stanisiere, J.Y., Sauzade, D., Damier, E., Thebault, H., Galgani, F., Boissery, P., 2004. Monitoring chemical contamination levels in the Mediterranean based on the use of mussel caging. Marine Pollution Bulletin 49, 704-712.

Arifin, Z., Bendell-Young, L.I., 2000. Influence of a selective feeding behaviour by the blue mussel Mytilus trossulus on the assimilation of 109Cd from environmentally relevant seston matrices. Marine Ecology Progress Series 192, 181-193.

Arzate-Cárdenas, M.A., Martínez-Jerónimo, F., 2011. Age-altered susceptibility in hexavalent chromium-exposed Daphnia schodleri (Anomopoda: Daphniidae): Integrated Biomarker Response implementation. Aquatic Toxicology 105, 528-534.

Ball, A.L., Borgmann, U., Dixon, D.G., 2006. Toxicity of a cadmium-contaminated diet to Hyalella azteca. Environmental Toxicology and Chemistry 25, 2526-2532.

Baral, A., Engelken, R., Stephens, W., Farris, J., Hannigan, R., 2006. Evaluation of aquatic toxicities

of chromium and chromium-containing effluents in reference to chromium electroplating industries. Archives of Environmental Contamination and Toxicology 50, 496-502.

Bervoets, L., Voets, J., Covaci, A., Chu, S., Qadah, D., Smolders, R., Schepens, P., Blust, R., 2005a. Use of transplanted zebra mussels (Dreissena polymorpha) to assess the bioavailability of microcontaminants in flemish surface waters. Environmental Science and Technology 39, 1492-1505.

Bervoets, L., Voets, J., Smolders, R., Blust, R., 2005b. Metal accumulation and condition of transplanted zebra mussel (Dreissena polymorpha) in metal polluted rivers. Aquatic Ecosystem Health and Management 8, 451-460.

Borcherding, J., 2006. Ten years of practical experience with the Dreissena-Monitor, a biological early warning system for continuous water quality monitoring. Hydrobiologia 556, 417-426.

Borcherding, J., Wolf, J., 2001. The influence of suspended particles on the acute toxicity of 2-chloro-4-nitro-aniline, cadmium, and pentachlorophenol on the valve movement response of the zebra mussel (Dreissena polymorpha). Archives of Environmental Contamination and Toxicology 40, 497-504.

Bourgeault, A., 2010. Bioaccumulation par *Dreissena polymorpha* : quel reflet de la contamination chimique du milieu ? Expérimentation-Observation-Modélisation. Ecotoxicology. UPMC, Paris.

Bourgeault, A., Gourlay-Francé, C., Ayrault, S., Tusseau-Vuillemin, M.H., 2012. Bioaccumulation of waterborne Ni in Dreissena polymorpha: A stable isotope experiment to assess the effect of zinc, calcium, and dissolved organic matter. Environmental Toxicology and Chemistry 31, 819-827.

Bourgeault, A., Gourlay-Francé, C., Priadi, C., Ayrault, S., Tusseau-Vuillemin, M.H., 2011. Bioavailability of particulate metal to zebra mussels: Biodynamic modelling shows that assimilation efficiencies are site-specific. Environmental Pollution 159, 3381-3389.

Bourgeault, A., Gourlay-Francé, C., Tusseau-Vuillemin, M., 2010a. Modeling the effect of water chemistry on the bioaccumulation of waterborne cadmium in zebra mussels. Environmental Toxicology and Chemistry 29, 2182-2189.

Bourgeault, A., Gourlay-Francé, C., Vincent-Hubert, F., Palais, F., Geffard, A., Biagianti-Risbourg, S., Pain-Devin, S., Tusseau-Vuillemin, M.H., 2010b. Lessons from a transplantation of zebra mussels into a small urban river: An integrated ecotoxicological assessment. Environmental Toxicology 25, 468-478.

Cain, D., Croteau, M.N., Luoma, S., 2011. Bioaccumulation dynamics and exposure routes of Cd and Cu among species of aquatic mayflies. Environmental Toxicology and Chemistry 30, 2532-2541.

Croteau, M.N., Luoma, S.N., 2008. A biodynamic understanding of dietborne metal uptake by a freshwater invertebrate. Environmental Science and Technology 42, 1801-1806.

Croteau, M.N., Luoma, S.N., 2009. Predicting dietborne metal toxicity from metal influxes. Environmental Science and Technology 43, 4915-4921.

Croteau, M.N., Luoma, S.N., Pellet, B., 2007. Determining metal assimilation efficiency in aquatic invertebrates using enriched stable metal isotope tracers. Aquatic Toxicology 83, 116-125.

Decho, A.W., Luoma, S.N., 1996. Flexible digestion strategies and trace metal assimilation in marine bivalves. Limnology and Oceanography 41, 568-572.

Ferreira, D., Ciffroy, P., Tusseau-Vuillemin, M.H., Garnier, C., Garnier, J.M., 2009. Modelling exchange kinetics of copper at the water-aquatic moss (Fontinalis antipyretica) interface: Influence of water cationic composition (Ca, Mg, Na and pH). Chemosphere 74, 1117-1124.

Geffard, O., Geffard, A., Chaumot, A., Vollat, B., Alvarez, C., Tusseau-Vuillemin, M.H., Garric, J., 2008. Effects of chronic dietary and waterborne cadmium exposures on the contamination level and reproduction of Daphnia magna. Environmental Toxicology and Chemistry 27, 1128-1134.

Gossiaux, D.C., Landrum, P.F., Fisher, S.W., 1998. The assimilation of contaminants from suspended sediment and algae by the zebra mussel, Dreissena polymorpha. Chemosphere 36, 3181-3197.

Goulet, R.R., Krack, S., Doyle, P.J., Hare, L., Vigneault, B., McGeer, J.C., 2007. Dynamic multipathway modeling of Cd bioaccumulation in Daphnia magna using waterborne and dietborne exposures. Aquatic Toxicology 81, 117-125.

Gourlay, C., Mouchel, J.M., Tusseau-Vuillemin, M.H., Garric, J., 2005. Influence of algal and bacterial particulate organic matter on benzo[a]pyrene bioaccumulation in Daphnia magna. Science ofthe Total Environment 346, 220-230.

Griscom, S.B., Fisher, N.S., 2004. Bioavailability of sediment-bound metals to marine bivalve molluscs: An overview. Estuaries 27, 826-838.

Hédouin, L., Metian, M., Lacoue-Labarthe, T., Fichez, R., Teyssier, J.L., Bustamante, P., Warnau, M., 2010. Influence of food on the assimilation of selected metals in tropical bivalves from the New Caledonia lagoon: Qualitative and quantitative aspects. Marine Pollution Bulletin 61, 568-575.

Hédouin, L., Metian, M., TeyssiÃ©, J.L., Fichez, R., Warnau, M., Delineation of heavy metal contamination pathways (seawater, food and sediment) in tropical oysters from New Caledonia using radiotracer techniques. Marine Pollution Bulletin 61, 542-553.

Horgan, M.J., Mills, E.L., 1997. Clearance rates and filtering activity of zebra mussel (Dreissena polymorpha): Implications for freshwater lakes. Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences 54, 249-255.

Johns, C., 2011. Trends of total cadmium, copper, and zinc in the zebra mussel (Dreissena polymorpha) along the upper reach of the St. Lawrence River: 1994-2005. Environmental Monitoring and Assessment, 1-15.

Juhel, G., Davenport, J., O'Halloran, J., Culloty, S.C., O'Riordan, R.M., James, K.F., Furey, A., Allis, O., 2006. Impacts of microcystins on the feeding behaviour and energy balance of zebra mussels, Dreissena polymorpha: A bioenergetics approach. Aquatic Toxicology 79, 391-400.

Knauer, K., Behra, R., Sigg, L., 1997. Effects of free Cu2+ and Zn2+ ions on growth and metal accumulation in freshwater algae. Environmental Toxicology and Chemistry 16, 220-229.

Komjarova, I., Blust, R., 2009a. Application of a stable isotope technique to determine the simultaneous uptake of cadmium, copper, nickel, lead, and zinc by the water flea Daphnia magna from water and the green algae Pseudokirchneriella subcapitata. Environmental Toxicology and Chemistry 28, 1739-1748.

Komjarova, I., Blust, R., 2009b. Effect of Na, Ca and pH on simultaneous uptake of Cd, Cu, Ni, Pb, and Zn in the water flea Daphnia magna measured using stable isotopes. Aquatic Toxicology 94, 81-86.

Le Pape, P., Ayrault, S., Quantin, C., 2012. Trace element behavior and partition versus urbanization gradient in an urban river (Orge River, France). Journal of Hydrology 472-473, 99-110.

Le, T.T.Y., Leuven, R.S.E.W., Hendriks, A.J., 2011. Modeling metal bioaccumulation in the invasive mussels Dreissena polymorpha and Dreissena rostriformis bugensis in the rivers Rhine and Meuse. Environmental Toxicology and Chemistry 30, 2825-2830.

Luoma, S.N., Johns, C., Fisher, N.S., Steinberg, N.A., Oremland, R.S., Reinfelder, J.R., 1992. Determination of selenium bioavailability to a benthic bivalve from particulate and solute pathways. Environmental Science and Technology 26, 485-491.

Luoma, S.N., Rainbow, P.S., 2005. Why is metal bioaccumulation so variable? Biodynamics as a unifying concept. Environmental Science and Technology 39, 1921-1931.

Mersch, J., Morhain, E., Mouvet, C., 1993. Laboratory accumulation and depuration of copper and cadmium in the freshwater mussel Dreissena polymorpha and the aquatic moss Rhynchostegium riparioides. Chemosphere 27, 1475-1485.

Nalepa, T.F., Schloesser, D.W. (Eds.), 1993. Zebra Mussels Biologiy, impacts, and controls. Lewis Publishers.

Priadi, C., Ayrault, S., Pacini, S., Bonte, P., 2011. Urbanization impact on metals mobility in riverine suspended sediment: Role of metal oxides. International Journal of Environmental Science and Technology 8, 1-18.

Reeders, H.H., Bij De Vaate, A., Slim, F.J., 1989. The filtration rate of Dreissena polymorpha (Bivalvia) in three Dutch lakes with reference to biological water quality management. Freshwater Biology 22, 133-141.

Rodgher, S., Espíndola, E.L.G., 2008. The influence of algal densities on the toxicity of chromium for Ceriodaphnia dubia Richard (Cladocera, Crustacea). Brazilian Journal of Biology 68, 341-348.

Roditi, H.A., Fisher, N.S., 1999. Rates and routes of trace element uptake in zebra mussels. Limnology and Oceanography 44, 1730-1749.

Roditi, H.A., Fisher, N.S., SaÃ±udo-Wilhelmy, S.A., 2000. Field testing a metal bioaccumulation model for zebra mussels. Environmental Science and Technology 34, 2817-2825.

Sofyan, A., Shaw, J.R., Birge, W.J., 2006. Metal trophic transfer from algae to cladocerans and the relative importance of dietary metal exposure. Environmental Toxicology and Chemistry 25, 1034-1041.

Soto, D.X., Roig, R., Gacia, E., Catalan, J., 2011. Differential accumulation of mercury and other trace metals in the food web components of a reservoir impacted by a chlor-alkali plant (Flix, Ebro River, Spain): Implications for biomonitoring. Environmental Pollution 159, 1481-1489.

Strady, E., Schäfer, J., Baudrimont, M., Blanc, G., 2011. Tracing cadmium contamination kinetics and pathways in oysters (Crassostrea gigas) by multiple stable Cd isotope spike experiments. Ecotoxicology and Environmental Safety 74, 600-606.

Thévenot, D.R., Lestel, L., Tusseau-Vuillemin, M.H., Gonzalez, J.L., Meybeck, M., 2009. Les métaux dans le bassin de la Seine. Fascicule du PIREN Seine.

Tran, D., Boudou, A., Massabuau, J.C., 2002. Relationship between feeding-induced ventilatory activity and bioaccumulation of dissolved and algal-bound cadmium in the asiatic clam Corbicula fluminea. Environmental Toxicology and Chemistry 21, 327-333.

Tusseau-Vuillemin, M.-H., Gourlay, C., Lorgeoux, C., Mouchel, J.-M., Buzier, R., Gilbin, R., Seidel, J.-L., Elbaz-Poulichet, F., 2007. Dissolved and bioavailable contaminants in the Seine river basin. Science of the Total Environment 375, 244-256.

Voets, J., Bervoets, L., Blust, R., 2004. Cadmium Bioavailability and Accumulation in the Presence of Humic Acid to the Zebra Mussel, Dreissena polymorpha. Environmental Science and Technology 38, 1003-1008.

Wang, W.X., Fisher, N.S., Luoma, S.N., 1996. Kinetic determinations of trace element bioaccumulation in the mussel Mytilus edulis. Marine Ecology Progress Series 140, 91-113.

Wen-Xiong, W., Fisher, N.S., Luoma, S.N., 1995. Assimilation of trace elements ingested by the mussel Mytilus edulis: effects of algal food abundance. Marine Ecology Progress Series 129, 165-176.

Zaroogian, G.E., Johnson, M., 1984. Nickel uptake and loss in the bivalves Crassostrea virginica and Mytilus edulis. Archives of Environmental Contamination and Toxicology 13, 411-418.