



HAL
open science

**Bioaccumulation par Dreissena polymorpha: quel reflet
de la contamination chimique du milieu ?
Expérimentation – Observation – Modélisation**

Adeline Bourgeault

► **To cite this version:**

Adeline Bourgeault. Bioaccumulation par Dreissena polymorpha: quel reflet de la contamination chimique du milieu ? Expérimentation – Observation – Modélisation. Autre. Université Pierre et Marie Curie - Paris VI, 2010. Français. NNT : . tel-00546985

HAL Id: tel-00546985

<https://theses.hal.science/tel-00546985>

Submitted on 15 Dec 2010

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

**THESE DE DOCTORAT DE
L'UNIVERSITE PIERRE ET MARIE CURIE**

Spécialité

Ecotoxicologie
(Géoscience et Ressources Naturelles)

Présentée par

Adeline Bourgeault

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR de l'UNIVERSITÉ PIERRE ET MARIE CURIE

**Bioaccumulation par *Dreissena polymorpha*: quel
reflet de la contamination chimique du milieu ?
Expérimentation – Observation – Modélisation**

soutenue le 3 décembre 2010

devant le jury composé de :

P. Rainbow	Rapporteur
C. Amiard-Triquet	Rapporteur
J. Garnier-Laplace	Examineur
L. Bervoets	Examineur
J.-M. Mouchel	Examineur
M.-H. Tusseau-Vuillemin	Directeur de thèse
C. Gourlay-Francé	Co directeur de thèse

Bioaccumulation par *Dreissena polymorpha*: quel reflet
de la contamination chimique du milieu ?
Expérimentation – Observation – Modélisation

Rapport de Thèse

Adeline Bourgeault

Remerciements

Ce travail de recherche a été mené au sein de l'unité Hydro-systèmes et Bioprocédés du Cemagref d'Antony. Je remercie Cécile Loumagne, Sophie Morin et Valérie Dansin pour leur accueil au sein de l'unité.

Ce travail a bénéficié du soutien financier de la région Ile de France, ainsi que des programmes de recherche EC₂CO de l'INSU, PIREN Seine et MEDISIS.

Je souhaite remercier Catherine Gourlay-Francé et Marie-Hélène Tusseau-Vuillemin de m'avoir accueillie dans leur équipe et de m'avoir encadrée. Un grand merci à Catherine et Marie-Hélène pour leurs conseils judicieux, leur disponibilité et leur confiance. Merci pour ces trois années à la fois enrichissantes et passionnantes.

Je suis très sensible à l'honneur que m'ont fait Claude Amiard-Triquet et Philip Rainbow, en acceptant d'être rapporteurs de ce travail de thèse. Je tiens également à remercier Jaqueline Garnier-Laplace, Lieven Bervoets et Jean-Marie Mouchel, qui ont gentiment accepté d'être membres du jury.

Je remercie Sandrine Pain-Devin, Françoise Vincent-Hubert, Frédéric Palais et Alain Geffard pour l'ensemble du travail effectué en collaboration lors des campagnes sur l'Orge puis sur la Seine.

Je remercie également les membres de mon comité de thèse: Cédric Bacher, Magalie Baudrimont, Stellio Casas, Alain Geffard, Sandrine Pain-Devin et Françoise Vincent-Hubert.

Je tiens à exprimer toute ma reconnaissance à Sophie Ayrault pour m'avoir initiée à l'analyse des métaux par ICP-MS lors des expositions par voie trophique et d'avoir une nouvelle fois accepté pour les expositions au nickel.

Merci à toute l'équipe de VNF à Commercy de m'avoir aidée à trouver nos organismes si précieux même par des conditions climatiques rudes.

Je remercie également Cindy avec qui j'ai passé d'agréables moments lors du projet Medisis.

Merci à Lionel pour m'avoir fait découvrir le monde de R.

Je tiens à remercier toutes les Belcates pour l'ambiance chaleureuse au travail, leur bonne humeur et tous les bons moments passés ensemble. Je remercie plus particulièrement:

- Lise avec qui j'ai partagé le bureau pendant quelques années. Lise, bon courage pour l'avenir que je te souhaite brillant et pleins de succès.*
- Aurélie pour son aide très précieuse au laboratoire comme sur le terrain. Merci d'avoir toujours été présente.*
- Cécile MB pour toutes ces journées passées ensemble au labo 14 à extraire les HAP.*
- Cécile M pour son enthousiasme et pour avoir rendu les colloques inoubliables.*
- Emmanuelle pour m'avoir initiée avec la plus grande rigueur à l'analyse des métaux et des HAP. Je la remercie vivement pour son immense disponibilité et ses conseils avisés.*
- Stéphanie, Delphine et Kathleen, que j'ai encadrées pendant leur stage de Master et qui ont contribué à ce travail de recherche.*

- *Sans oublier la gente masculine de cette équipe: François, Matthieu, Damien, Olivier (membre de l'équipe par adoption) et Jérémie.*

Enfin, merci à ma famille de m'avoir toujours soutenue et encouragée. Je remercie tout spécialement Greg pour son soutien constant, sa patience, et tout un tas de raisons qu'il connaît déjà...

Résumé

Dans le contexte réglementaire de la Directive Cadre sur l'Eau, il est nécessaire d'évaluer l'impact de la contamination métallique sur les milieux aquatiques pour pouvoir établir un diagnostic des masses d'eau. Intégrer dans ce diagnostic, la biodisponibilité des métaux par une mesure de la bioaccumulation dans des organismes modèles, permet d'évaluer plus finement le risque pour l'environnement. Cependant le lien entre la bioaccumulation et la contamination chimique du milieu reste difficile à établir puisqu'il dépend de paramètres physico-chimiques et physiologiques.

Afin de faire ce lien chez la moule zébrée, nous avons utilisé un modèle cinétique de bioaccumulation: le modèle biodynamique. Des expositions en laboratoire ont permis d'étudier l'influence de la physico-chimie de l'eau (concentration en calcium, zinc et matière organique dissoute) sur les constantes d'accumulation du modèle par voie dissoute et de mettre au point un protocole d'exposition permettant de déterminer les constantes d'assimilation par voie trophique. L'effet compétiteur des ions (Ca et Zn) sur l'accumulation du Cd et du Ni par voie dissoute a été mis en évidence et intégré au modèle biodynamique par une approche s'inspirant du modèle du ligand biologique (BLM).

Des suivis de contamination de dreissènes transplantées, de 2 mois et 1 an, ont mis en évidence la capacité du modèle à relier la contamination métallique du milieu à celle des organismes, en prenant en compte la physicochimie du milieu (notamment le niveau trophique) et la physiologie de l'organisme (taux de filtration, taux de croissance).

Mots clés: Bioaccumulation, Métaux, Biodisponibilité, Facteurs de contrôle, *Dreissena polymorpha*, Modèle Biodynamique

Abstract

In the context of the Water Framework Directive, it is necessary to evaluate the impact of metal contamination on aquatic environments in order to establish a diagnosis of aquatic systems. Integrating bioavailability of metals in this diagnosis by measuring the bioaccumulation in model organisms allows assessing more accurately the risk to the environment. However the relationship between bioaccumulation and chemical contamination of the environment is not direct since it depends on physicochemical and physiological parameters.

To make this link in zebra mussels, we used a bioaccumulation kinetic model: the biodynamic model. Laboratory exposures were performed to examine the influence of the water physico-chemistry (concentration of calcium, zinc and dissolved organic matter) on the dissolved accumulation constant. The competing effect of ions (Ca and Zn) on the accumulation of dissolved Cd and Ni was demonstrated and integrated into the biodynamic model by an approach similar to the Biolotic Ligand Model (BLM). A protocol of exposure was established to determine the constants of dietborne assimilation.

A bioaccumulation monitoring in transplanted zebra mussels, during 2 months and 1 year, showed the ability of the model to relate the metal contamination of the environment to the bioaccumulation, taking into account the physico-chemistry of the environment (including trophic level) and the physiology of the organism (filtration rate, growth rate).

Key-words: Bioaccumulation, Metals, Bioavailability, Confounding factors, *Dreissena polymorpha*, Biodynamic Model

Sommaire

Remerciements	I
Résumé	III
Abstract.....	V
Liste des articles en annexe	XI
Liste des abréviations	XIII
Introduction	1
Chapitre 1: Etat des connaissances	7
1. La contamination métallique en Seine: Quels outils de Monitoring ?	7
1.1 Les métaux en Seine	7
1.2 Outils de monitoring de la biodisponibilité	14
2. Mécanismes de bioaccumulation des métaux.....	18
2.1 Interaction des métaux dissous avec les organismes aquatiques.....	18
2.2 Bioaccumulation par voie trophique.....	21
2.3 Mécanismes d'internalisation	23
3. Facteurs influençant la bioaccumulation.....	24
3.1 Physico-chimie du milieu environnant	24
3.2 Conditions physiologiques de l'organisme	27
4. Le modèle biodynamique.....	32
4.1 Description du modèle de bioaccumulation	32
4.2 Détermination des constantes biodynamiques	33
4.3 Variation des paramètres biodynamiques	36
4.4 Validité <i>in situ</i> du modèle biodynamique.....	37
4.5 Bilan et perspective d'utilisation pour la dreissène sur le bassin de la Seine.....	38

Détermination des paramètres biodynamiques en conditions contrôlées

Chapitre 2: Accumulation du Cd et du Ni par voie dissoute - Facteurs de contrôle.....43

1. Objectifs.....	43
2. Matériels et méthodes.....	44
2.1 Prélèvement et acclimatation des dreissènes.....	44
2.2 Mise au point du protocole d'exposition.....	44
2.3 Exposition des dreissènes et variations des paramètres chimiques.....	46
2.4 Traitement des organismes.....	48
2.5 La mesure du taux de filtration: un indice de l'état physiologique des dreissènes.....	49
3. Résultats.....	49
4. Discussion.....	52
4.1 Prise en compte de la concentration en Zn et en Ca dans l'évaluation de k_u	52
4.2 Effet de la matière organique sur l'accumulation du Cd et du Ni.....	54
5. Conclusion.....	56

Chapitre 3: Accumulation des métaux par voie trophique..... 57

1. Introduction.....	57
2. Matériels et méthodes.....	58
2.1 Principe de l'expérience.....	58
2.2 Dopage en isotopes stables de la nourriture.....	59
2.3 Conditions expérimentales.....	59
2.4 Minéralisation des échantillons et analyse des concentrations métalliques.....	61
2.5 Cadre d'interprétation.....	62
3. Résultats et discussion.....	63
3.1 Contamination de la nourriture.....	63
3.2 Contamination de l'eau et des dreissènes par voie dissoute.....	64
3.3 Taux d'ingestion des dreissènes.....	65
3.4 Contamination des fèces.....	66
3.5 Efficacité d'assimilation.....	67
4. Conclusions et perspectives.....	70

Validation du modèle biodynamique par des suivis de bioaccumulation chez des dreissènes transplantées in situ

Chapitre 4: Influence des facteurs environnementaux sur la bioaccumulation des métaux..... 73

1. Introduction.....	73
2. Matériels et méthodes.....	74
2.1 Sites d'échantillonnage et déploiement des organismes.....	74
2.2 Prélèvements.....	75
2.3 Traitement des échantillons au laboratoire.....	75
3. Résultats et discussion.....	76
3.1 Caractérisation des sites.....	76
3.2 Bioaccumulation dans les organismes.....	79
4. Conclusion.....	82

Chapitre 5: Prise en compte des facteurs physiologiques dans un suivi de bioaccumulation prolongé 85

1. Suivi de la contamination métallique.....	86
1.1 Protocole.....	86
1.2 Contamination métallique dans l'eau et les particules.....	87
1.3 Contamination des organismes.....	90
2. Modélisation et Paramètres utilisés.....	91
2.1 Formalisme du modèle biodynamique.....	91
2.2 Mesure ex-situ du taux de filtration.....	92
2.3 Une contamination métalliques intégrée.....	92
2.4 Choix des paramètres biodynamiques.....	93
2.5 Démarche.....	94
3. Les extractions chimiques peuvent-elles mimer la biodisponibilité des métaux particulaires ?.....	94
4. L'efficacité d'assimilation est-elle constante tout au long de l'année ?.....	98
5. Une méthode in situ permettant d'estimer l'AE.....	100
6. Conclusion et perspectives.....	103

Conclusion et perspectives 105

Bibliographie 111

Annexes 126

Liste des articles en annexe

Article 1:

Bourgeault A., Gourlay-Francé C., Tusseau-Vuillemin M. H., 2010. Modeling the effect of water chemistry on the bioaccumulation of waterborne Cd in zebra mussels. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 29(10):2182-2189.

Article 2:

Bourgeault A., Gourlay-Francé C., Vincent-Hubert F., Palais F., Geffard A., Biagianti Risbourg S., Pain-Devin S., Tusseau-Vuillemin M.-H., 2010. Lessons from a transplantation of zebra mussels into a small urban river: An integrated ecotoxicological assessment. *Environmental Toxicology*, 25(5):468-478.

Article 3:

Priadi C., Bourgeault A., Ayrault S., Gourlay-Francé C., Tusseau-Vuillemin M. H., Philippe Bonté, Jean-M. Mouchel. Time-integrated metal partitioning using sediment trap and DGT samplers in an urban river: Comparison of spatial and temporal variability with discrete metal partitioning.

En cours de soumission au Journal of Environmental Monitoring.

Article 4:

Bourgeault A., Priadi C., Gourlay-Francé C., Ayrault S., Tusseau-Vuillemin M. H. Assessment of metals assimilation efficiencies from field bioaccumulation modelling.

En préparation pour Environmental Science and Technology.

Liste des abréviations

ACP	Analyse en Composante Principale
AESN	Agence de l'Eau Seine Normandie
AVS	Acid Volatile Sulfides (Sulfures volatiles)
BAF	Facteur de bioaccumulation
BCF	Facteur de bioconcentration
BCR	Community Bureau of Reference of the European Commission (Bureau Communautaire de Référence de la Commission Européenne)
BLM	Biotic Ligand Model (Modèle du ligand biologique)
COD	Carbone Organique Dissous
COP	Carbone Organique Particulaire
DCE	Directive Cadre sur l'Eau
DGT	Diffusive Gradient in Thin film (Gradient de diffusion en couche mince)
FIAM	Free Ion Activity Model (Modèle de l'ion libre)
HA	Acides Humiques
HAP	Hydrocarbure Aromatique Polycyclique
IBGN	Indice Biologique Global Normalisé
ICP-MS	Spectrométrie de masse couplée à un plasma inductif
LEESU	Laboratoire Eau Environnement et Systèmes Urbains
LSCE	Laboratoire des Sciences du Climat et de l'Environnement
MEDISIS	Projet Métaux Dissous en Seine et Indicateurs biologiques
MES	Matière En Suspension
MOD	Matière Organique Dissoute
MRG	Metal-Rich Granules (Granules riches en métaux)
MT	Métallothionéine
NOEC	No Observed Effect Concentration (Concentration sans effets observables)
NQE	Norme de Qualité Environnementale
PLS	Partial Least Squares (Analyse des moindres carrés partiels)
RNO	Réseau National d'Observation
SEM	Simultaneously Extracted Metals (Métaux simultanément extraits)
SPM	Subcellular Partitionning Model (Modèle de répartition subcellulaire)
SPMD	Semi Permeable Membrane Device (Membrane semi-perméable)
STEP	Station d'épuration
TAM	Trophically Available Metal (Métal disponible par voie trophique)

Symboles

AE	Assimilation Efficiency (Efficacité d'Assimilation)
C_d	Concentration en contaminant biodisponible par voie dissoute ($\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)
C_p	Concentration en contaminant particulaire ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$)
C_{org}	Concentration en contaminant dans l'organisme ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$)
g	Taux de croissance (j^{-1})
IR	Ingestion rate (Taux d'ingestion) ($\text{g}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{j}^{-1}$)
k_e	Constante d'élimination
k_u	Constante cinétique d'accumulation par voie dissoute

Introduction

L'essor de l'activité humaine au cours des dernières décennies a conduit à la dispersion d'innombrables composées organiques et métalliques, à la fois dans l'air, l'eau et le sol. Des sources de pollution multiples (production d'énergie, industries chimiques et métallurgiques, activité agricole) contribuent chacune, à des degrés divers, à la contamination globale des écosystèmes par des composés de toxicité souvent variables et surtout difficile à évaluer (Ramade, 2007). Ces composés, présents à de très faibles concentrations dans le milieu (les micropolluants), regroupent des familles chimiques diverses : les éléments traces métalliques, les pesticides, les hydrocarbures, les plastifiants, les substances pharmaceutiques, etc.

Au cours des dernières années, les réglementations ont évolué afin de limiter les impacts environnementaux de ces polluants. Adoptée en décembre 2000, la Directive Cadre sur l'Eau (DCE) est un texte majeur en matière de politique sur l'eau. Elle engage les Etats Membres de l'Union Européenne à un objectif de retour au bon état des masses d'eau d'ici 2015. Or, juger du bon état nécessite en premier lieu, la mise en place d'un programme de surveillance permettant d'établir un diagnostic de l'état des milieux. La DCE implique donc de définir des variables de mesure pertinentes qui permettent de rendre compte de la contamination des milieux et de ses impacts sur l'écosystème. Actuellement, l'état des masses d'eau est défini à la fois par l'état écologique (apprécié par des indices biologiques qui renseignent sur l'abondance et la diversité des organismes), et par l'état chimique (évalué notamment par dosages des contaminants dans l'eau dont les concentrations sont ensuite comparées aux normes de qualité environnementale : NQE¹).

Cependant, ces deux informations ne permettent pas d'évaluer le risque chimique de façon satisfaisante. Les indicateurs biologiques utilisés actuellement (IBGN², indice diatomées et indice poissons), d'une part, sont peu sensibles aux micropolluants (Morin, 2006; Pollard et Yuan, 2006). D'autre part, les NQE établies pour l'eau, ne prennent pas en compte la biodisponibilité des micropolluants, c'est-à-dire leur capacité à interagir avec les organismes. On sait aujourd'hui, que les concentrations totales ne sont pas représentatives des concentrations toxiques. La biodisponibilité des contaminants dépend, en effet, de leur spéciation, qui sera fonction, par exemple, de la présence de ligands organiques ou inorganiques dans le milieu (Sunda et al., 1978; Tusseau-Vuillemin et al., 2004). Dans ce cas, comment accéder à la biodisponibilité des contaminants, et ainsi estimer le risque potentiel pour les organismes aquatiques ? Une solution consiste à évaluer directement des contaminants accumulés par les organismes (bioaccumulation). La bioaccumulation est, en effet, la première réponse biologique à la contamination

¹ La norme de qualité environnementale est définie comme la concentration d'un polluant ou d'un groupe de polluants dans l'eau, les sédiments ou le biote qui ne doit pas être dépassée, afin de protéger la santé humaine et l'environnement. Les NQE ont été établies pour 33 substances prioritaires qui regroupent à la fois des contaminants métalliques (Cd, Ni, Pb et Hg) et organiques (HAP, pesticides...).

² Indice Biologique Global Normalisé

chimique présente à des concentrations environnementales, et généralement le précurseur de l'effet toxique. Selon l'espèce aquatique considérée, cette accumulation se fait par la voie dissoute (via l'eau) et par la voie trophique (via la nourriture), comme c'est le cas pour les bivalves ou les poissons, ou bien uniquement par voie dissoute, comme c'est le cas pour les algues ou les bryophytes. Il ne s'agit donc plus d'estimer la contamination par des mesures physico-chimiques ponctuelles, mais d'avoir un outil de surveillance intégratif reflétant la biodisponibilité dissoute et/ou particulaire (Rainbow, 1995).

La bioaccumulation est un outil déjà utilisé dans le cadre des réseaux de surveillance du littoral. Ainsi, depuis plusieurs années, des chroniques de contamination d'espèces indicatrices (la moule *Mytilus edulis*) ont été acquises sur différents sites côtiers (Andral et al., 2004). En revanche, en milieu continental, il n'y a pas d'équivalent à *M. edulis*. La dreissène apparaît comme une bonne candidate pour ce rôle (Bervoets et al., 2005). Elle présente, en effet, de bonnes capacités de concentration des contaminants (dissous et particulaires) et de tolérance à différents stress. Par ailleurs, cette espèce est largement répandue et son mode de vie sédentaire permet d'accéder à une mesure représentative du milieu dans lequel elle se trouve. Néanmoins, de par son caractère invasif, son utilisation est limitée à des sites dans lesquels elle est déjà présente lors d'expositions *in situ* (transplantation).

Intégrer la biodisponibilité des contaminants dans le diagnostic des écosystèmes, c'est évaluer plus finement le risque pour l'environnement. Cependant, le lien entre la bioaccumulation et la contamination chimique du milieu reste difficile à établir. En effet, la physiologie de l'organisme (période du cycle biologique, comportement alimentaire, taux de filtration, statut énergétique), la physicochimie de l'eau et des particules et la spéciation des contaminants sont autant de paramètres qui vont moduler la bioaccumulation des micropolluants (Arifin et Bendell-Young, 2000; Ferreira et al., 2009; Gourlay et al., 2005; Griscom et Fisher, 2004; Voets, 2008). Pour interpréter cette bioaccumulation en termes de contamination des milieux, il est donc nécessaire de connaître le comportement des organismes vis-à-vis d'une contamination.

Deux approches sont généralement utilisées afin de relier l'accumulation dans les organismes aquatiques et la contamination chimique du milieu (Landrum et al., 1992). La première suppose une répartition des contaminants à l'équilibre entre l'eau, les sédiments et les organismes. Ainsi, la voie d'entrée du contaminant dans l'organisme n'a plus d'importance puisque tous les compartiments sont à l'équilibre et une mesure unique dans l'eau ou les sédiments permet de prévoir la bioaccumulation dans les organismes à partir de facteurs de bioconcentration (BCF) ou de bioaccumulation (BAF) préétablis.

$$BCF = \frac{C_{org}}{C_d} \quad \text{et} \quad BAF = \frac{C_{org}}{C_T} \quad \text{ou} \quad \frac{C_{org}}{C_p}$$

avec C_{org} la concentration dans l'organisme ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$)

C_d la concentration en contaminants dissous dans l'eau ($\mu\text{g.L}^{-1}$)

C_p la concentration en contaminant dans les sédiments ($\mu\text{g.g}^{-1}$)

C_T la concentration totale en contaminants dans le milieu ($\mu\text{g.L}^{-1}$)

L'équilibre, qui est une hypothèse forte de cette première approche, peut être long à atteindre, ce qui rend notamment les simulations en laboratoire difficiles. La seconde approche, cinétique, n'est pas contrainte par cette hypothèse d'équilibre. Parmi les modèles cinétiques, on en distingue deux types: le modèle cinétique à compartiments et le modèle cinétique à base physiologique. Le modèle cinétique à compartiments considère généralement l'organisme comme un compartiment unique et homogène, caractérisé par un taux d'entrée (k_u) et un taux de d'élimination (k_e) du contaminant.

$$\frac{dC_{org}}{dt} = k_u \cdot C_d - k_e \cdot C_{org}$$

Ce premier type de modèles repose sur des cinétiques d'accumulation et d'élimination d'ordre un. Selon l'organisme considéré, il est possible d'adapter ce modèle cinétique en ajoutant des compartiments, par exemple un compartiment trophique pour les particules ou les sédiments. A l'équilibre, les modèles cinétiques rejoignent ceux décrits précédemment basés sur le facteur de bioaccumulation et de bioconcentration. Les modèles cinétiques à base physiologique prennent en compte non seulement les compartiments environnementaux mais aussi la physiologie de l'organisme. Le modèle biodynamique, en particulier, prend en compte la physiologie de l'organisme à travers le taux de croissance (g), le taux d'ingestion des particules (IR) et l'efficacité d'assimilation (AE) (Thomann, 1981; Wang et Fisher, 1999). L'ensemble des paramètres est déterminé en laboratoire puis intégré au modèle afin de prédire l'accumulation *in situ* dans l'organisme.

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

Ce modèle a été largement étudié pour divers contaminants et organismes, aussi bien du phytoplancton, des invertébrés que des poissons (Buchwalter et al., 2007; Guan et Wang, 2006; Luoma et Rainbow, 2005; Roditi et al., 2000b; Tsui et Wang, 2007; Wang et al., 1996). Il a montré sa capacité à prédire la bioaccumulation, des métaux notamment, à partir de la contamination du milieu (Luoma et Rainbow, 2005).

Une fois les contaminants accumulés dans l'organisme, des mécanismes de régulation comme l'excrétion ou la détoxification, permettent aux organismes aquatiques de lutter contre leurs effets toxiques. Ainsi, la toxicité ne s'exprimera que si le taux d'accumulation dans l'organisme excède le taux conjoint d'élimination et d'excrétion (Rainbow, 2002). La bioaccumulation ne va donc pas renseigner directement sur la toxicité. Afin d'évaluer l'impact écotoxicologique, différents biomarqueurs (biochimiques, physiologiques, etc) sont proposés dans les études de biomonitoring (Vasseur et Cossu-Leguille, 2003). La bioaccumulation, même si elle ne suffit pas à elle seule à rendre compte de l'état de santé général du milieu, apparaît comme un élément essentiel du diagnostic des écosystèmes.

Objectifs de l'étude et démarche scientifique

L'objectif de ce travail est d'observer, de comprendre et de prédire les processus qui contrôlent la bioaccumulation des contaminants dans un organisme modèle, la dreissène, afin d'en évaluer ses potentialités comme outil de biomonitoring des milieux aquatiques continentaux. Notre travail porte principalement sur les contaminants métalliques; ils constituent donc le cœur du mémoire³. On se place dans un contexte de contamination urbaine diffuse où les contaminants sont multiples et présents à de faibles concentrations (le Bassin de la Seine). L'enjeu est d'évaluer l'effet de la contamination sur l'accumulation des organismes tout en le distinguant des influences physiologiques (activité de filtration, variation du poids des tissus des organismes selon leur cycle biologique) et physico-chimiques (composition chimique du milieu en ions et matière organique). Cette distinction est d'autant plus complexe que les niveaux de contamination sont bas.

Un premier chapitre bibliographique présente le contexte de la contamination métallique dans le bassin de la Seine et décrit les mécanismes de bioaccumulation des métaux chez les organismes aquatiques, à la fois par voie dissoute et par voie trophique. On y retrouve également une description du modèle biodynamique. La suite du document présente la synthèse des travaux réalisés et des résultats obtenus.

Des expérimentations en laboratoire ont permis de calibrer les paramètres du modèle biodynamique:

- Les mécanismes d'accumulation des métaux par voie dissoute ont été étudiés en laboratoire (Chapitre 2) afin de mieux comprendre l'effet de la composition chimique de l'eau sur ces processus. Trois facteurs ont été testés: la concentration en calcium (Ca), en zinc (Zn) et en matière organique dissoute (MOD). La dimension physiologique a été intégrée à ces expériences par l'étude de l'influence de la composition de l'eau sur l'activité de filtration. Certains de ces mécanismes ont été formalisés dans un modèle de compétition et intégrés au modèle biodynamique.
- Etant donné la complexité du comportement alimentaire des dreissènes, nous avons cherché à évaluer en laboratoire l'effet de la qualité et la quantité de nourriture sur l'accumulation des métaux par voie trophique (Chapitre 3). Cette étape a nécessité la mise au point d'un protocole d'exposition permettant de mesurer l'assimilation des métaux par les dreissènes.

³ La bioaccumulation des Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques (HAP) est également abordé lors des suivis *in situ*, les résultats sont décrits dans deux articles: l'Article 2 en annexe et un second article en préparation (Gourlay-Francé C., Bourgeault A., Tusseau-Vuillemin M. H. Monitoring of PAH contamination in water: comparison of biological and physico-chemical tools).

L'accumulation des métaux a été suivie *in situ* chez des dreissènes transplantées lors de deux campagnes, afin d'observer si le modèle biodynamique mis en place est un outil suffisamment sensible pour rendre compte de la pression chimique dans un contexte de contamination diffuse.

- Une première campagne courte de deux mois sur le bassin de l'Orge (Chapitre 4) pour laquelle la physiologie de l'organisme a été peu approfondie.
- Une seconde, sur une année biologique complète, le long de l'axe Seine (Chapitre 5) permettant d'étudier les différentes phases du cycle de la dreissène (période d'amaigrissement, de croissance, de ponte, etc).

Chapitre 1: Etat des connaissances

1. LA CONTAMINATION METALLIQUE EN SEINE: QUELS OUTILS DE MONITORING ?

1.1 Les métaux en Seine

1.1.1 Origine

Les métaux, naturellement présents dans les sols, sont disséminés suite à l'érosion des roches et à l'activité volcanique. Dans le cas de la Seine, s'agissant d'un bassin carbonaté, le fond naturel métallique est relativement faible (Thévenot et al., 2002). L'activité anthropique va modifier le cycle naturel des métaux et entraîner leur rejet, notamment dans l'atmosphère et le milieu aquatique. Ces rejets se traduiront *in-fine* par une augmentation des concentrations dans l'eau, les particules et les organismes. Les rejets anthropiques ont des sources multiples, qu'elles soient diffuses comme c'est le cas pour le trafic automobile ou des rejets urbains par temps de pluie (RUTP) provenant de l'écoulement de la pluie sur les toitures ou les routes, ou ponctuelles dans le cas de sites miniers par exemple.

Le bassin de la Seine, bien que n'étant pas un bassin minier, a été soumis à de fortes pressions métalliques, à la fois urbaines et industrielles. En effet, l'agglomération parisienne compte environ 6,5 millions d'habitants et contribue actuellement à environ 30% de la production industrielle française. La présence de métaux dans la Seine, dès le XIXe siècle, provient des usines mais également de l'utilisation dans la vie courante (de canalisations en Pb, toitures en Zn, encres et peintures à base de Cd, tubes en Cu, et plus récemment d'accumulateurs en Pb et de piles en Ni et Cd).

La majeure partie des eaux usées de Paris et de ses agglomérations, qui regroupe à la fois les égouts domestiques, les eaux industrielles ou les eaux de ruissellements urbains, est collectée dans la station d'épuration Seine-aval à Achères, station la plus grande d'Europe située quelques kilomètres en aval de Paris (Figure 1). La quantité d'eau traitée rejetée est considérable et peut constituer jusqu'au quart du débit de la Seine en période d'étiage. La Seine est, en effet, naturellement, un fleuve à faible débit ($540 \text{ m}^3 \cdot \text{s}^{-1}$ en moyenne à l'embouchure de la Seine à Poses et environ $150 \text{ m}^3 \cdot \text{s}^{-1}$ en période d'étiage).

Les bilans de masses métalliques réalisés pour tout le bassin versant de la Seine ont montré des flux importants de métaux provenant d'activités urbaines, industrielles et agricoles; les flux naturels (bruit de fond géochimique) étant bien moindres. Cependant de nombreuses sources de rejets restent encore inconnues (Thévenot et al., 2009). Ainsi en comparant les flux réellement observés en sortie de bassin à ceux estimés, seulement 40% des rejets de Cd et de Cu ont pu être identifiés. Des rejets diffus provenant de

l'érosion de sites contaminés ou de fuites de décharges mal contrôlées, pourraient constituer cette partie de flux encore inconnue.

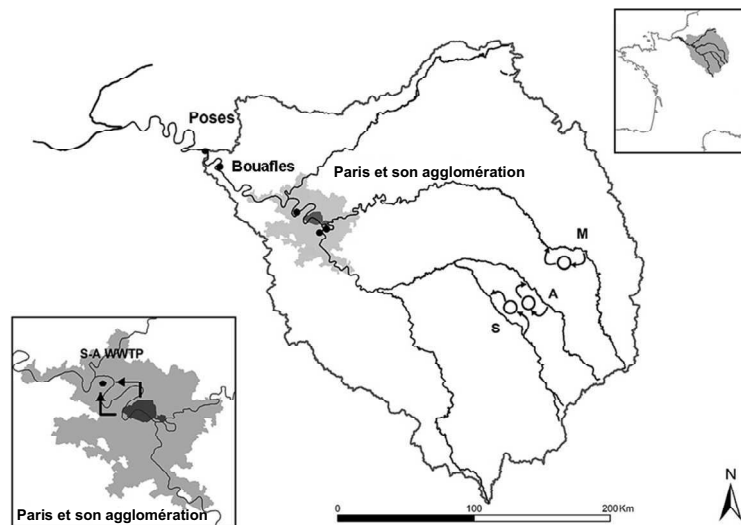


Figure 1: Carte du bassin de la Seine sur laquelle sont représentés Poses à l'embouchure du bassin, les 3 réservoirs sur la Marne (M), l'Aube (A) et la Seine (S), Paris et son agglomération (en gris clair), Paris intra muros (en gris foncé) et la station d'épuration Seine-Aval (S-A WWTP). D'après (Thévenot et al., 2007).

1.1.2 Concentration des métaux en Seine

Des sédiments prélevés sous forme de carottes ont permis de retracer l'évolution de la contamination métallique en Seine depuis 1935 (Figure 2) (Meybeck et al., 2007). Les facteurs d'enrichissement, calculés à partir du bruit de fond naturel, sont relativement élevés puisqu'ils atteignent jusqu'à 22 pour le Zn et 140 pour le Cd dans les années 60-70, ceci principalement à cause de rejets urbains et industriels importants, mais aussi à cause de la faible érosion du bassin qui limite l'effet de dilution des particules. Ces données de contamination dans les sédiments montrent également une décontamination progressive du bassin dès les années 70, en dépit d'une demande métallique française qui augmente de 1950 à 2000 pour le Cu, le Pb et le Zn et de 1950 à 1995 pour le Cd (Meybeck et al., 2007). De même, un suivi de contamination réalisé depuis 1979 dans les boues de la station d'épuration Seine Aval, qui permet d'illustrer l'apport en métaux des STEP dans le milieu, montre une décontamination exponentielle pour le Zn, le Cu, le Cd, le Pb et le Hg (Thévenot et al., 2009). Cette décontamination marquée est due à l'effet conjoint d'une désindustrialisation progressive du bassin, associée au changement des procédés industriels, au recyclage des eaux usées industrielles et au traitement des déchets toxiques.

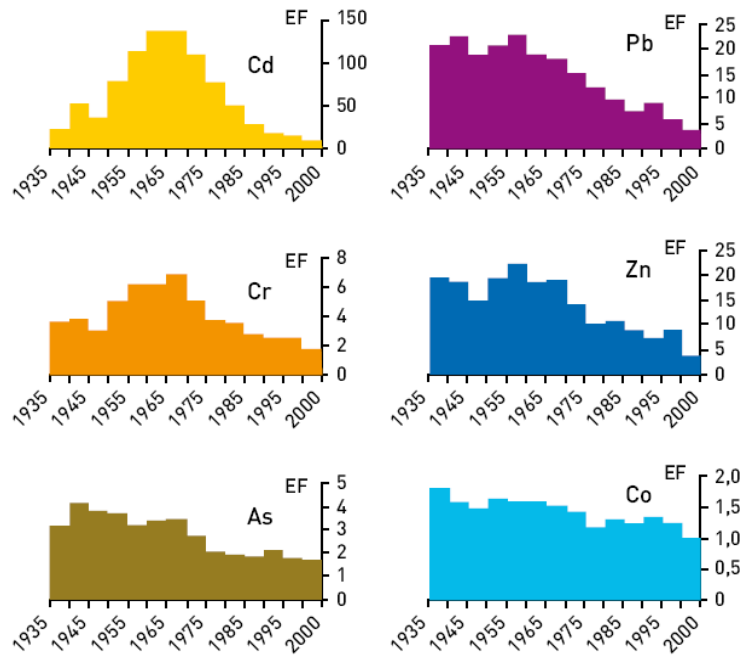


Figure 2: Evolution des facteurs d'enrichissement (EF) en métaux particuliers dans les carottes prises dans la plaine alluviale à Bouafles (site représentatif de la Seine à Poses i.e. en aval du bassin, sites représentés sur la Figure 1). EF = 1 pour les niveaux de référence non contaminés de 1935 à 2000 (Meybeck et al., 2007).

D'après les dernières données de contamination disponibles dans les sédiments (RNB 2006), les facteurs d'enrichissement calculés à partir du fond géochimique montrent que le bassin n'est globalement pas contaminé en Cr et Ni, moyennement contaminé en Cd, Cu, Pb et Zn et contaminé en Hg (Tableau 1). Cela dit, comme le montre la Figure 3, cette contamination n'est pas homogène sur le bassin. En effet, si on se réfère à l'indice de contamination multi-métallique (MCI⁴) une grande partie du bassin est peu contaminée (MCI entre 5 et 10), notamment au niveau des cours d'eau d'ordre de Strahler⁵ 3 ou 4, alors que sur certains sites, principalement en aval sur l'axe Seine où l'ordre de Strahler atteint 7, le MCI dépasse 30.

Bien que la contamination des particules et des sédiments du bassin de la Seine soit aujourd'hui bien plus faible que dans les années 60-70, les contaminations anciennes se retrouvent encore dans les sédiments ou dans les sols d'anciens sites industriels contaminés. La gestion de ces contaminations est problématique, notamment dans le cas de dragage, puisque le risque écologique dû à ces sédiments est finalement peu connu. Les sédiments, et plus particulièrement ceux des strates profondes, représentent une source importante de contamination dont le risque est potentiellement fort dans les

⁴ MCI (metal contamination index): somme des écarts relatifs pour chaque métal entre les teneurs mesurées dans l'échantillon et les teneurs naturelles théoriques. Pour le bassin de la Seine, selon le MCI la contamination sera très faible (1-5), faible (5-10), moyenne (10-20), forte (20-50), très forte (50-100) ou extrême (>100).

⁵ L'ordre de Strahler permet d'évaluer l'importance d'un cours d'eau en se basant sur le niveau de ramification du réseau hydrographique. Ainsi, l'ordre de Strahler du plus petit ruisseau est 1, puis, après sa ramification avec un autre ruisseau de niveau 1, la valeur 2 lui est attribuée. La Seine, après sa confluence avec l'Oise a un ordre de 7.

estuaires puisqu'une partie de ces métaux peut être transférée vers la colonne d'eau suite à leur remobilisation et leur éventuelle désorption lorsque la salinité augmente (Du Laing et al., 2009).

Tableau 1: Concentrations métalliques des sédiments en Seine ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$) en 2006 comparées au fond géochimique et facteur d'enrichissement associé.

	Cd	Cr	Cu	Hg	Ni	Pb	Zn
Concentrations moyennes des sédiments sur le bassin de la Seine en 2006 ^a	0,41	42	34	0,15	17	51	137
Fond géochimique ^b	0,22	40	15	0,015	16	20	60
Facteur d'enrichissement	2	1	2	10	1	3	2

^a: RNB 2006 (Réseau National de Bassin). Données collectées sur www.eau-seine-normandie.fr (banque de données de qualité des eaux).

^b: Piren Seine 2002 (Thévenot et al., 2002). Le niveau de fond naturel du bassin a été établi à partir d'une combinaison de plusieurs approches : l'analyse de petits bassins forestiers non contaminés, l'extrapolation de l'indicateur de pollution multi-métallique (MCI) lorsque celui-ci tend vers zéro et l'analyse de deux échantillons préhistoriques : l'un à Paris Bercy, l'autre dans l'estuaire.

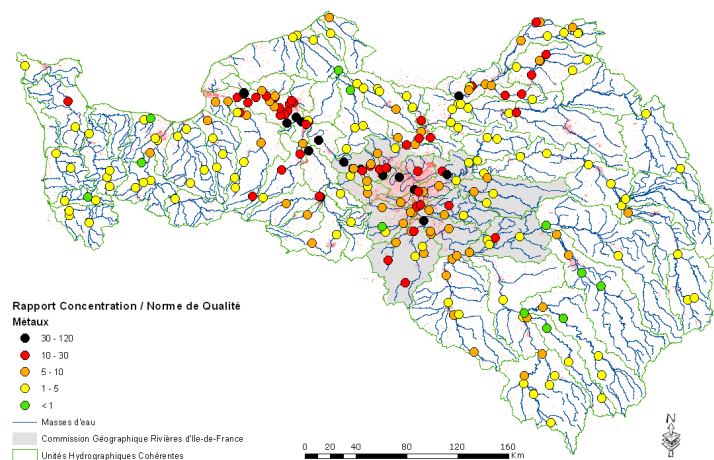


Figure 3: Contamination générale du Bassin Seine-Normandie dans les sédiments sur la période 2003-2005 représenté par le MCI (metal contamination index) calculé sur la base du Ni, du Cd, du Pb et du Hg. Un facteur de sécurité de 25% a été appliqué aux teneurs naturelles théoriques. Source: AESN.

1.1.3 Spéciation des métaux

Les métaux sont présents dans les systèmes aquatiques sous diverses formes chimiques qu'elles soient dissoutes ou particulaires; ces différentes formes correspondent à la

spéciation. En solution dans le milieu, les ions métalliques forment des complexes stables avec les ligands inorganiques (OH^- , Cl^- , CO_3^{2-} , HCO_3^- et SO_4^{2-}) ou organiques, si bien que l'ion libre hydraté représente une faible proportion du métal dissous. Le métal peut, par ailleurs, être présent sur les particules organiques ou inorganiques. Les métaux se fixent sur les groupements fonctionnels des particules, que ce soient des groupes OH dans le cas d'oxydes et d'argiles, des groupes COOH dans le cas des carbonates ou des groupes COOH, OH, NH_2 et SH dans le cas de matières organiques comme des débris biologiques.

Les acides humiques et fulviques figurent parmi les ligands organiques jouant un rôle fondamental dans la spéciation des métaux dissous. Les groupes fonctionnels de la matière organique sont principalement constitués de fonctions carboxyliques, hydroxyles et phénoliques ayant une affinité plus ou moins forte avec les ions métalliques. Autant les équilibres chimiques des métaux avec les ligands inorganiques sont relativement bien connus, autant les interactions avec les matières organiques restent plus complexes (Sigg et al., 2006). En effet, la structure des matières humiques ou fulviques ne peut être définie simplement. Ces matières, libérées par les organismes vivants ou résultants de leur décomposition, sont constituées d'un mélange complexe de différentes molécules telles que les phénols, les glucides ou les protéines. Elles ne peuvent, ainsi, pas être caractérisées par des constantes simples étant donné la multiplicité des sites de complexation et leurs interactions mutuelles. Ces matières sont d'ailleurs généralement définies et séparées à partir de critères opérationnels (i.e. extraction sur des résines non-ioniques puis séparation selon leur capacité à précipiter à $\text{pH}=1$) (Leenheer et al., 2000).

Ainsi, *in situ*, la spéciation des métaux reste difficilement évaluable; c'est pourquoi la quantification d'espèces chimiques séparément, est remplacée, en pratique, par des mesures de spéciation opérationnelle.

1.1.4 Réglementation

Les effets toxiques dus aux métaux ont fait l'objet de nombreuses études (Ramade, 2007; Rand, 1995). Ces effets dépendent de l'élément considéré, selon s'il est essentiel ou non. Un métal est considéré comme essentiel s'il intervient dans des réactions biochimiques au sein de l'organisme, c'est le cas par exemple du Zn qui intervient dans le fonctionnement de nombreuses enzymes (Tableau 2). Les métaux essentiels ont un effet positif dans une gamme de concentration donnée (i.e. gamme optimale), au-delà ils ont un impact toxique, et présents en trop faible concentration, des phénomènes de carence peuvent avoir lieu. Les métaux non essentiels, seront toxiques même à très faible dose. Certains de ces effets sur l'homme sont d'ailleurs parfaitement établis : perturbation du système nerveux par le mercure, saturnisme par le plomb, maladies des reins et des os dues au Cd ou encore maladie du pied noir à cause de l'arsenic. Certains métaux sont classés comme substances cancérigènes (Cd et As) ou probablement cancérigènes (Pb) par l'IARC (2010) (Agence International de Recherche sur le Cancer).

Le Tableau 2 liste certaines propriétés connues des métaux essentiels.

Tableau 2: Liste (non exhaustive) des éléments essentiels et non essentiels et exemples de propriétés des éléments connus pour leur essentialité (Le Goff et Bonnomet, 2004).

Métal	Propriétés connues	
Chrome (Cr)	Impliqué dans le métabolisme du glucose (insuline)	
Cobalt (Co)	Présent dans la vitamine B12 intervenant dans la formation de l'hémoglobine	
Cuivre (Cu)	Présent dans les cytochromes de l'hémocyanine, des molécules impliquées dans la respiration cellulaire	
Fer (Fe)	Présent dans l'hémoglobine pour le transport de l'oxygène	
Iode (I)	Présent dans la thyroxine et lié aux composants assurant le bon fonctionnement du système thyroïdien	
Métaux essentiels	Manganèse (Mn)	Rôle dans le métabolisme des sucres (pyruvate carboxylase) Impliqué dans la synthèse des acides gras et des glycoprotéines
	Molybdène (Mo)	Impliqué dans le transfert d'électrons La fixation de l'azote est aussi couplée à une réaction au molybdène
	Nickel (Ni)	Composant de l'uréase et fait donc partie du cycle du CO ₂
	Sélénium (Se)	Active la glutathion peroxydase pour l'élimination des radicaux libres Régulation des messages intracellulaires
	Vanadium (V)	Cofacteur d'enzymes impliquées dans le métabolisme énergétique Agent thérapeutique possible pour les diabètes
	Zinc (Zn)	Nécessite au fonctionnement des déshydrogénases, aldolases, isomérases, transphosphorylases, ARN et ADN polymérase, anhydrase carbonique, Cu-Zn superoxyde dismutase (et autres)
	Métaux non essentiels: Antimoine (Sb), Argent (As), Cadmium (Cd), Etain (Sn), Mercure (Hg), Plomb (Pb), Thallium (Tl)	

Afin de protéger la santé humaine et l'environnement, la directive cadre européenne (DCE 2008/105/CE) définit 33 substances prioritaires et associe à ces substances des seuils à ne pas dépasser. Parmi ces substances, 4 sont des métaux: le cadmium (Cd), le plomb (Pb), le mercure (Hg) et le nickel (Ni). Les normes de qualité environnementale (NQE) ont été fixées à partir de normes préexistantes pour l'eau et de données d'écotoxicité déjà existantes pour les organismes aquatiques. Dans le cas des métaux, elles se réfèrent à la contamination présente dans la phase dissoute, c'est-à-dire après filtration sur un filtre de porosité 0,45 µm (Tableau 3). De plus, une circulaire de 2007 fixe les NQE provisoires pour d'autres métaux que ceux listés dans la DCE à 1.4 µg.L⁻¹ pour le Cu, 0.3 µg.L⁻¹ pour le Co et 7.8 µg.L⁻¹ pour le Zn.

Les métaux, étant naturellement présents dans l'environnement, la directive autorise la prise en compte du bruit de fond géochimique (approche dite du risque ajouté), c'est-à-dire que le bruit de fond, estimé à partir de la composition des roches du bassin et des concentrations mesurées dans des sites exempts de contamination, est ajouté aux NQE. La somme du bruit de fond géochimique et de la NQE représente alors la concentration

maximale admissible par le milieu. Outre la difficulté de calculer avec exactitude le fond géochimique (puisque les sites exempts de toute pollution anthropogénique sont rares), cette approche fait l'hypothèse discutable que les organismes issus d'un site avec un fond naturel élevé réagiront de la même façon à un apport anthropique que ceux qui sont issus d'un site avec un fond naturel faible.

De plus, dans le cas des métaux, la directive fille de 2008 consent à prendre en compte les paramètres liés à la qualité de l'eau dans l'évaluation des NQE, comme la dureté et le pH. Dans les faits, ces considérations ont mené à la prise en compte de la concentration en CaCO_3 dans la détermination de la NQE du Cd uniquement. Ainsi, l'augmentation de la dureté de l'eau rehausse le seuil de la NQE du Cd (Tableau 3).

Enfin, bien que les NQE aient été initialement établies pour l'eau, la directive fille de 2008 propose aux Etats membres de définir puis d'appliquer des seuils dans le biote, sous réserve que les nouvelles NQE dans le biote donnent un niveau de protection au moins identique à celles déjà définies pour l'eau. Dans cette directive, seul le Hg s'est vu appliquer une NQE dans le biote en raison de son fort potentiel d'accumulation: dont le seuil a été fixé à $20 \mu\text{g.kg}^{-1}$ de poids frais, de l'espèce la plus appropriée (poissons, mollusque, crustacé...).

*Tableau 3: Normes de qualité environnementale (NQE) des métaux dissous dans les eaux de surfaces intérieures: rivières, lacs, canaux et réservoirs qui y sont reliés.
MA: moyenne annuelle. CMA: concentration maximale admissible.*

Élément	Dureté de l'eau (mg $\text{CaCO}_3\cdot\text{L}^{-1}$)	NQE-MA Eaux de surface intérieures ($\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)	NQE-CMA Eaux de surface intérieures ($\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)	Bruit de fond naturel en Seine ($\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) ⁶
Cd et ses composés	<40	≤ 0.08	≤ 0.45	0.01
	40 à <50	0.08	0.45	
	50 à <100	0.09	0.6	
	100 à <200	0.15	0.9	
	≥ 200	0.25	1.5	
Pb et ses composés		7.2	-	0.93
Hg et ses composés		0.05	0.07	-
Ni et ses composés		20	-	1.9

Les mesures de contamination dissoute effectuées en Seine en 2006 (RNO AESN) montrent des concentrations en Cd, Pb, Hg, Ni et Co inférieures aux NQE. Pour le Cu et le Zn, des données sont supérieures aux concentrations admises en certains points. Ainsi, au premier abord, les concentrations métalliques actuelles en Seine garantiraient globalement du bon état chimique. Cependant, quelques réserves peuvent être émises sur la conclusion du bon état chimique à partir de valeurs-seuil. En effet, les NQE peuvent susciter des interrogations lorsqu'il s'agit de prendre en compte (i) l'effet

⁶ Thévenot D.R., Lestel L., Tusseau-Vuillemin M.-H., Gonzalez J.-L. et Meybeck M. 2009 Les métaux dans le bassin de la Seine. Plaquette du programme Piren Seine.

chronique des substances sur l'environnement, (ii) l'effet cocktail du à la présence de nombreuses autres substances dans le milieu ou (iii) l'extrapolation aux communautés entières qui composent le milieu. Ainsi, même si des facteurs de sécurité sont appliqués aux NOEC⁷ utilisées pour établir les NQE et pallient en théorie à ces incertitudes, l'effet chronique d'un cocktail de substances sur les organismes, et plus globalement sur les écosystèmes, reste encore inconnu. Le suivi chimique, réalisé actuellement par des mesures ponctuelles dans l'eau, évalue la contamination métallique dissoute uniquement. Il ne permet donc pas d'évaluer le risque toxique, puisque:

- il ne prend pas en compte la contamination dans les particules, qui représentent pourtant une source de nourriture et de contamination pour plusieurs espèces aquatiques.
- les mesures des concentrations dissoutes ne renseignent pas sur les fractions assimilables par les organismes, c'est à dire des fractions biodisponibles. Cette notion de biodisponibilité est particulièrement importante dans le cas des métaux, car selon leur état chimique, les métaux vont avoir une interaction avec les organismes, et donc une toxicité, plus ou moins forte.

1.2 Outils de monitoring de la biodisponibilité

Les mesures ponctuelles réalisées dans le milieu aquatique ne rendent pas compte des variabilités temporelles et spatiales de la contamination et se heurtent au problème d'une mesure fiable de concentrations souvent faibles dans le milieu. Ainsi, des outils de monitoring ont été établis principalement dans le but de surmonter les difficultés liées à la mesure directe dans l'eau. Au-delà de la contamination métallique dissoute ou particulaire et de sa variation dans le milieu, l'enjeu consiste également à estimer les concentrations biodisponibles, c'est-à-dire, agissant sur les organismes.

On considère généralement que la fraction dissoute biodisponible comprend la forme métallique libre, les complexes inorganiques et une partie des complexes organiques (Figure 4). Ainsi, tout le métal n'est pas biodisponible et l'effet biologique dépend de sa forme chimique (Buzier et al., 2006). Il est donc essentiel de déterminer la spéciation d'un métal donné pour pouvoir mieux appréhender l'effet toxique.

Nous allons ici développer deux outils de monitoring pouvant être complémentaires:

- des mesures chimiques de spéciation via l'utilisation de capteurs passifs. Les capteurs passifs de métaux, les DGT, (Gradient de diffusion en couche mince) permettent d'échantillonner les fractions en solution dites labiles, c'est-à-dire facilement échangeables.
- des mesures de bioaccumulation dans des espèces aquatiques modèles. Cette technique présente l'avantage, par rapport à la DGT, d'intégrer la contamination dans les particules (selon l'espèce considérée) mais également d'intégrer la variabilité biologique de l'organisme; ce qui lui confère un intérêt particulier dans

⁷ No Observed Effect Concentration.

l'évaluation de l'état de santé des écosystèmes, mais qui complexifie également l'interprétation des données de bioaccumulation en termes de contamination du milieu.

1.2.1 La technique du gradient de diffusion en couche mince: DGT

La détermination de la spéciation étant complexe, notamment en présence de matière organique, la technique du gradient de diffusion en couche mince (DGT) s'est largement développée (Davison et Zhang, 1994). Cet outil permet d'échantillonner les métaux labiles, c'est-à-dire, facilement échangeables, de façon sensible, intégrative et multi-élémentaire. La DGT est composée d'une résine Chelex qui va fixer les métaux de façon irréversible suite à leur migration à travers un gel diffusif. Plusieurs études ont été menées afin de valider l'utilisation de la DGT comme outil de prédiction de la biodisponibilité, notamment chez le bryophyte (Ferreira et al., 2008), le gammare (Pellet et al., 2009), la daphnie (Tusseau-Vuillemin et al., 2004) ou encore les plantes (Degryse et al., 2009). On obtient généralement une meilleure estimation de la fraction biodisponible par la fraction labile évaluée par DGT que par la fraction en métal dissous. A des concentrations toxiques (et donc élevées), dans le cas du Cu et du Cd, la concentration en métal labile surestime généralement la concentration biodisponible (Tusseau-Vuillemin et al., 2004). En revanche, à des niveaux de concentration plus réalistes la concentration bioaccumulable est légèrement sous-estimée par une mesure du Cu labile (Ferreira et al., 2008). Cependant cette technique ne permet pas de rendre compte des éventuels cations compétiteurs qui pourraient modifier l'influx de métal dans l'organisme (Ferreira, 2009). Et tout aussi pratique que soit l'utilisation de la DGT, elle ne rend pas non plus compte de la biodisponibilité des métaux particulaires.

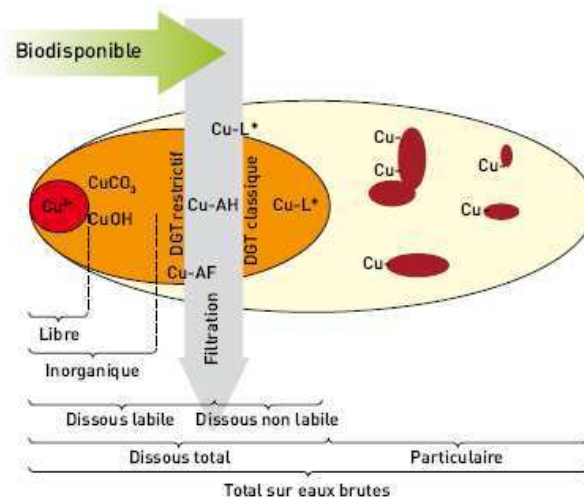


Figure 4: Schéma de spéciation des métaux dans le milieu aquatique (cas du cuivre). La distinction entre les métaux dissous et particulaires se fait par filtration sur $0.45\mu\text{m}$. Par la technique DGT, les métaux labiles sont accumulés de façon irréversible dans la résine après diffusion à travers un gel (restrictif ou non restrictif). L'épaisseur de la flèche grise symbolise la fluctuation de la frontière entre dissous labile et dissous non labile. (Thévenot et al., 2009).

1.2.2 Le biomonitoring

Les programmes de biomonitoring, assurant un suivi de la contamination dans les tissus d'organismes modèles, ont été mis en place afin de surveiller la qualité des milieux aquatiques mais aussi de prévenir de toute contamination accidentelle (Ramade, 2007). Les organismes modèles utilisés sont généralement des espèces qui présentent des facteurs de bioconcentration particulièrement élevés. Parmi les invertébrés aquatiques, les bivalves sont souvent privilégiés puisqu'ils présentent des facteurs de concentration élevés, en relation avec leur forte activité de filtration. Les caractéristiques d'une bonne espèce bioindicatrice ont été définies par Phillips (1980). Cette espèce doit, dans l'idéal, être largement répandue, être résistante aux contaminations et avoir la capacité d'accumuler les contaminants de façon proportionnelle à la contamination du milieu.

Mytilus edulis est un bivalve largement utilisé pour la surveillance de la qualité des eaux côtières dans le cadre, notamment, du programme RNO (Réseau National d'Observation) de l'Ifremer et le Mussel Watch Program (Beliaeff et al., 1997; Gunther et al., 1999). De nombreuses chroniques de bioaccumulation à la fois spatiales et temporelles sont disponibles pour cette espèce. Ces chroniques, notamment dans l'estuaire de la Seine, permettent de montrer une diminution de la contamination métallique des tissus (Figure 6) en relation avec les chroniques de contamination métallique réalisées dans les sédiments du bassin de la Seine (Thévenot et al., 2009). Il n'y a actuellement pas d'équivalent pour les milieux aquatiques continentaux, bien qu'en eau douce, les dreissènes (ou moules zébrées) aient démontré leur valeur quant à leur utilisation pour le biomonitoring (Bervoets et al., 2005). La dreissène a, en effet, de nombreux avantages en tant que bioindicateur: c'est une espèce largement répandue, sédentaire, facile à collecter et à manipuler. De plus, de par son activité de filtration, elle accumule les contaminants biodisponibles, présents à la fois dans la phase dissoute et particulaire. Des facteurs de bioaccumulation de 640 000 ont été rapportés dans le cas du Cd⁸ (Roditi et al., 2000b).

La dreissène est un bivalve d'eau douce d'origine russe (Figure 5). Cette espèce invasive est présente dans les différents réseaux hydrographiques français. Elle a été découverte pour la première fois en Seine en 1867 par Blanche (1867). Bien que cette espèce soit sédentaire une fois adulte, la dissémination des larves et la phorésie (fixation des dreissènes sur les bateaux) ont conduit à la colonisation de nombreux espaces. En Seine, le flux larvaire peut atteindre jusqu'à 10^{14} individus.jour⁻¹, c'est-à-dire une concentration estimée à 5000 individus.L⁻¹ (Akopian et al., 2001), ce qui reflète l'existence d'une grande population d'adultes.

La prolifération de cette espèce a causé de nombreux problèmes, tant écologiques qu'économiques (i.e. problèmes techniques causés par le colmatage des circuits d'eau). De plus, sa grande capacité de filtration (en moyenne 100 ml.individus⁻¹.h⁻¹ (Reeders et

⁸ Dans cette étude le facteur de bioaccumulation a été calculé comme le rapport entre la concentration métallique dans les tissus et la concentration totale (comprenant les métaux dissous et particulaires).

al., 1989) a conduit à la modification biogéochimique des systèmes colonisés (Mackie, 1991). Reeders (1989) estime d'ailleurs que la capacité de filtration des dreissènes des lacs IJsselmeer et Markermeer au Pays-Bas est suffisante pour filtrer les deux lacs au moins 1 à 2 fois par mois. De nombreuses études sur son impact écologique ont donc été menées (Leah, 1993) puisque l'effet conjoint de sa prolifération et de sa capacité de filtration entraîne une baisse de la concentration en phytoplancton et donc de l'activité photosynthétique; ce qui se traduit par une diminution de la concentration en oxygène dans le milieu (Stańczykowska et Lewandowski, 1993).



Figure 5: Photo de *Dreissena polymorpha* (Voets, 2008).

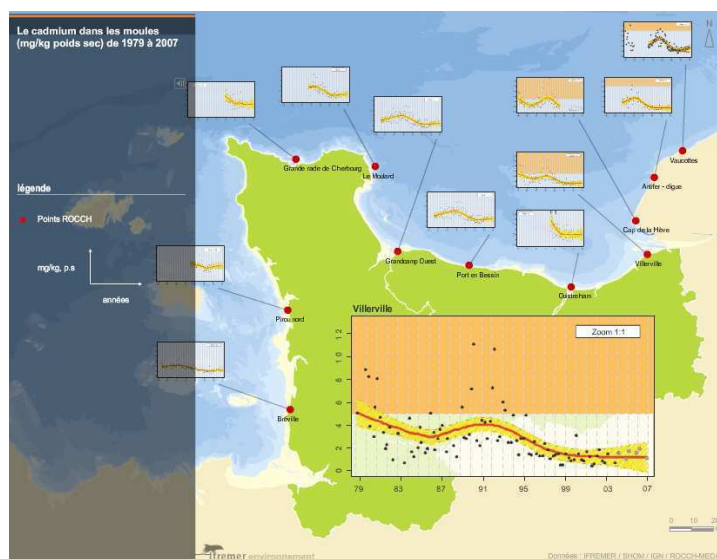


Figure 6: Chronique de contamination par le cadmium dans les tissus de *Mytilus edulis* sur différents points de Basse Normandie et plus particulièrement à Villerville dans l'estuaire de la Seine entre 1979 et 2007. Source: RNO Ifremer.

La dreissène, par son caractère invasif et fortement impactant sur le milieu aquatique, est une espèce à la fois largement répandue et largement étudiée et donc relativement bien connue. Cette espèce présente ainsi de nombreux avantages quant à son utilisation dans les programmes de biomonitoring.

Si les chroniques du RNO (Figure 6) permettent d'observer des tendances générales, l'expérience des moules marines a montré la difficulté d'interpréter des données de bioaccumulation sur une échelle de temps plus réduite (Andral et al., 2004; Casas et al.,

2008). En effet, les mécanismes de bioaccumulation sont modulés à la fois par des facteurs biotiques et abiotiques (cf Chapitre 1:3 Facteurs influençant la bioaccumulation) qu'il est nécessaire de quantifier afin de pouvoir comparer des données de biomonitoring issues de sites différents et collectées à différentes saisons. Dans le cas des dreissènes, comme le montrent Bervoets et al. (2005), les indicateurs classiques tels que le BCF⁹ ou le BAF¹⁰, ne permettent pas de relier directement la contamination du milieu (dissoute ou dans les sédiments) à celle des organismes. Ils soulignent également l'avantage d'utiliser des modèles cinétiques de bioaccumulation, dans lesquels on considère à la fois la contamination dissoute et la contamination particulaire, pour avoir une vision plus complète des mécanismes de bioaccumulation et pouvoir ainsi établir ce lien.

2. MECANISMES DE BIOACCUMULATION DES METAUX

En milieu aquatique, chez les bivalves, l'accumulation est la résultante de deux processus: l'apport par voie dissoute et par voie trophique. Ainsi, l'entrée des métaux dans les organismes se fait principalement au niveau de deux barrières biologiques: la membrane plasmique des branchies et la paroi du tractus digestif.

2.1 Interaction des métaux dissous avec les organismes aquatiques

Différents mécanismes ont été proposés pour expliquer l'entrée des métaux dans la cellule (Luoma, 1983; Simkiss et Taylor, 1995; Tessier et al., 1994):

- la liaison des métaux à des protéines membranaires de transport
- le passage des métaux par des canaux membranaires selon un gradient de concentration
- la diffusion passive des formes lipophiles des métaux
- l'endocytose, qui interviendrait majoritairement au niveau de la barrière intestinale (Depledge et Rainbow, 1990)

De part la nature hydrophobe de la membrane plasmique, seules les molécules neutres ou non-polaires ont la capacité de franchir cette barrière par simple diffusion passive (selon un gradient de concentration entre le milieu intérieur et extérieur, et selon le coefficient de partage entre l'eau et la phase lipidique). En ce qui concerne les métaux, ce type de transfert correspond à certaines formes très spécifiques (qui font d'ailleurs exception au modèle de l'ion libre) telles que le méthylmercure, les complexes métalliques à base de dithiocarbamate ou les complexes neutres d'AgCl. En effet, la majorité des espèces métalliques sont hydrophiles et leur transport à travers la membrane, à partir de la phase dissoute, se ferait via des protéines spécifiques. On considère généralement que c'est l'ion métallique libre qui traverse la membrane

⁹ Ratio entre la concentration en contaminant dans les tissus et la concentration dissoute dans le milieu.

¹⁰ Ratio entre la concentration en contaminant dans les tissus et la concentration dans les sédiments.

biologique suite à sa fixation sur ces protéines spécifiques. Ce mécanisme a été formalisé dans le modèle de l'ion libre (le FIAM) afin d'évaluer la toxicité des métaux (Morel, 1983).

D'après le FIAM, le métal, libre ou sous forme complexée, diffuse du milieu extérieur vers la surface des organismes. Le métal va ensuite réagir avec un site présent sur la membrane biologique. S'ensuit généralement la phase d'internalisation. La capacité du métal à se lier aux sites membranaires, à être internalisé puis à exercer son effet biologique, va dépendre de nombreux paramètres tels que la nature chimique du composé, l'organisme considéré et les conditions physico-chimiques du milieu au voisinage de la membrane (pH, concentration en ligands et en métaux...).

Dans le FIAM, l'internalisation est l'étape limitante. Ainsi, le processus global se résume à un équilibre thermodynamique entre le métal présent en solution et le métal lié à des sites spécifiques de la membrane biologique (Morel, 1983). Bien que l'hypothèse de l'équilibre thermodynamique soit remise en question dans un milieu naturel où la concentration en métal est faible et constamment en évolution, les modèles tels que le FIAM et le BLM (modèle du ligand biologique) se sont généralement montrés très performants dans l'évaluation de la biodisponibilité et de la toxicité des métaux.

Le FIAM, schématisé sur la Figure 7, repose sur plusieurs hypothèses (Morel, 1983):

- l'effet biologique est proportionnel à la quantité de métal en interaction avec les sites membranaires et proportionnel à la concentration en ions libres
- l'internalisation est l'étape limitante; le métal est en équilibre avec les ligands de la solution et les ligands biologiques
- le nombre total de sites est grand devant le nombre de sites occupés par le métal
- l'interaction du métal avec la membrane n'altère pas les propriétés de celle-ci

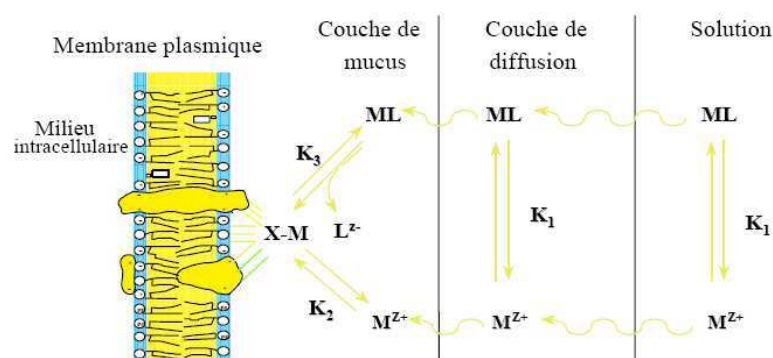


Figure 7: Schéma d'interaction des métaux avec la membrane plasmique (FIAM).
D'après Campbell (1995).

Des cas d'exception au FIAM ont été reportés et concernent plus particulièrement les propriétés de la membrane plasmique. La membrane, biologiquement active, peut contrôler l'importance des flux métalliques selon les besoins de l'organisme. Ainsi, la

régulation cellulaire, et plus précisément la modification des systèmes de transport membranaire, peut affecter directement l'internalisation des métaux et donc leur biodisponibilité. Les organismes ont de nombreux systèmes de transport membranaire dépendants de leur environnement. Les transporteurs Zrt1 (impliqué dans le transport du Zn et du Fe chez les levures) peuvent être induits par une faible concentration en zinc puis être dégradés via le système des ubiquitines¹¹ lorsque la concentration en Zn augmente (Gitan et al., 1998). De même, d'après Slaveykova *et al.* (2003), une modification de la perméabilité de la membrane due à l'adsorption d'acides fulviques pourrait expliquer l'augmentation de l'influx de Pb en présence de cette matière organique alors que Pb²⁺ diminue avec l'augmentation en acides fulviques.

Alors que les sites de transport ont souvent une grande affinité pour les métaux, ils ne sont en général pas très sélectifs. En effet, un des mécanismes classiques de toxicité est la liaison du métal toxique à un site d'un métal essentiel ayant un rayon ionique ou une géométrie de coordination semblable. En raison de leurs analogies chimiques, le Cd va par exemple entrer dans la cellule à la place du Zn et AsO₄³⁻ à la place de PO₄³⁻. Ainsi, de nombreux ions présents dans le milieu (Mg²⁺, Na⁺, Ca²⁺, H⁺...) seront susceptibles d'entrer en compétition avec les métaux traces. Le modèle du ligand biologique (BLM) (Di Toro et al., 2001) repose sur les mêmes fondements que le FIAM. Il considère en plus les interactions des cations majeurs et de la matière organique avec les métaux. Ce modèle a été développé dans de nombreuses études afin de prédire l'effet d'un métal sur un organisme donné (De Schamphelaere et Janssen, 2002; Kozlova et al., 2009). Généralement, ces études montrent un effet protecteur des cations et de la matière organique. Ainsi, l'US EPA (United States Environmental Protection Agency) a récemment intégré le BLM dans sa réglementation sur la contamination chimique afin de prendre en compte les diverses géochimies des milieux naturels. De même, l'effet protecteur du calcium vis-à-vis du cadmium (Qiu et al., 2005) a été pris en compte dans la Directive Cadre sur l'Eau afin d'ajuster les normes de qualités environnementales (NQE) à la dureté de l'eau.

Les modèles BLM ont majoritairement été élaborés à partir de tests de toxicité aiguë (EC₅₀) (Clifford et McGeer, 2009; Heijerick et al., 2002; Santore et al., 2002). Cette approche suppose la détermination des réponses biologiques sur une large échelle de concentration (plusieurs ordres de grandeur) souvent irréaliste par rapport aux concentrations environnementales. Selon la concentration d'exposition, les ligands biologiques peuvent subir des modifications (Gitan et al., 1998). Ainsi, les constantes du BLM déterminées pour un couple métal/organisme sont susceptibles de ne plus être les mêmes selon la concentration d'exposition. Dans quelques cas, ce modèle a été établi à partir des flux d'internalisation des métaux (Ferreira et al., 2009; Jansen et al., 2002) ou des données de bioaccumulation (Kola et al., 2004). Dans l'approche basée sur les flux d'internalisation, on suppose l'effet biologique directement proportionnel au métal traversant la membrane biologique, par opposition au métal internalisé. Autant cette hypothèse semble raisonnable dans le cas de tests de toxicité aiguë, autant dans le cas

¹¹ Petite protéine marquant d'autres protéines cibles à détruire.

d'effet chronique elle est susceptible de ne pas être valide (De Schamphelaere et Janssen, 2004a; De Schamphelaere et Janssen, 2004b). En effet, l'influx ne pourra refléter l'effet biologique qu'en considérant qu'il n'y a pas d'élimination et que la totalité du métal internalisé est sous une forme biologiquement active (i.e. non stockée sous forme détoxifiée).

De plus, les modèles du FIAM et du BLM sont appliqués à l'équilibre, c'est-à-dire que les échanges au niveau de la couche de diffusion sont rapides et que l'étape d'internalisation est limitante. Or, plusieurs exceptions ont été reportées chez des algues (Fortin et Campbell, 2000; Hassler et Wilkinson, 2003). En effet, si c'est la diffusion du métal vers la membrane qui est limitante (ce qui peut être engendré par une concentration métallique très faible dans le milieu), le flux d'entrée ne sera plus fonction de la capacité du métal à se lier au ligand biologique mais à sa capacité de diffusion. Cette couche limite de diffusion tend cependant à être réduite pour les organismes plus conséquents notamment par la nage et l'activité de filtration (Karp-Boss et al., 1996).

2.2 Bioaccumulation par voie trophique

Les bivalves, par leur activité de filtration, ingèrent des particules (algues, bactéries, particules organiques) qui vont être acheminées vers le système digestif. L'ingestion des particules, et des métaux qui y sont adsorbés ou absorbés, est régie par des phénomènes complexes. Les bivalves associent une digestion extracellulaire intestinale (voie courte) et une digestion intracellulaire via la glande digestive (voie longue) (Decho et Luoma, 1996) (Figure 8). Les particules subissent un tri complexe au niveau de l'estomac, entraînant une partie de ces particules vers la glande digestive pour une digestion prolongée (Meyer et al., 2005). Ce tri est basé non seulement sur la taille des particules, sur leur qualité nutritive mais aussi sur leur quantité. Ainsi, des particules riches, du point de vue nutritif comme des algues, sont en premier lieu digérées dans l'estomac où, membrane et fraction cytosolique sont séparées. Les débris de membrane sont alors rapidement déféqués tandis que la fraction cytosolique subit une endocytose par les cellules de la glande digestive. Ainsi, selon les mécanismes mis en jeu lors de la digestion des particules, les métaux seront plus ou moins internalisés. Ceci explique d'ailleurs le lien qui existe entre la fraction métallique internalisée et la répartition des métaux dans les algues (i.e. plus la proportion de métal présent dans le cytoplasme sera importante plus l'assimilation sera élevée) (Reinfelder et Fisher, 1991). Chez *Mytilus edulis*, l'internalisation élevée des métaux particuliers, observée à faible concentration de nourriture provient d'une digestion intracellulaire accrue (Wang et al., 1995).

Les métaux particuliers ingérés sont internalisés par divers mécanismes au niveau de l'épithélium: les métaux traversent la barrière intestinale selon les mêmes mécanismes que ceux présentés pour la voie dissoute (après solubilisation par le liquide intestinal) ou sont internalisés par endocytose des particules ingérées (digestion intracellulaire via les lysosomes) (Figure 9). L'internalisation des métaux à travers l'intestin débute par leur

diffusion à travers une couche de diffusion suivie par leur liaison aux protéines du mucus tapissant l'épithélium intestinal (Meyer et al., 2005). L'internalisation des métaux adsorbés sur le mucus se fait par diverses protéines présentes à la fois sur la partie apicale et basolatérale de l'épithélium. Le mucus joue un rôle important dans l'absorption des métaux. En effet, il pourrait constituer une barrière vis-à-vis de certains métaux comme le Cd, le Zn ou le Cu (Handy et al., 2000).

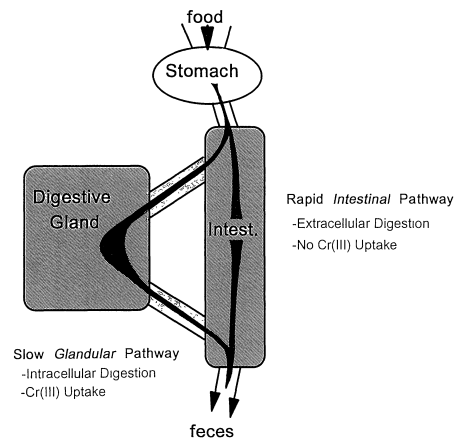


Figure 8: Schéma des deux voies digestives chez les bivalves. Les bivalves possèdent une voie intestinale rapide (digestion extracellulaire) généralement moins efficace en termes d'assimilation du carbone. Une fraction des particules est sélectionnée pour être digérée via une voie plus lente dans la glande digestive (digestion intracellulaire). D'après Decho et Luoma (1996).

Dans la plupart des normes et réglementations, la toxicité des métaux par voie trophique n'est pas prise en compte, en partie à cause des contradictions qu'il y a eu entre les différentes études réalisées dans les années 70-80, concernant l'importance relative des voies dissoute et trophique. En effet, bien que certaines études aient montré une accumulation via la nourriture (Young, 1975), la majorité des études n'ont pas permis de quantifier la prise de métal (Dewitt et al., 1989), conduisant ainsi à des conclusions souvent ambiguës. De plus, dans la majorité des cas, les études sur le transfert des métaux par voie trophique s'attachaient plus particulièrement à savoir s'il y avait ou non biomagnification, l'hypothèse étant qu'en l'absence de biomagnification, l'exposition via la nourriture n'était, a priori, pas préoccupante. Or, pour la grande majorité des métaux – exception faite du méthyle mercure – la biomagnification n'a pas été observée (Suedel et al., 1994).

Quelques années plus tard, la mise en place de nouveaux protocoles a permis une évaluation fine des constantes d'accumulation par voie trophique (Wang et Fisher, 1996). En parallèle, différentes études réalisées *in situ* ont établi un lien entre l'accumulation par voie trophique et la croissance (Woodward et al., 1994) et/ou la reproduction des organismes (Hornberger et al., 2000). Bien qu'il ait été difficile d'établir ce lien de façon univoque, étant donné l'ensemble des conditions inhérentes aux études terrain, il a été montré le besoin de mieux comprendre le rôle de la voie trophique. Plusieurs études ont

ainsi quantifié l'efficacité d'assimilation¹² (AE) et ont calculé l'importance de la voie trophique et de la voie dissoute. En général, la voie trophique qui représente de 10% à 100% de la prise de métal varie selon le métal, la nourriture et l'organisme considéré. Chez la dreissène, cette voie est prédominante pour le Cd, l'Ag et le Hg (Roditi et al., 2000b).

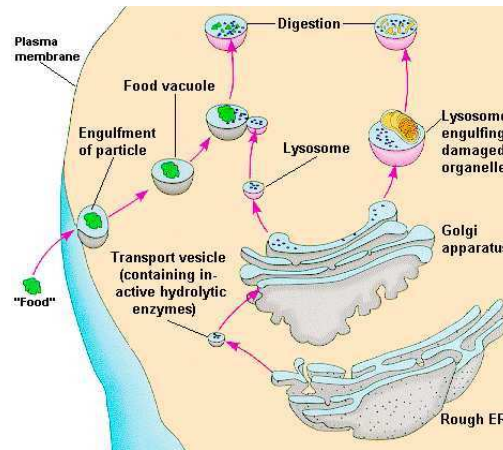


Figure 9: Fusion des vésicules endocytiques avec les lysosomes. Les lysosomes digèrent les matières absorbées par la cellule et recyclent les déchets intracellulaires. Durant l'endocytose, la cellule enferme la nourriture dans la vacuole formée par invagination de la membrane plasmique. Cette vacuole nutritive fusionne avec un lysosome, et les enzymes hydrolytiques digèrent le contenu. Après l'hydrolyse des macromolécules, les divers monomères traversent la membrane lysosomiale en entrent dans le cytosol.

2.3 Mécanismes d'internalisation

Suite à l'internalisation des métaux, différents systèmes de défense sont mis en jeu dans la cellule, comme la liaison des métaux à des agents complexants, la séquestration (dans les lysosomes ou les granules) et l'élimination (Phillips et Rainbow, 1989).

La liaison intracellulaire est un mécanisme de protection qui diminue la biodisponibilité des métaux toxiques par complexation à différents types de chélateurs (i.e. glutathion, méthalothionéine MT, acides aminés) (Roesijadi et Robinson, 1994). Ces chélateurs, très diversifiés, présentent généralement une grande affinité pour les métaux de part leur richesse en groupements thiols. Conjointement à ces phénomènes de complexation, la séquestration des métaux dans les lysosomes ou sous forme de granules est une voie majeure de stockage et de détoxification. Cette voie peut concerner à la fois les métaux accumulés par voie dissoute comme ceux internalisés par endocytose par les cellules épithéliales des branchies, du manteau ou du système digestif. Dans le cas des lysosomes, la complexation des métaux avec les MT favorise leur accumulation dans ces organites. Dans d'autre cas, les métaux précipitent sous forme de granules insolubles (Brown, 1983). Les métaux, qu'ils soient sous forme libre ou complexée, sont ensuite

¹² L'efficacité d'assimilation correspond à la quantité de métal internalisé par rapport à la part ingérée.

acheminés vers les organes de stockage (principalement le rein et l'hépatopancréas) ou excrétés (via les reins et les fèces).

Le lien entre la bioaccumulation et la toxicité est donc complexe puisque la totalité du métal accumulé n'est pas forcément sous une forme biologiquement active (Wallace et al., 2003). En effet, alors qu'une fraction du métal peut agir sur des cibles sensibles, une fraction peut être présente dans l'organisme sous forme détoxifiée. Ainsi, selon Rainbow (2002) l'effet toxique apparaît lorsque la concentration en métal biodisponible dans l'organisme dépasse les seuils conjoints d'élimination et d'excrétion. Si la bioaccumulation donne une information limitée de la toxicité des contaminants sur les organismes, en temps que première réponse biologique à la contamination chimique biodisponible, elle est en revanche un bon indicateur de l'exposition chimique d'un organisme à un contaminant.

3. FACTEURS INFLUENÇANT LA BIOACCUMULATION

Le lien entre la bioaccumulation et la contamination peut être complexe car influencée par la biodisponibilité des métaux, elle-même influencée par la physico-chimie du milieu. Par ailleurs, le cycle biologique de l'organisme, qui est, notamment dans le cas des bivalves ponctué par la ponte, module également ce lien.

3.1 Physico-chimie du milieu environnant

3.1.1 Physico-chimie de l'eau

Les influences de différents facteurs physico-chimiques sur la bioaccumulation des métaux chez plusieurs invertébrés sont regroupées dans le Tableau 4. De nombreuses études montrent le rôle de la température, de la dureté, de la matière organique ou des interactions entre métaux.

Tableau 4: Influence de différents paramètres physico-chimiques de l'eau sur la bioaccumulation des métaux chez différents invertébrés. HA : acides humiques. COD : carbone organique dissous.

Facteurs	Animal	Métal	Influence	Auteurs
Température	<i>Gammarus pulex</i>	Cd	Augmente légèrement la bioaccumulation	(Pellet et al., 2009)
	<i>Corbicula fluminea</i>	Cd	Augmente la bioaccumulation	(Frayse et al., 2000)
	<i>Dreissena polymorpha</i>	Cd	Augmente la bioaccumulation	
Alcalinité et dureté	<i>Daphnia magna</i>	Cd Zn	Diminue la bioaccumulation	(Tan et Wang, 2008)
	<i>Lymnea stagnalis</i>	Cu Cd	Diminue la bioaccumulation du Cd mais augmente celle du Cu	(Croteau et al., 2007)
	<i>Daphnia magna</i>	Ni	Diminue la bioaccumulation	(Kozlova et al., 2009)
	<i>Corbicula fluminea</i>	Cd Zn	Diminue la bioaccumulation	(Qiu et al., 2005)
Sodium	<i>Lymnaea stagnalis</i>	Cu	Augmente la bioaccumulation	(Croteau et Luoma, 2008)
Matière organique	<i>Daphnia magna</i>	Cd Cr	Augmente, diminue ou n'a pas d'influence sur la bioaccumulation (selon la concentration et le temps d'exposition)	(Stackhouse et Benson, 1989)
	<i>Gammarus pulex</i>	Cd	Diminue ou n'a pas d'effet sur la bioaccumulation (selon la concentration en HA)	(Pellet et al., 2009)
	<i>Dreissena polymorpha</i>	Cd	Diminue la bioaccumulation	(Voets et al., 2004)
	<i>Dreissena polymorpha</i>	Cd	Augmente la bioaccumulation	(Roditi et al., 2000a)
	<i>Mytilus edulis</i>	Cd	Augmente la bioaccumulation	(George et Coombs, 1977; Pempkowiak et al., 1994)
	<i>Uronema</i>	Cu	Diminue la bioaccumulation	(Lores et al., 1999)
Interaction entre métaux	<i>Anodonta cygnea</i>	Zn - Cd	Zn diminue la bioaccumulation de Cd	(Hemelraad et al., 1987)
	<i>Daphnia magna</i>	Zn - Ni, Cd	Zn diminue légèrement la bioaccumulation de Ni et Cd	(Komjarova et Blust, 2008)
Pression partielle en oxygène	<i>Corbicula fluminea</i>	Cd	Diminue la bioaccumulation	(Tran et al., 2001)

3.1.2 Propriétés physico-chimiques des particules

La biogéochimie des particules influence la répartition des métaux au sein des particules et, par conséquent, leur accumulation par les organismes. Les propriétés chimiques de la nourriture ont récemment été étudiées afin de mieux caractériser la biodisponibilité des métaux par voie trophique. En découlent de nombreuses approches expérimentales dans lesquelles on cherche à décrire la "labilité" et la biodisponibilité des métaux fixés sur les particules.

Les sulfures sont, par exemple, un des paramètres jouant sur la distribution et sur la biodisponibilité des métaux particuliers (Di Toro et al., 1990). Le modèle AVS-SEM a ainsi été proposé par Di Toro (1992) afin de prédire la toxicité des métaux présents dans les sédiments. Les AVS (Acid Volatile Sulfides) sont définis comme la quantité de sulfures volatilisés par l'addition de 1N HCl et les SEM (Simoultaneously Extracted Metals) comme les métaux associés aux AVS. Ce modèle repose sur le concept suivant : lorsque la concentration en AVS dans les sédiments dépasse les SEM ($SEM < AVS$) les métaux sont liés aux sulfures et l'eau interstitielle n'est pas toxique. A l'inverse si $SEM > AVS$, les métaux, alors libérés dans l'eau interstitielle, seront potentiellement toxiques. Autant ce modèle a été validé pour des tests de toxicité (Di Toro et al., 1992; Di Toro et al., 1990), autant le lien entre AVS et bioaccumulation reste encore flou, principalement parce que l'accumulation dépend également du comportement alimentaire de l'organisme (De Jonge et al., 2010).

La biodisponibilité des métaux particuliers est fonction de la composition organique et inorganique de la nourriture (Arifin et Bendell-Young, 2000), mais également de la répartition des métaux au sein même des fractions organiques (Reinfelder et Fisher, 1991). Ainsi, les métaux du cytoplasme présentent généralement une biodisponibilité et donc une efficacité d'assimilation plus importante (Meyer et al., 2005), alors que la séquestration des métaux dans des granules, rend généralement ces métaux non assimilables par leurs prédateurs (Wallace et Lopez, 1996). Récemment une nouvelle approche s'est développée afin de mieux faire le lien entre la distribution des métaux et la toxicité : le SPM (Subcellular Partitioning Model). Cinq fractions, dans lesquelles les métaux sont susceptibles d'être répartis, sont définies : les granules riches en métaux (MRG : Metal-Rich Granules), les débris cellulaires, les organites (i.e. noyaux, fraction mitochondriale et microsomale), les protéines sensibles à la chaleur (i.e. enzymes) et les protéines résistantes à la chaleur (i.e. les métalothionéines MT) (Wang et Rainbow, 2006). Des recherches ont besoin d'être menées afin de mieux comprendre les mécanismes qui conditionnent cette répartition. Cependant ce type d'approche pourrait être utilisé afin de caractériser les métaux disponibles dans le maillon proie-prédateur (Wallace et Luoma, 2003). Wallace et Luoma (2003) ont étudié la répartition du Cd et du Zn chez le bivalve *P. amurensis* et les conséquences trophiques sur son prédateur, la crevette *P. macrodactylus*. La crevette, nourrie avec le bivalve contaminé en ^{109}Cd , a absorbé environ 60% du Cd ingéré. Or 60% du Cd de la nourriture était dans la fraction disponible (TAM : Trophically Available Metal), définie ici comme la fraction contenant les organites, les protéines sensibles à la chaleur et les MT. Ces résultats, mis en relation avec des études précédentes (Wallace et al., 1998), ont montré une relation 1:1 entre l'assimilation du Cd chez le prédateur et le pourcentage de Cd dans la fraction disponible de la proie (Figure 10).

Des protocoles d'extraction séquentielle ont également été proposés (Pueyo et al., 2001; Tessier et al., 1979) afin de caractériser la contamination métallique particulière. Quatre fractions sont extraites avec différents réactifs chimiques : la phase échangeable contenant les métaux adsorbés, les carbonates et les oxydes de Mn amorphes, la phase

réductible contenant les oxydes de Fe et de Mn, la phase oxydable contenant la matière organique et les sulfures et la phase résiduelle contenant les minéraux non-silicates. Quelques études ont comparé les métaux contenus dans ces différentes phases à l'assimilation par des organismes, ou même à la fraction métallique extraite à partir du liquide digestif des organismes (Fan et Wang, 2003; Li et al., 2010; Wang et al., 2002). Généralement il y a une corrélation positive entre l'assimilation du Cd, son extraction par le fluide digestif et sa répartition dans la phase échangeable. Pour d'autres métaux comme le Zn ou le Cr, aucune relation claire n'a pu être observée (Fan et Wang, 2003; Wang et al., 2002).

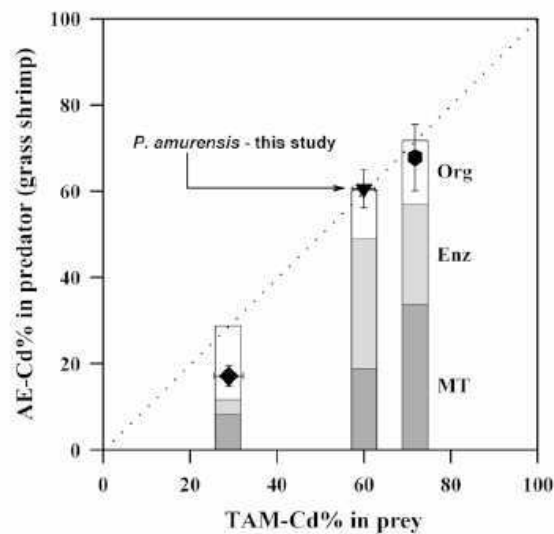


Figure 10: Relation entre le Cd présent dans la fraction disponible de la proie (TAM-Cd%: Trophically Available metal) (*P. amurensis* ▼ (Wallace et Luoma, 2003), *oligochaetes* Cd-résistant ◆ et *oligochaetes* Cd-non résistant • (Wallace et al., 1998)) et le Cd absorbé par le prédateur (AE-Cd%) *P. pugio* (Wallace et al., 1998) ou *P. macrodactylus* (Wallace et Luoma, 2003). Les histogrammes représentent la proportion des différentes fractions (organites [Org], enzymes [Enz], métallothionéines [MT]) dans l'ensemble de la fraction disponible (TAM=Org+Enz+MT). D'après Wallace et Luoma (2003).

Tout comme certains modèles prennent en compte l'influence de la chimie de l'eau sur la bioaccumulation par voie dissoute (BLM), il conviendrait de prendre en compte les caractéristiques chimiques des métaux particuliers afin de caractériser l'accumulation par voie trophique. Les études dans ce domaine sont récentes et peu nombreuses et aucun modèle d'interaction n'a encore été établi.

3.2 Conditions physiologiques de l'organisme

Au-delà de la géochimie du métal particulaire, qui est déjà complexe, la notion de biodisponibilité des métaux particuliers fait également appel au comportement de

l'organisme (taux de filtration, sélection de la nourriture, temps de passage digestif, production d'enzymes digestives...).

3.2.1 Taux de filtration

Par son activité de filtration la dreissène va obtenir à la fois de l'oxygène et de la nourriture. Le taux de filtration de cette espèce a été largement étudié en fonction de différents paramètres, que ce soit des paramètres physico-chimiques ou des paramètres de contamination; ceci principalement, pour mieux comprendre l'impact de ces organismes sur les écosystèmes et plus précisément sur le phytoplancton (Roditi et al., 1996). Ainsi, chez la dreissène, le taux de filtration dépend majoritairement de la concentration en particule : il est maximal pour de faibles concentrations et diminue avec l'augmentation de la concentration en particules (Wildridge et al., 1998). Une relation a d'ailleurs été établie entre le taux de filtration et la concentration en MES (Figure 11) (Reeders et Bij de Vaate, 1990). En revanche, la température (Reeders et Bij de Vaate, 1990) et la taille des particules (Horgan et Mills, 1997; Sprung et Rose, 1988) ont un effet moins marqué (Figure 12). De même, il n'y a pas d'influence de la contamination métallique pour des concentrations inférieures à $100\mu\text{g.L}^{-1}$ pour le Zn et le Cd (Kraak et al., 1994), et inférieures à $200\mu\text{g.L}^{-1}$ pour le Ni (Stuijzand et al., 1995).

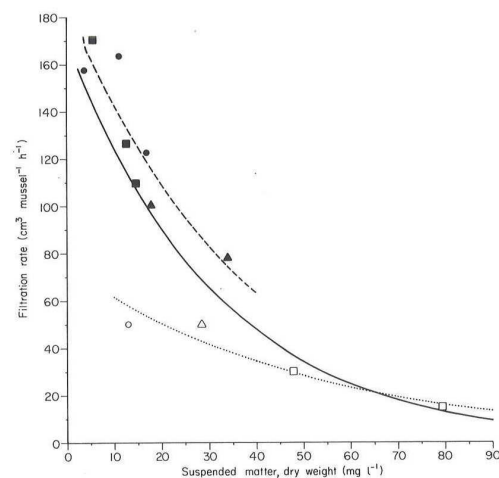


Figure 11: Relation entre le taux de filtration ($\text{cm}^3.\text{dreissenae}^{-1}.\text{h}^{-1}$) et la concentration en MES (mg.L^{-1}) de trois lacs des Pays Bas (● IJsselmeer, ■ Markermeer, ▲ Veluwemeer). Les symboles noirs correspondent à l'été tandis que les blancs correspondent à l'hiver (Reeders et al., 1989).

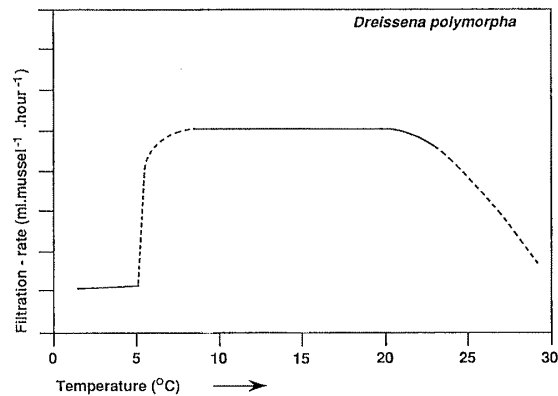


Figure 12: Relation entre le taux de filtration (mL.dreissène.h⁻¹) et la température chez la dreissène (Reeders et Bij de Vaate, 1990);

3.2.2 Comportement alimentaire

De nombreuses recherches ont menées sur le comportement alimentaire des bivalves (Arifin et Bendell-Young, 1997; Bayne, 1993; Clausen et Riisgard, 1996; Madon et al., 1998; Schneider et al., 1998; Vanderploeg et al., 2001). Deux représentations de ce comportement existent dans la littérature : i) les bivalves sont physiologiquement dépendants de leur environnement, ii) les bivalves ont la capacité de s'adapter aux changements de nourriture. Les résultats d'Arifin et Bendell-Young (1997; 2000) sur *Mytilus trossulus* valident à la fois ces deux visions. En effet, sous un régime alimentaire pauvre en matière minérale (composé exclusivement d'algues), l'activité ventilatoire décroît proportionnellement à l'augmentation de la concentration en algues, comme observé par Winter (1973), Bayne et al. (1989) et Clausen (1996). De même, sous un régime à la fois pauvre quantitativement et qualitativement, aucune sélection n'a été observée, ceci probablement afin de satisfaire au maximum leurs besoins énergétiques.

De plus, en analysant les pseudo-fèces¹³ de *Mytilus trossulus*, Arifin et Bendell-Young (1997) observent également une réponse sélective selon les conditions trophiques : ce bivalve, exposé à une nourriture abondante riche à la fois en algue et limon, adapterait sa stratégie nutritive afin d'optimiser l'ingestion de matière organique en sélectionnant les particules organiques et en rejetant les particules minérales. Ce processus de sélection serait fonction à la fois de la qualité et de la quantité de nourriture. Ainsi, la nourriture réellement ingérée par *M. trossulus* pourrait être relativement différente de celle présente dans le milieu. Chez la dreissène, cette capacité de sélection a mené au développement d'un certain type d'algue (*Mycrocystis aeruginosa*) dans le lac Erié (Vanderploeg et al., 2001). En effet, nourries avec différentes souches d'algues, les dreissènes assimileraient préférentiellement certaines d'entre elles et en rejetteraient sélectivement d'autre via les pseudo-fèces (ici *M. aeruginosa*).

¹³ Particules non ingérées, englobées dans du mucus et rejetées sous forme d'agglomérats

Le processus digestif de l'organisme est également déterminant vis-à-vis de la biodisponibilité des métaux particuliers. En effet, la composition du liquide digestif, mais également le temps de passage de la nourriture à travers le système digestif, va conditionner l'assimilation des métaux particuliers. Decho et Luoma (1996) ont mis en évidence la capacité pour certains bivalves de modifier leur comportement alimentaire afin de réduire leur exposition à une contamination en chrome. En effet, une exposition croissante en Cr influence à la fois le taux d'ingestion des bivalves mais également la proportion de nourriture passant par la glande digestive et donc le temps de rétention de ces particules au niveau du système digestif (cf. Chapitre 1:2.2 Bioaccumulation par voie trophique).

3.2.3 Cycle de vie de l'organisme et statut énergétique

La durée de vie de la dreissène est estimée, dans la plupart des cas, à 5-6 ans. Cette durée est ponctuée par des périodes de ponte entrecoupées par des phases de croissance et d'amaigrissement. Ces variations de poids peuvent entraîner des phénomènes de concentration ou de dilution biologique des contaminants. Lors de la ponte, les dreissènes vont émettre des gamètes pauvres en métaux (Phillips, 1980), entraînant une concentration des métaux dans les tissus mous. Au-delà de ces variations de poids saisonnières, la taille de l'organisme joue, elle aussi, un rôle (Cossa et al., 1980). En effet, les organismes de petite taille sont généralement plus contaminés que les grands, probablement parce que les constantes d'accumulation sont plus importantes chez les jeunes (Wang et Fisher, 1997).

Le statut énergétique des dreissènes, différent d'une période à l'autre et d'un site à l'autre selon les ressources en nourriture et la période du cycle biologique, affecte leur comportement face à la contamination. En effet, faire face à la contamination par des mécanismes de réparation à l'ADN ou par la synthèse de métallothionéine, par exemple, est coûteux du point de vue énergétique. Le statut énergétique de base des organismes a ainsi montré un effet marqué sur la détoxification des métaux (Voets, 2008).

3.2.4 Pré-exposition de l'organisme aux métaux

Des organismes soumis à une contamination peuvent développer des mécanismes augmentant leur tolérance à la contamination. Se pose alors la question suivante: peut-on comparer des organismes issus de populations différentes et donc ne réagissant pas de la même façon face à la contamination? Question d'autant plus importante dans le cadre d'un programme de suivi de bioaccumulation où l'on compare, dans différents sites, la contamination des tissus. Des relations entre la pré-exposition métallique et les constantes d'assimilation ont pu être mises en évidence pour certains organismes et certains métaux (Blackmore et Wang, 2002; Long et Wang, 2005; Shi et Wang, 2005). Généralement, après une exposition métallique, l'assimilation (par voie dissoute et trophique) augmente, de même que la bioaccumulation et l'induction des MT.

L'augmentation de la bioaccumulation est probablement due à une augmentation des sites de fixation disponibles, suite à l'induction des MT. Quelques exceptions sont reportées, notamment pour la moule *P. viridis*, pour laquelle la pré-exposition à du Cu ou de l'Ag n'induit pas de MT, malgré une accumulation significative de ces métaux dans les tissus (Shi et Wang, 2004). Ces relations ont été observées suite à des pré-expositions en laboratoire. *In situ*, bien que les organismes collectés sur plusieurs sites présentent des différences de bioaccumulation, aucune différence significative n'a pu être observée au niveau des constantes d'assimilation mesurées en laboratoire chez le bernacle *B. amphitrite* (Rainbow et al., 2003). Ainsi, *in situ*, du moins, l'effet de la pré-exposition reste difficile à observer.

3.2.5 Synthèse

Un ensemble de paramètres, à la fois physiologiques et environnementaux, peut influencer l'accumulation, paramètres qui peuvent eux aussi varier dans le temps et l'espace et qui sont en interaction les uns avec les autres. La Figure 13 schématise l'ensemble de ces paramètres et met en lumière la complexité des mécanismes de bioaccumulation.

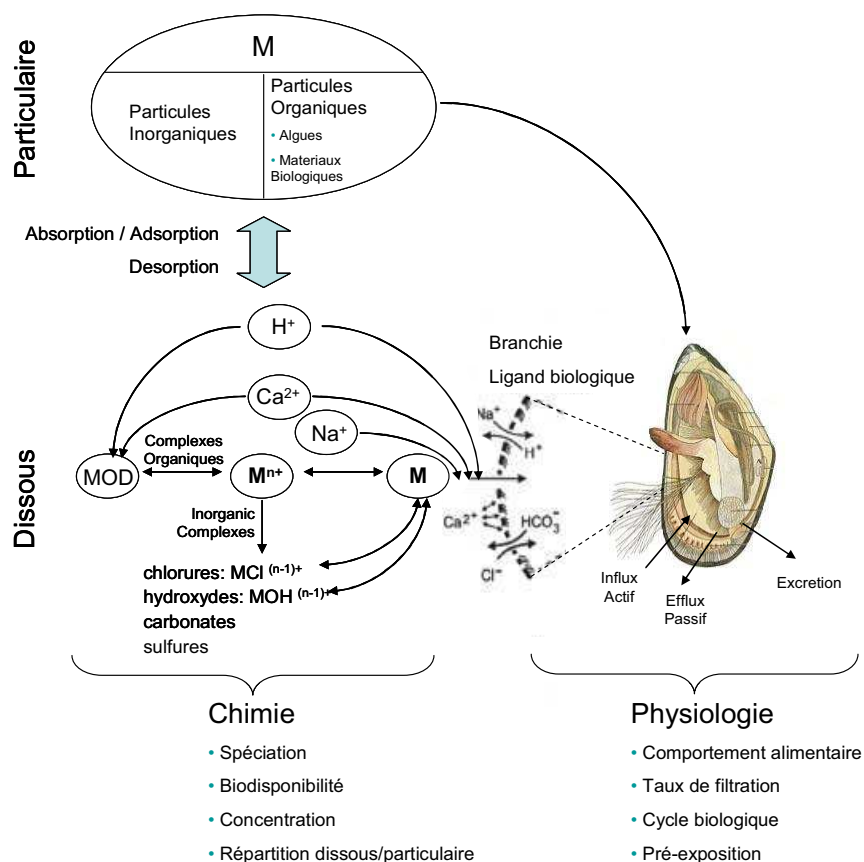


Figure 13: Schéma des facteurs influençant la bioaccumulation. Modifié de Paquin et al. (2002).

4. LE MODELE BIODYNAMIQUE

L'utilité d'une espèce bioindicatrice réside dans sa capacité à lier la contamination dans ses tissus à la contamination du milieu. Afin de faire ce lien, de façon plus précise que ne le permettent les facteurs BCF ou BAF, des modèles toxico-cinétiques ont été développés. Un des plus couramment utilisé pour les métaux est le modèle biodynamique.

4.1 Description du modèle de bioaccumulation

Le modèle biodynamique a été largement utilisé afin de mieux comprendre les mécanismes de bioaccumulation des métaux, que ce soit chez les invertébrés, les poissons, ou encore les algues (Wang et al., 1996). Ce modèle décrit de façon simple l'accumulation comme la résultante d'une accumulation par voie dissoute, par voie trophique et un terme d'élimination dû à l'excrétion même du métal (k_e) et à la croissance ou à l'amaigrissement des organismes (g).

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

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

AE : efficacité d'assimilation (%)

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

k_e : taux d'élimination (j^{-1})

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

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

C_d : concentration en contaminant biodisponible par voie dissoute ($\mu g \cdot L^{-1}$)

C_p : concentration en contaminant particulaire ($\mu g \cdot g^{-1}$)

t : temps (j)

A l'équilibre, la concentration en métal dans l'organisme C_{org_ss} ($\mu g \cdot g^{-1}$), s'écrit selon l'équation suivante:

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

Pour la plupart des métaux traces (Am, Cd, Co, Se et Zn) les constantes d'élimination sont comparables, que l'accumulation ait eu lieu, par voie dissoute ou trophique (Roditi et Fisher, 1999; Wang et al., 1996). Cependant, si les voies d'élimination diffèrent, il est possible de les distinguer en écrivant l'Equation 2 selon:

$$C_{org_ss} = \frac{k_u \cdot C_d}{k_{e_d} + g} + \frac{AE \cdot IR \cdot C_p}{k_{e_p} + g} \quad (3)$$

avec k_{e_d} et k_{e_p} les constantes d'élimination par voie dissoute et trophique (Wang et al., 1996).

Comme le soulignent Wang et Rainbow (2008), l'application du modèle biodynamique est plus vaste que la simple prédiction des concentrations métalliques dans les organismes. Il offre, en effet, un cadre d'interprétation pour les expériences de bioaccumulation,

permettant de comparer l'accumulation selon les espèces et les métaux, mais également d'évaluer le paramètre critique influençant le plus la concentration métallique dans les tissus.

4.2 Détermination des constantes biodynamiques

Le mode opératoire servant à déterminer les paramètres du modèle, a été décrit par Wang (1996). Nous décrivons ici, brièvement, les bases méthodologiques permettant leur détermination en laboratoire.

4.2.1 Constante d'accumulation par voie dissoute k_u

La détermination de la constante d'accumulation par voie dissoute (k_u) passe généralement par des expositions courtes d'organismes dans de l'eau contaminée en métaux. Un temps d'exposition court permet de minimiser l'effet de l'efflux et de la croissance des organismes et d'obtenir ainsi la relation suivante:

$$\frac{dC_{org}}{dt} = k_u \cdot C_d \quad (4)$$

Il convient de s'assurer que la concentration en métal reste constante sur toute la durée d'exposition. Suite à l'exposition, les organismes (ou les tissus mous s'il s'agit d'une espèce à coquille) sont analysés afin de déterminer l'accumulation de métal en fonction du temps; la pente obtenue correspond à l'influx ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{j}^{-1}$). Une fois l'influx divisé par la concentration en métal dissous, on obtient k_u . Pour estimer au plus juste k_u , l'influx peut également être calculé pour plusieurs concentrations d'exposition. La relation, théoriquement linéaire, obtenue entre l'influx et la concentration d'exposition permet de calculer k_u (Figure 14).

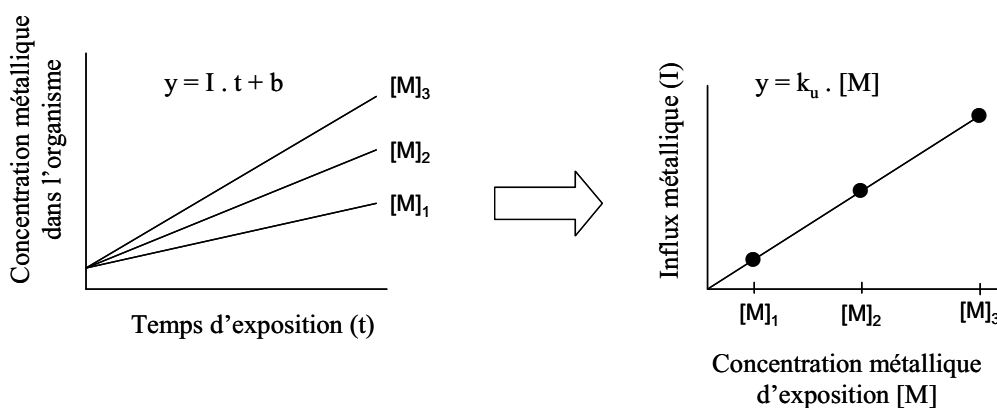


Figure 14: Principe de calcul de la constante d'accumulation par voie dissoute (k_u) à partir des cinétiques d'accumulation.

4.2.2 Efficacité d'assimilation

L'efficacité d'assimilation (AE) est définie comme la proportion de métal ingéré, assimilé par l'organisme. Elle est généralement quantifiée à partir de la méthode du pulse chase feeding (Figure 15) (Roditi et Fisher, 1999; Wang et al., 1996). Cette méthode consiste à nourrir des organismes pendant une courte période avec de la nourriture uniformément contaminée (sur une période inférieure à la durée de transit de la nourriture, i.e. généralement 30 minutes pour les bivalves, évitant ainsi toute recontamination des organismes par leurs fèces). S'ensuit une phase de dépuraction (environ 70h pour les bivalves) pendant laquelle la contamination des fèces et des tissus est mesurée afin de suivre le passage de cette nourriture contaminée à travers le système digestif des organismes. Pendant cette phase de dépuraction, les organismes sont alors nourris avec de la nourriture non contaminée.

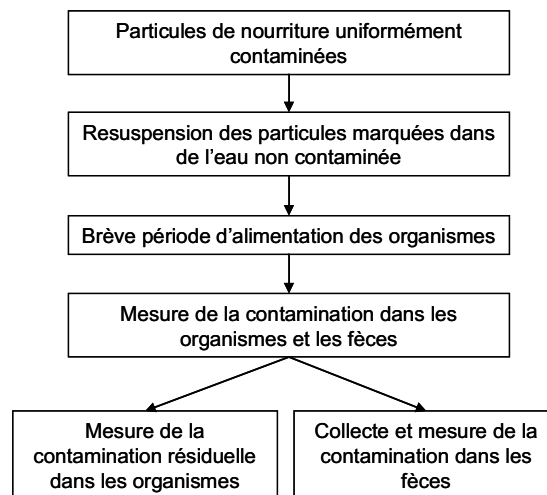


Figure 15: Méthode du pulse-chase feeding avec de la nourriture contaminée mise en place pour déterminer l'efficacité d'assimilation (AE) chez les organismes aquatiques. D'après Wang et Fisher (1998).

Cette technique, mise au point initialement en utilisant des traceurs radioactifs de métaux (Wang et al., 1996), a récemment été développée avec des isotopes stables (Croteau et al., 2007; Croteau et al., 2004). Les isotopes (stables ou radioactifs), de par leur abondance naturelle minoritaire, permettent de s'affranchir des contaminations métalliques antérieures et de détecter une faible variation dans les tissus. L'utilisation des isotopes stables a pour avantage majeur d'éviter la lourdeur de l'expérience due à la mesure de la radioactivité. Cependant, cette technique ne permet pas de mesurer les échantillons de façon non destructive. Notons de plus que cette technique nécessite une minéralisation des échantillons, qui précède l'étape d'analyse, et qui peut induire un biais si elle n'est pas complète. La technique des isotopes stables peut également générer plus de variabilité puisqu'il n'est plus possible de suivre la contamination dans le même organisme au cours du temps, ce qui a pour conséquence de multiplier le nombre d'organismes nécessaires. Dans les deux cas, avec les isotopes stables ou radioactifs, les comportements observés sont les mêmes que pour les métaux "classiques" majoritaires

puisque'étant donné leur masse, ils ne subissent pas de fractionnement isotopique¹⁴ (Sulzman et al., 2007).

L'AE peut ensuite être calculée selon 2 méthodes: la méthode du bilan de masse (Luoma et al., 1992) ou celle des ratios (Calow et Fletcher, 1972). Plusieurs relations, en théorie équivalentes¹⁵, définissent l'efficacité d'assimilation selon la méthode du bilan de masse:

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

La méthode du bilan de masse nécessite la quantification des métaux ingérés, assimilés et excrétés via les fèces. Ceci peut s'avérer délicat pour les organismes de très petite taille puisqu'il faut collecter l'ensemble des fèces produites. Dans la méthode des ratios, un traceur inerte, c'est-à-dire qui n'est pas assimilé, est utilisé (généralement le Cr ou l'Am) afin de suivre le passage de la nourriture ingérée (Wang et Fisher, 1998). L'efficacité d'assimilation, du ¹⁰⁹Cd, par exemple, est calculée par la relation suivante (Calow et Fletcher, 1972):

$$AE = 1 - \frac{\left(\frac{Cd^{109}}{Cr^{51}}\right)_{fèces}}{\left(\frac{Cd^{109}}{Cr^{51}}\right)_{nourriture}} \quad (6)$$

Cette méthode des ratios, à la base utilisée pour calculer l'assimilation du carbone (Calow et Fletcher, 1972), a été étendue aux métaux car elle ne nécessite pas, en théorie, la collecte de l'ensemble des fèces si l'ensemble des métaux suivent la même cinétique d'élimination. En effet, seul le dosage dans un unique échantillon de nourriture et de fèces est normalement nécessaire. En pratique, si les différents métaux ingérés ne mettent pas le même temps pour traverser le système digestif, les ratios métalliques des fèces et de la nourriture ne peuvent plus être comparés, et ne peuvent donc pas être utilisés pour calculer la fraction de métal assimilé. Dans ce cas on calcule le ratio, non plus sur la base d'un échantillon, mais sur l'ensemble des fèces cumulées.

Les méthodes des ratios et du bilan de masse se sont montrées comparables pour le Cr, Cu et Cd chez le gastéropode *L. stagnalis* (Croteau et al., 2007) et la moule *M. edulis* (Wang et Fisher, 1996).

4.2.3 Constante d'élimination k_e

Suite à une phase de contamination (par voie dissoute ou trophique), les organismes sont placés dans un milieu non contaminé et la concentration en contaminants dans les tissus est suivie. Pendant cette période de dépurat, les organismes sont nourris. De plus, l'eau du milieu est régulièrement renouvelée et les fèces collectées afin d'éviter

¹⁴ Le fractionnement isotopique rend compte des variations de répartition des différents isotopes d'un élément.

¹⁵ En théorie, en effet, la quantité de métal ingéré correspond à la somme du métal excrété et du métal assimilé (moins le métal rejeté sous forme de pseudo-fèces).

toute recontamination des organismes. La cinétique de dépuraction, de la forme $e^{-k_e t}$, permet de calculer la constante d'élimination par une régression non linéaire ou en déterminant la pente de $\ln \text{Corg}$ en fonction du temps.

4.3 Variation des paramètres biodynamiques

Dans le formalisme du modèle biodynamique, les différents paramètres du modèle (k_u , AE et k_e), déterminés en conditions contrôlées au laboratoire, sont supposés indépendants des conditions environnementales et spécifiques du couple métal/organisme. Dans les faits, ces paramètres sont fonction de nombreux facteurs tels que, la température (Gossiaux et al., 1996), la salinité (Blackmore et Wang, 2003; Ng et Wang, 2005) et dans certains cas de la pré-exposition aux métaux (Shi et Wang, 2004).

Différentes études ont évalué l'influence de la salinité sur les constantes du modèle biodynamique (Ng et Wang, 2005; Rainbow et Black, 2002; Rainbow et Black, 2005). Ng et Wang (2005) ont mesuré les constantes AE, k_u et k_e chez le bivalve *P. viridis* provenant de 2 sites de salinité différente. Les résultats ont montré d'une part que, sur le site à faible salinité, la contamination des tissus en Cd était 3 à 6 fois supérieure à celle du site avec une forte salinité, et d'autre part, que les constantes AE et k_e étaient comparables quel que soit le site alors que k_u était plus élevé lorsque la salinité était plus réduite. Ainsi, les facteurs diminuant localement la biodisponibilité des métaux (cf. BLM) pourraient, de la même façon, diminuer la prise de métal. Certaines études montrent que les relations établies par le FIAM (ou le BLM) sont complexes à incorporer au modèle biodynamique (Chuang et Wang, 2006). En effet, ces paramètres ont non seulement un effet sur la spéciation des métaux mais aussi sur la physiologie de l'organisme. Rainbow et Black (2002; 2005) montrent ainsi l'effet double de la salinité à la fois sur la spéciation du Cd et du Zn et sur la perméabilité de la membrane biologique vis-à-vis de ces métaux. Dans cette étude, la constante d'assimilation par voie dissoute ne peut donc pas être corrélée directement à l'activité de l'ion libre à cause de cet effet physiologique.

Variabilité de l'efficacité d'assimilation

La méthode du pulse-chase feeding repose sur une hypothèse fondamentale selon laquelle les traceurs (isotopes stables ou non) réagiraient de la même façon que les métaux présents naturellement dans le milieu. Or Grisco et al. (2000) ont montré que les isotopes des sédiments dopés ne présentaient pas la même répartition géochimique que les métaux natifs, que cette répartition dépendait de l'âge du sédiment (i.e. du temps de contact entre les isotopes et le sédiment), et que cette différence de répartition pouvait influencer l'AE. En effet selon le temps de contact entre les isotopes et le sédiment, les isotopes s'associeront plutôt à la fraction échangeable (temps de contact court) ou à la fraction plus réfractaire (temps de contact long), et l'AE, selon les métaux et l'organisme considéré, sera d'autant plus élevée que les métaux seront échangeables (Grisco et Fisher, 2004).

Variabilité du taux de croissance

Le taux de croissance (g) dans ce type de modèle a également besoin d'être précisément défini, en particulier pour les bivalves, lorsque l'on veut comparer des données de bioaccumulation à différentes périodes de l'année. Si, chez certaines espèces, le taux de croissance est relativement constant, chez les dreissènes, le poids est soumis à de fortes variations notamment pendant la ponte. Un modèle d'allocation énergétique (DEB: Dynamic Energy Budget), développé notamment chez *M. galloprovincialis* et *C. gigas*, permet, entre autres, de prédire la croissance des organismes en fonction de la nourriture disponible et de la température (Kooijman, 1993; 2000). Cet outil pourrait être incorporé au modèle de bioaccumulation afin d'affiner ses qualités prédictives. Cependant, le modèle DEB est lourd à établir et n'a pas encore été développé chez la dreissène.

4.4 Validité *in situ* du modèle biodynamique

Bien que ce modèle repose sur des hypothèses simples (par exemple la constance des paramètres k_u , AE et k_e), il permet de prendre en considération les facteurs majeurs influençant la bioaccumulation, à savoir : la spécificité du métal, la voie d'exposition et les caractéristiques propres à l'espèce. Malgré les variations des paramètres biodynamiques reportées dans la littérature, ce modèle, appliqué avec des constantes fixes déterminées en laboratoire permet d'obtenir des prévisions en adéquation avec les observations *in situ*, validant ainsi ces hypothèses de base pour plusieurs espèces (Figure 16) (Luoma et Rainbow, 2005).

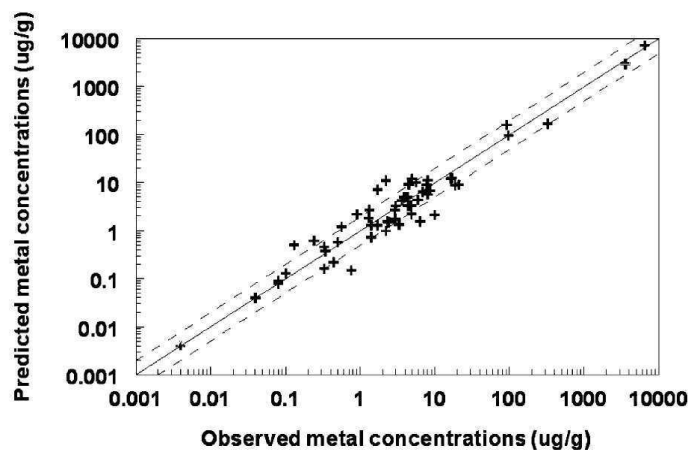


Figure 16: Corrélation entre les teneurs en métaux prédites par le modèle biodynamique et celles observées dans les organismes autochtones. Les données portent sur six métaux (Ag, Cd, Cr, Cu, Se et Zn), quatorze espèces et onze écosystèmes différents. (Luoma et Rainbow, 2005). Les droites en pointillé représentent un écart d'un facteur 2 par rapport à la relation 1:1.

En ce qui concerne plus spécifiquement la dreissène, Roditi (2000b) a confronté le modèle biodynamique, établi en laboratoire pour l'Ag, le Cd, le Cr, le Hg et le Se, avec

des données de bioaccumulation mesurées *in situ*. Cette validation a été réalisée sur différents sites comprenant des lacs et des rivières, en considérant le modèle à l'équilibre. Roditi (2000b) a montré une bonne corrélation entre les valeurs prédites et les valeurs mesurées pour la majorité de ces métaux. Cependant, dans quelques cas, notamment pour le Cd et l'Ag dans les rivières, les valeurs prédites s'ajustent moins bien aux valeurs mesurées. Il explique ce manque de corrélation par :

- la fluctuation plus importante des paramètres physico-chimiques (i.e. COD et MES) au sein des rivières qui éloigneraient les constantes d'accumulation établies en laboratoire, des valeurs réelles *in situ*
- il remet également en cause l'utilisation du modèle biodynamique à l'équilibre, en particulier pour les métaux ayant une demi-vie longue comme le Cd (52 jours). En effet, la capacité d'un métal à répondre aux variations du milieu sera d'autant plus longue que sa demi-vie sera longue.

Notons qu'il est possible d'utiliser le modèle dans un système dynamique, où l'évolution des paramètres physico-chimiques pourrait éventuellement être intégrée (Landrum et al., 1992):

$$C_{org} = C_{org_ss} \cdot (1 - e^{-(k_e+g)t}) \quad (7)$$

4.5 Bilan et perspective d'utilisation pour la dreissène sur le bassin de la Seine

4.5.1 Constantes du modèle biodynamiques

Les constantes du modèle biodynamiques de la littérature déterminées pour la dreissène, ou à défaut une espèce proche (*M. edulis*), sont reportées dans le Tableau 5.

Tableau 5: Paramètres biodynamiques déterminés chez *D. polymorpha* ou, à défaut, chez *M. edulis*.

	AE (%)	k_u (L.g ⁻¹ .j ⁻¹)	$k_{e,d}$ dissous (j ⁻¹)	$k_{e,p}$ trophique (j ⁻¹)
Cd	19 – 72 ^a	2.30 – 3.22 ^a	0.011 ^a	0.012 ^a
Cr III	1.5 – 19 ^a	0.82 – 2.10 ^a	-	0.019 ^a
Cr IV	-	0.44 – 1.24 ^a	0.011 ^a	-
Zn	41 – 32 ^b	0.96 – 1.13 ^b	0.020 ^b	0.015 ^b
Co	12 – 16 ^b	0.11 – 0.14 ^b	0.018 ^b	0.010 ^b
Ni	-	-	0.019 ^c	-
Cu	-	-	0.022 ^d	-
Mn	-	-		0.211 ^e

a : (Roditi et Fisher, 1999) chez *D. polymorpha*.

b : (Wang et al., 1996) chez *M. edulis*.

c : (Zarogian et Johnson, 1984) chez *M. edulis*

d : (Mersch et al., 1993) chez *D. polymorpha*. k_e estimé à partir des données de contamination des tissus pendant une période de dépuraction selon la relation $C_t = C_0 \cdot e^{-k_e \cdot t}$.

e: (Latouche et Mix, 1982) chez *M. edulis*. ke estimé à partir des données de contamination des tissus de dreissène pendant une période de dépuracion selon la relation $C_t = C_0 \cdot e^{-k_e \cdot t}$.

4.5.2 Amélioration du modèle

L'étude des paramètres d'accumulation, en particulier de l'AE, s'est étendue à plusieurs espèces aquatiques, notamment à la dreissène (Roditi et Fisher, 1999). Mais les données actuellement disponibles sont limitées à quelques cas particuliers de nourriture ou d'eau. Or, les constantes biodynamiques déterminées en laboratoire sont, conditionnées par les protocoles expérimentaux (physico-chimie de l'eau, type de nourriture...). Dans un contexte de contamination diffuse, il devient nécessaire d'évaluer finement les constantes d'accumulation pour faire précisément le lien entre l'accumulation dans les organismes et la biodisponibilité des contaminants. De ce fait, il paraît difficile d'étendre le modèle biodynamique reposant sur des paramètres déterminés dans la littérature, à des systèmes aquatiques peu contaminés, à moins d'intégrer les variations physico-chimiques directement dans le modèle. Ce modèle nécessiterait donc d'être affiné afin de prendre en compte, non seulement l'évolution des paramètres physicochimiques mais également la spéciation des métaux (particulaires et dissous) et la physiologie de l'organisme pouvant influencer les constantes d'accumulation. L'accumulation des métaux par la nourriture, en particulier, apparaît comme une voie majoritaire d'accumulation à la fois variable et sur laquelle il y a une forte incertitude (cf. le comportement alimentaire en 3.2.2 et la variabilité de l'efficacité d'assimilation en 4.3).

Détermination des paramètres biodynamiques en conditions contrôlées

Chapitre 2: Accumulation du Cd et du Ni par voie dissoute -
Facteurs de contrôle

Chapitre 3: Accumulation des métaux par voie trophique

Chapitre 2: Accumulation du Cd et du Ni par voie dissoute - Facteurs de contrôle

1. OBJECTIFS

La composition chimique de l'eau influence la réponse biologique des organismes à la contamination métallique. En effet, que ce soit une réponse biologique du type bioaccumulation ou toxicité, différents paramètres, comme la dureté, les interactions multi métalliques ou la matière organique peuvent la moduler (Komjarova et Blust, 2008; Qiu et al., 2005; Voets et al., 2004). Différents modèles ont été proposés afin de rendre compte de l'influence de la composition de l'eau sur la toxicité des métaux dissous sur les organismes aquatiques. Le modèle du ligand biologique (BLM), par exemple, permet de prédire cette toxicité en fonction de la concentration en métal libre et en ions compétiteurs. Le modèle biodynamique, quant à lui, décrit l'accumulation de métal dans les organismes par voie dissoute, en considérant à la fois la concentration en métal dissous et une constante d'accumulation (k_u), constante qui serait néanmoins potentiellement influencée par la chimie du milieu (Rainbow et Black, 2002). Bien que ces deux modèles relient l'exposition aux métaux et leurs effets de manière différente, ils reposent sur des principes communs issus des cinétiques enzymatiques et des équations de transfert par diffusion. Pour autant, l'étude de Croteau et Luoma (2007) mise à part, peu de travaux de bioaccumulation ont été menés afin d'utiliser les aspects complémentaires de ces deux modèles.

Dans ce chapitre, l'objectif a d'abord été d'étudier et de quantifier l'effet de divers paramètres chimiques sur l'accumulation du cadmium et du nickel dissous. Trois paramètres, susceptibles d'avoir un fort impact sur cette accumulation, ont été choisis: la concentration en Ca, en Zn et en matière organique dissoute (MOD). De nombreuses études ont rapporté l'effet protecteur du Ca (Croteau et Luoma, 2007; Kozlova et al., 2009; Tan et Wang, 2008), du Zn (Hemelraad et al., 1987; Komjarova et Blust, 2008) et de la MOD (Voets et al., 2004) vis-à-vis de l'accumulation du Cd et du Ni. Quelques exceptions ont néanmoins été rapportées chez les bivalves dans le cas de la matière organique (Pempkowiak et al., 1994; Roditi et al., 2000a). Nous avons également cherché à intégrer l'influence de ces paramètres dans le modèle biodynamique. Un modèle, basé sur les concepts du BLM, a été développé à partir des résultats de bioaccumulation.

Les résultats concernant le Cd ont fait l'objet de l'Article 1¹⁶.

¹⁶ Un article est en préparation concernant les résultats de l'exposition au Ni (Bourgeault A., Gourlay-Francé C., Tusseau-Vuillemin M. H. Bioaccumulation of waterborne Ni in *Dreissena polymorpha*: a stable isotope experiment to assess the effect of water chemistry).

2. MATERIELS ET METHODES

2.1 Prélèvement et acclimatation des dreissènes

Les dreissènes ont été prélevées dans le canal de la Meuse à Commercy. Elles ont été calibrées (20-22 mm) puis acclimatées en laboratoire à 15°C avec un cycle jour/nuit 10h/14h. Pendant cette phase d'acclimatation, l'eau des bacs a été progressivement remplacée par de l'eau d'exposition (eau minérale Valvert ou eau minérale Aquarelle¹⁷). Les dreissènes ont été nourries régulièrement de chlorelles en poudre à raison de 3,2 mg.jour⁻¹.moules⁻¹. De plus, l'eau des bacs a été renouvelée lorsque les concentrations des différentes formes de l'azote avaient atteint les valeurs seuils suivantes : NH₄⁺ : 2 mg.L⁻¹, NO₂⁻ : 0,25 mg.L⁻¹ et NO₃²⁻ : 25 mg.L⁻¹.

2.2 Mise au point du protocole d'exposition

Dans un premier temps, l'étude a consisté à dimensionner l'exposition, à la fois en termes de durée, de concentration d'exposition, de nombre d'organismes exposés et de choix de l'élément métallique utilisé (isotope majoritaire "classique" ou isotope stable minoritaire du métal en question) afin de pouvoir calculer la constante d'accumulation k_u avec précision et à des concentrations d'exposition les plus proches possibles des valeurs environnementales.

2.2.1 Exposition au cadmium

Le dimensionnement de l'exposition au cadmium a été basé sur une étude précédente menée au Cemagref (Nicolle, 2007). Lors de cette étude, les cinétiques d'accumulation du Cd dissous ont été établies chez la dreissène sur 15 jours et pour plusieurs concentrations (de 1 à 10µg.L⁻¹ de Cd). La durée d'exposition a été choisie, dans le cadre de notre étude, pour permettre une accumulation significative tout en limitant au maximum les conséquences biologiques dues à une exposition trop longue sans nourriture. Un autre point important a été de maintenir une contamination stable au cours du temps, malgré l'accumulation par les organismes. Le fait d'équilibrer au préalable les bacs d'exposition avec une eau identique à celle utilisée pendant l'exposition, et le fait de renouveler le milieu après 24h d'exposition, se sont avérés efficaces. De plus, toujours dans l'objectif de maintenir une concentration métallique stable pendant l'exposition, le nombre d'organismes exposés a été limité à 1-2 par litre. Ainsi, sur la base des résultats obtenus par Nicolle (2007), des essais préliminaires ont été lancés et ont montré qu'une exposition de 48h à 3µg.L⁻¹ de Cd, dans des bacs de 10L préalablement équilibrés et renouvelés après 24h, assuraient une accumulation significative et linéaire, tout en assurant une concentration d'exposition constante. Afin de limiter la perturbation des dreissènes, plutôt que de renouveler la totalité du bac

¹⁷ Les eaux Valvert et Aquarelle ont une composition proche de celle de la Seine. L'arrêt de la commercialisation de l'eau Valvert en 2010 a conduit à l'utilisation de l'eau Aquarelle.

après 24h d'exposition, les dreissènes ont été transférées dans un bac préparé de façon identique à celui utilisé en début d'exposition (Figure 17).

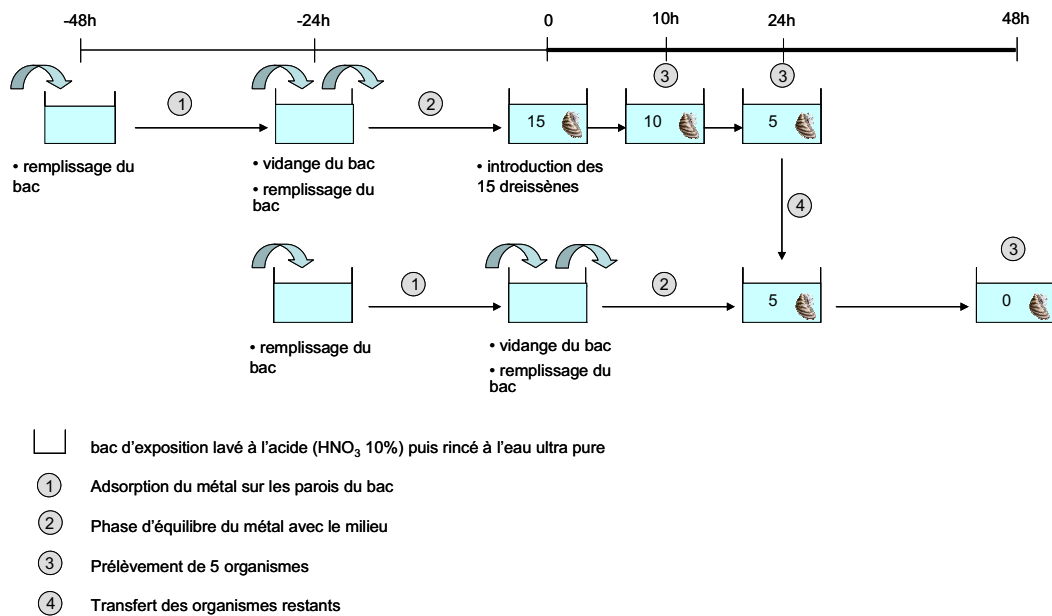


Figure 17: Méthodologie employée pour l'exposition des dreissènes au cadmium et au nickel par voie dissoute. Dans le cas du cadmium, la durée de l'étape 2 a été réduite à 2h car l'équilibre du Cd avec le milieu est rapide.

2.2.2 Exposition au nickel

Dans le cas du Ni, ce mode opératoire a été conservé. Une attention particulière a été apportée au temps d'équilibre entre le Ni et le milieu. En effet, l'équilibre du Ni étant lent (en particulier avec la matière organique) (Guthrie et al., 2003), le Ni a systématiquement été laissé en contact 24h avec le milieu avant le début des expositions. En premier lieu, les expositions ont été réalisées avec du nickel "classique" à différentes concentrations (de 15 à 200 $\mu\text{g.L}^{-1}$). Les résultats ont montré la nécessité d'exposer les organismes à des concentrations d'au moins 50 à 100 $\mu\text{g.L}^{-1}$ pour observer une accumulation significative. Contrairement aux expositions au Cd, dans certains cas, l'accumulation au cours du temps n'a pas été linéaire. Une variabilité biologique forte entre les organismes a également été observée, ceci probablement à cause d'un impact physiologique sur les organismes du aux fortes concentrations d'exposition (Stuijzand et al., 1995). Nous avons opté pour des expositions avec un isotope stable minoritaire du Ni: le ^{62}Ni qui représente seulement 3,6% du Ni total. L'utilisation du ^{62}Ni , et des isotopes stables plus généralement, permet de s'affranchir des contaminations antérieures des organismes et de détecter des variations faibles de contamination dans les tissus. Plusieurs concentrations ont été testées: de 0,5 à 8,4 $\mu\text{g.L}^{-1}$. Pour chacune d'elle, l'accumulation a été significative ($p < 0,05$) et linéaire ($r^2 > 0,89$). Le k_u du ^{62}Ni a été estimé à $0.0729 \pm 0.0056 \text{ L.g}^{-1}.\text{j}^{-1}$ à partir d'une régression linéaire entre les influx et

les concentrations en ^{62}Ni (Figure 18). Ces valeurs prennent en compte l'erreur en x et en y (Cantrell, 2008).

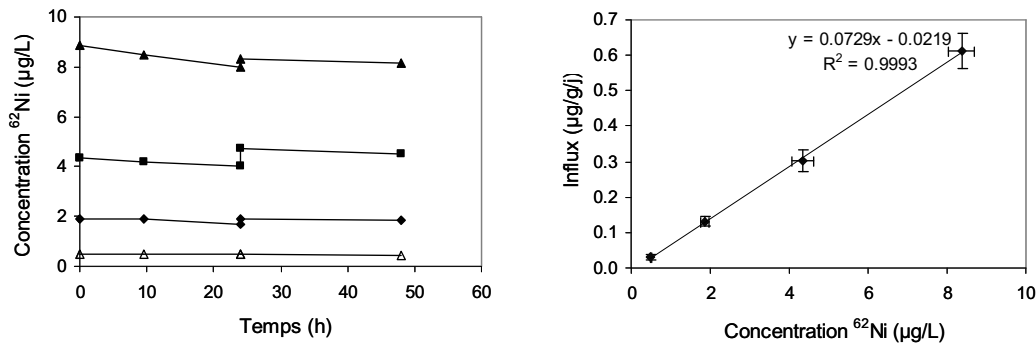


Figure 18: Concentration en ^{62}Ni au cours des expositions (graphique de gauche) et influx de ^{62}Ni ($\mu\text{g.g}^{-1}.\text{j}^{-1}$) en fonction de ces différentes concentrations d'exposition (graphique de droite). Moyenne \pm écart type ($n=5$). Régression linéaire réalisée à partir de l'utilitaire de Cantrell (2008) prenant en compte à la fois l'erreur sur x et sur y.

Une concentration de $5\mu\text{g.L}^{-1}$ de ^{62}Ni a été choisie afin d'étudier l'influence du Zn, du Ca et de la MOD. Cette concentration était proche des concentrations environnementales¹⁸ et garantissait une accumulation significative, même (a priori) en cas d'inhibition par les paramètres physico-chimiques testés. L'effet inhibiteur potentiel de la matière organique a notamment été estimé via l'utilisation du logiciel de spéciation Visual Minteq, en faisant l'hypothèse qu'en présence de matière organique, seuls les ions métalliques libres et les complexes inorganiques étaient biodisponibles.

2.3 Exposition des dreissènes et variations des paramètres chimiques

Les dreissènes ont été exposées 48h dans de l'eau de source enrichie en Cd ($3\mu\text{g.L}^{-1}$) ou en ^{62}Ni ($5\mu\text{g.L}^{-1}$). Lors de ces expositions, les dreissènes n'ont pas été nourries. Différents ajouts ont été réalisés dans le milieu afin de faire varier la composition chimique de l'eau: matière organique (acides humiques Aldrich ou matière organique naturelle de la rivière Suwannee¹⁹) de 0,2 à $17,1\text{mgC.L}^{-1}$, calcium de 37 à 131mg.L^{-1} et zinc de 3 à $89\mu\text{g.L}^{-1}$. Cette gamme de concentration, relativement large, permet d'englober la majorité des systèmes aquatiques mais également d'inclure des systèmes plus atypiques tels que ceux riches en carbonates (Meybeck et al., 1998), en matière organique (Smolders et al., 2002) ou en contaminant métallique (Admiraal et al., 1999). Bien qu'étant peu représentative de la matière organique naturelle, les HA Aldrich ont été choisis pour les expositions avec le Cd dans un souci de comparaison avec la littérature. Pour les expositions au Ni, nous avons utilisé la MOD de la rivière Suwannee.

¹⁸ En Seine les concentrations en Ni dissous mesurées dans le cadre du (RNO) oscillent généralement entre 0,5 et $3\mu\text{g.L}^{-1}$.

¹⁹ MOD aquatique de la Suwannee River 1R101N IHSS (International Humic Substance Society, USA).

2.3.1 Paramètres physico-chimiques

Des prélèvements d'eau ont été effectués dans chacun des bacs à 0, 10, 24 (avant et après renouvellement) et 48h afin d'analyser le pH, la température, les concentrations en ions majeurs, le carbone organique dissous (COD) et la concentration en métal (Cd, Ni et Zn). Les échantillons d'eau destinés à l'analyse métallique, ont été acidifiés (HNO₃ 1%) puis analysés par spectrométrie d'absorption atomique four ou flamme dans le cas des expériences sur le Cd et par ICP-MS dans le cas du ⁶²Ni. Les résultats sont présentés dans le Tableau 6.

Tableau 6: Composition des milieux d'exposition pour l'accumulation du Cd et du Ni.

		[COD] mg.L ⁻¹	[Ca ²⁺] mg.L ⁻¹	[Zn] µg.L ⁻¹	[métal] µg.L ⁻¹	T° °C	pH		
Cd	Exposition Zn	Réf. 1	0.2 ± 0.1	70.5 ± 1.8	1.6 ± nd	3.3 ± 0.1	10.8 ± 0.9	7.5 ± 0.3	
			0.1 ± 0.1	72.5 ± 0.6	12.6 ± 3.6	3.2 ± 0.1	11.7 ± 0.4	7.6 ± 0.2	
			0.3 ± 0.2	72.3 ± 0.6	44.4 ± 0.5	3.2 ± 0.1	11.1 ± 0.5	7.5 ± 0.2	
			0.2 ± 0.1	72.3 ± 0.7	89.2 ± 1.9	3.3 ± 0.1	10.8 ± 0.6	7.5 ± 0.3	
	Exposition Ca	Réf. 1	0.2 ± 0.1	36.5 ± 0.4	1.6 ± 1.6	3.4 ± 0.1	11.1 ± 1.5	7.7 ± 0.4	
			0.2 ± 0.1	70.5 ± 1.8	1.6 ± nd	3.3 ± 0.1	10.8 ± 0.9	7.5 ± 0.4	
			0.2 ± 0.1	99.4 ± 0.9	1.4 ± nd	3.2 ± 0.1	10.6 ± 0.5	7.7 ± 0.4	
			0.2 ± 0.2	131.4 ± 3.8	2.0 ± 1.1	3.1 ± 0.2	10.4 ± 0.2	7.6 ± 0.5	
	Exposition MOD (Acides humiques Aldrich)	Réf. 2	0.2 ± 0.1	59.8 ± 3.4	<LQ	2.1 ± 0.8	12.3 ± 1.3	8.5 ± 0.1	
			0.5 ± 0.2	75.0 ± 2.8	<LQ	2.7 ± 0.2	13.7 ± 1.1	8.3 ± 0.1	
			1.1 ± 0.1	71.1 ± 8.3	<LQ	2.6 ± 0.2	13.1 ± 0.6	8.2 ± 0.1	
			3.1 ± 0.1	72.3 ± 6.2	<LQ	2.6 ± 0.2	13.3 ± 0.5	8.1 ± 0.2	
			8.2 ± 0.3	73.7 ± 1.6	<LQ	2.6 ± 0.2	13.1 ± 0.5	8.1 ± 0.2	
		17.1 ± 0.3	70.0 ± 4.0	<LQ	2.6 ± 0.2	13.9 ± 0.4	8.0 ± 0.2		
	Ni	Exposition Zn	Réf. 1	-	74.2 ± 0.5	6.6 ± 4.1	4.7 ± 0.2	11.9 ± 0.8	8.2 ± 0.6
				-	73.0 ± 8.6	13.9 ± 3.5	4.7 ± 0.1	12.1 ± 1.2	8.1 ± 0.1
			-	74.6 ± 6.6	23.9 ± 3.6	4.7 ± 0.2	11.9 ± 1.0	8.1 ± 0.2	
			-	78.1 ± 4.5	38.3 ± 3.1	4.8 ± 0.2	10.8 ± 0.8	8.4 ± 0.1	
Exposition Ca		Réf. 1	-	42.9 ± 0.2	3.5 ± 3.2	4.5 ± 0.5	12.9 ± 0.8	8.2 ± 0.1	
			-	74.2 ± 0.5	6.6 ± 4.1	4.7 ± 0.2	11.9 ± 0.8	8.2 ± 0.6	
			-	115.5 ± 12.1	2.3 ± 1.9	4.3 ± 0.4	12.5 ± 0.8	8.1 ± 0.1	
		-	132.7 ± 17.4	2.6 ± 2.1	4.3 ± 0.4	12.7 ± 0.5	8.2 ± 0.2		
Exposition MOD (Suwannee River)		Réf. 3	1.1 ± 0.4	83.9 ± 1.1	1.7 ± 1.5	4.0 ± 1.1	16.6 ± 0.7	8.7 ± 0.3	
			1.7 ± 0.6	89.4 ± 1.6	3.5 ± 3.7	3.8 ± 1.1	16.6 ± 0.9	8.7 ± 0.4	
		2.6 ± 0.5	90.3 ± 1.4	7.2 ± 9.1	3.8 ± 1.0	16.5 ± 1.0	8.8 ± 0.3		
		4.8 ± 0.3	88.2 ± 1.3	6.3 ± 3.4	4.1 ± 0.8	16.6 ± 0.9	8.6 ± 0.4		
	8.5 ± 0.5	88.2 ± 0.5	9.4 ± 4.6	4.1 ± 0.7	16.7 ± 0.9	8.6 ± 0.5			

^a: MO: matière organique; LQ: limite de quantification (2µg.L⁻¹ pour le Zn); ND: écart type non déterminé. Dans certains cas l'écart type n'a pas pu être calculé puisque la moyenne correspondante a été calculée à partir d'un set de données comprenant 4 valeurs en dessous de la LQ.

^b: Moyenne calculée sur les 48h d'exposition (n=5) ± écart type. Lorsque la mesure est inférieure à la LQ, la valeur a été considérée comme égale à la LQ/2. Les valeurs en gras indiquent la plage de concentration testée pour chacun des paramètres.

2.3.2 Evaluation de la concentration en métal labile par DGT

Lors des expositions ^{62}Ni en présence de MOD, trois DGT ont été introduites dans les bacs, en début d'exposition, afin d'échantillonner la concentration en ^{62}Ni labile (Davison et Zhang, 1994). Les DGT, équipées de résines chelex, de gels restrictifs (0.78mm) et de filtres PES et PC ont été montées selon la méthode décrite par Tusseau-Vuillemin et al. (2007). Les systèmes DGT ont été immergés pendant 4h afin d'échantillonner une quantité de métal suffisante pour l'analyse, tout en limitant leur impact sur la concentration métallique totale dans les bacs. De plus, afin d'assurer un flux constant d'eau et limiter ainsi la couche de diffusion au voisinage du gel, des systèmes de pompe ont été mis en place dans les bacs. Après exposition, les résines ont été éluées dans 1 mL d' HNO_3 10% puis analysée par l'ICP-MS.



Figure 19: Bacs d'expositions et systèmes DGT mis en place lors des expérimentations ^{62}Ni en présence de matière organique.

2.4 Traitement des organismes

Les dreissènes ont été prélevées après 0, 10, 24 et 48h d'exposition. Une fois le byssus retiré, le tissu mou a été prélevé, pesé, lyophilisé puis minéralisé. La minéralisation a été effectuée à l'aide d'un bloc chauffant (Digi Prep) par des ajouts successifs d' HNO_3 et H_2O_2 . Le minéralisat a ensuite été analysé par spectrométrie d'absorption flamme ou four (Cd) ou par ICP-MS en mode CCT (Ni^{62}) au LSCE²⁰. La CCT (Collision Cell Technology) est une chambre à collision comprenant un mélange gazeux d'He et H_2 (93% / 7%) permettant de séparer les associations d'ions (ex: $\text{Ar}+\text{O}$ ou $\text{Ar}+\text{C}$) et limitant ainsi les interférences. Un matériel de référence (Mussel Tissue ERM-CE 278) a été utilisé afin de s'assurer de la validité du protocole de minéralisation. L'erreur moyenne sur ces mesures a été de 3% (Cd) et de 14% (Zn) par rapport à la valeur certifiée ($n=3$); ce qui a été considéré comme satisfaisant (le Ni n'est pas référencé).

²⁰ LSCE: Laboratoire des Sciences du Climat et de l'Environnement. UMR CEA-CNRS à Gif-sur-Yvette.

2.5 La mesure du taux de filtration: un indice de l'état physiologique des dreissènes

La mesure du taux de filtration n'étant pas possible en même temps que le suivi d'accumulation sans perturber soit les organismes, soit le milieu, cette mesure a été réalisée en parallèle des expositions, dans des milieux de composition identique (sans Cd ni ^{62}Ni). La mesure du taux de filtration est basée sur l'analyse de la décroissance en particules, ici des algues *Selenastrum capricornutum*, selon la relation suivante (Coughlan, 1969):

$$FR_{app} = \frac{V}{n.t} \ln \frac{C_0}{C_T}$$

FR_{app} : Taux de filtration apparent ($\text{mL.moule}^{-1}.\text{h}^{-1}$)

V : Volume d'exposition (mL)

n : Nombre de moule

t : Temps (h)

C : Concentration en algue (cellules.mL^{-1})

Bien qu'une agitation magnétique permanente assure l'homogénéité des béchers d'exposition, des contrôles ont été effectués sans organisme afin de mesurer une décroissance éventuelle d'algues, liée à la sédimentation. La concentration en algues a été mesurée par densité optique à 680 nm. La concentration initiale en algue (C_0) était de $1.10^6 \text{ cellules.mL}^{-1}$. Le taux de filtration a été estimé après 1h30 et 3h d'exposition de 5 dreissènes dans un bêcher de 500mL. Les essais ont montré que le temps d'exposition ne modifiait pas la valeur de FR.

Dans un souci de reproductibilité, pour les expositions au Cd, le taux de filtration a été mesuré à deux reprises dans le cas du Zn et du Ca, sur des lots différents de dreissènes. Etant donné la difficulté pour obtenir une solution de matière organique identique d'une fois sur l'autre, FR n'a été mesuré qu'une fois. Dans le cas des expositions au Ni, le FR a été mesuré une fois pour les différentes concentrations en Ca et 3 fois pour les différentes concentrations en MO²¹.

Cette mesure, nécessitant l'ajout de particules, n'est qu'un proxy du taux de filtration réel. En effet, FR dépend de la concentration en particule dans le milieu (Reeders et al., 1989). Cependant, cette mesure ayant été réalisée, à chaque fois, dans les mêmes conditions et avec les mêmes concentrations de départ en algue, nous avons supposé que les différences observées entre les taux de filtration étaient dues à la composition des milieux d'exposition.

3. RESULTATS

Le Cd et le ^{62}Ni ont été accumulés de façon significative et linéaire au cours du temps (voir la Figure 20 avec l'exemple du Cd en présence de différentes concentrations en calcium).

²¹ Mesure simultanée du taux de filtration sur plusieurs lots de dreissènes à partir d'une solution mère de MO.

Les constantes d'accumulation par voie dissoute (k_u), calculées à partir de ces cinétiques d'accumulation, sont représentées sur la Figure 21. L'augmentation de la concentration en Ca a significativement diminué k_u , d'un facteur 2 pour le Ni et d'un facteur 7 pour le Cd. En revanche, dans le cas du Zn, l'effet est différent selon le métal considéré. En effet, le Zn a diminué la constante d'accumulation du Cd alors qu'il a augmenté celle du Ni. Les résultats relatifs à l'exposition au Cd sont en accord avec l'effet inhibiteur du Zn sur l'accumulation et la toxicité du Cd souvent reporté dans la littérature (Attar et Maly, 1982; Komjarova et Blust, 2008; Spehar et al., 1978). L'effet du Zn sur l'accumulation et la toxicité du Ni est plus rarement reporté dans la littérature (Wang, 1987), néanmoins, il semble avoir plutôt un effet antagoniste. Contrairement à ce que l'on observe ici, il réduit la toxicité du Ni chez *Achyla sp.* (Babich et Stotzky, 1982) et l'accumulation du Ni chez *Daphnia magna* (Komjarova et Blust, 2008). L'effet de la MOD a été fonction de la concentration en carbone organique dissous que ce soit pour le Cd ou le Ni. Pour des concentrations faibles (inférieures à 1 ou 3 mgC.L⁻¹ selon le métal), la constante d'accumulation a augmenté, alors que pour des concentrations en MOD plus élevées, elle a diminué.

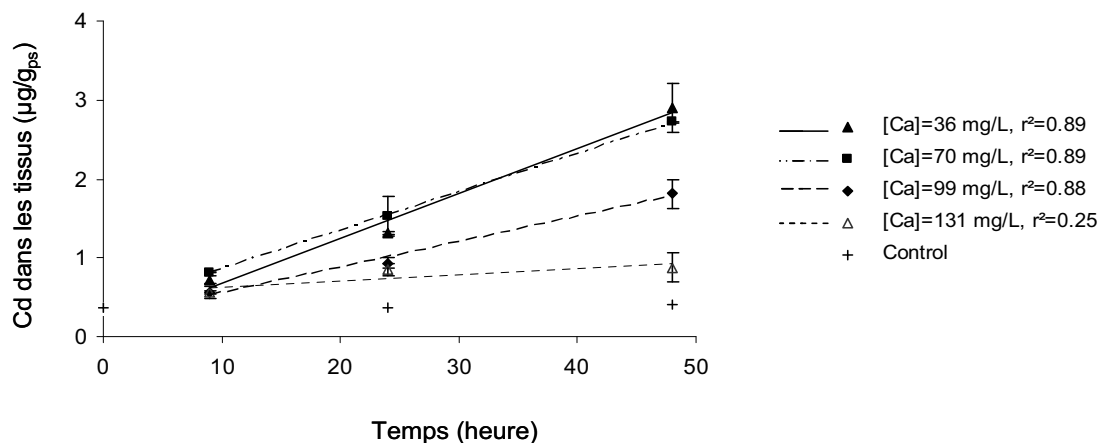


Figure 20: Cinétique d'accumulation du Cd par voie dissoute chez la dreissène en fonction de la concentration en calcium.

Le taux de filtration relatif a varié, au maximum, d'un facteur 1,6 pour le Zn, respectivement pour les expositions au Cd et au Ni, d'un facteur 2,6 et 1,03 pour le Ca, 5,9 pour les acides humiques Aldrich et 2,3 pour la MOD de la rivière Suwannee. Etant donné que l'écart entre deux mesures a atteint 50% (Figure 21 A et B) et que le taux de filtration mesuré dans le cas des expositions au Ni est constant en présence de Ca (Figure 21 E), nous avons considéré qu'il n'y avait pas d'effet du Ca et du Zn sur le taux de filtration²². Dans le cas des acides humiques (même si cette mesure n'a été faite qu'une fois à chaque concentration) et de la MOD Suwannee, les variations observées ont été considérées comme significatives. Notons que dans le cas de la matière organique

²² Dans le cas des expositions au Ni, l'influence du Zn sur le taux de filtration n'a pas été mesurée.

Suwannee, une différence statistique est obtenue entre les taux de filtration mesurés en présence de 2,6 et 4,8 mgC.L⁻¹ (Test de Kruskal Wallis, $p < 0,1$).

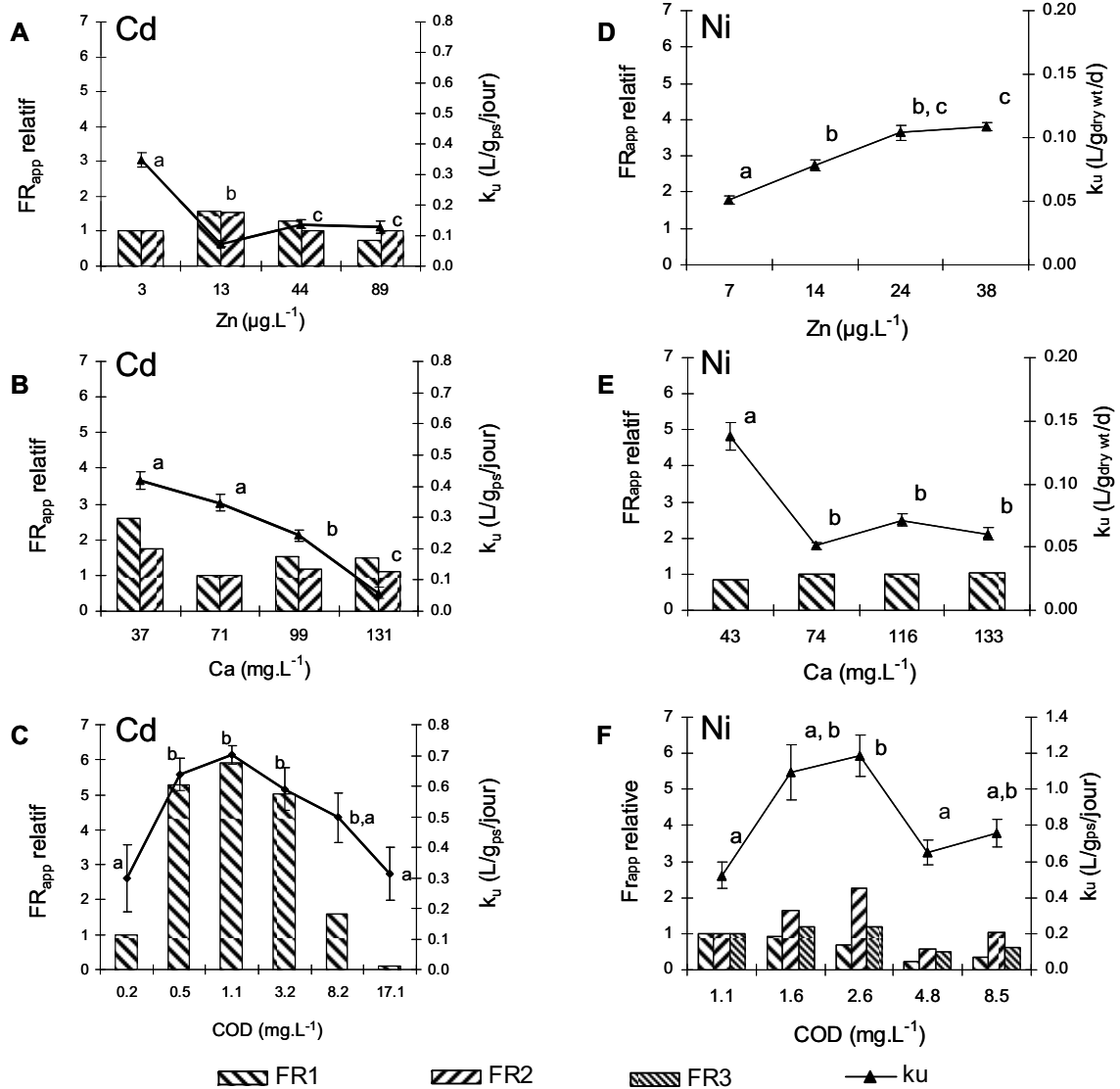


Figure 21: Effet du Zn (A et D), du Ca (B et E) et du COD (C et F) sur le taux de filtration (FR_{app}) et sur la constante d'accumulation par voie dissoute ($L \cdot g^{-1} \cdot jour^{-1}$) du Cd et du Ni. La matière organique dissoute testée est extraite de la rivière Suwannee dans le cas du Ni alors que ce sont des acides humiques Aldrich dans le cas du Cd. Les valeurs de k_u sont représentées avec leurs écarts types. Des lettres différentes font référence à des constantes d'accumulation significativement différentes ($p < 0,05$, z-test).

4. DISCUSSION

4.1 Prise en compte de la concentration en Zn et en Ca dans l'évaluation de k_u

La diminution de k_u en présence de Zn (dans le cas du Cd) et de Ca (dans le cas du Cd et du Ni) associé à un taux de filtration constant, nous conduit à interpréter cette inhibition non pas comme une modification physiologique de l'organisme mais plutôt comme une modification d'accessibilité du métal au niveau des sites de liaison membranaire.

Cet effet de compétition a été décrit par l'utilisation d'un modèle reprenant en partie le formalisme du BLM. On considère donc, ici, que le transfert du métal, de la solution vers l'organisme, se fait via la fixation des métaux sur des sites biologiques de la membrane (BL_{libre}):



Au cours des expériences, étant donné la faible contamination initiale des organismes et l'absence d'efflux métallique²³, on considère l'externalisation négligeable par rapport à l'internalisation. Le processus d'internalisation peut alors être simplifié selon:



Les concentrations en complexe $\{MBL\}$, en métal internalisé $\{M_{int}\}$ et en métal dissous $[M]$ sont alors données par:

$$\frac{d\{MBL\}}{dt} = k_1 \cdot \{BL\}_{libre} \cdot [M] - (k_{-1} + k_2) \cdot \{MBL\} \quad (10)$$

$$\frac{d\{M_{int}\}}{dt} = k_2 \cdot \{MBL\} \quad (11)$$

$$\frac{d[M]}{dt} = k_{-1} \cdot \{MBL\} - k_1 \cdot [M] \cdot \{BL\}_{libre} \quad (12)$$

où k_1 , k_{-1} and k_2 sont respectivement les constantes d'adsorption, de dissociation et d'internalisation. Les symboles $\{\}$ et $[\]$ correspondent respectivement à l'activité de surface et à l'activité des espèces dissoutes.

La concentration métallique mesurée dans les tissus mous (C_{org}) correspond à la somme des métaux adsorbés sur la membrane $\{MBL\}$ et internalisés $\{M_{int}\}$. Ainsi:

$$\frac{dC_{org}}{dt} = \frac{d\{MBL\}}{dt} + \frac{d\{M_{int}\}}{dt} = k_u \cdot [M] \quad (13)$$

En supposant l'adsorption rapide et l'internalisation lente (Campbell, 1995; Campbell et al., 2002), $\frac{d\{MBL\}}{dt}$ est nul, et $\frac{dC_{org}}{dt}$ se réduit à $\frac{d\{M_{int}\}}{dt}$. En reprenant l'Equation 11, k_u peut être exprimé comme:

²³ Constante d'élimination (k_e) du Cd (Roditi et Fisher, 1999) et du Ni (Mersch et al. 1993) très faible.

$$k_u = \frac{k_2 \cdot \{MBL\}}{[M]} \quad (14)$$

En supposant que la concentration en métaux dissous au voisinage de la membrane est constante tout au long de l'exposition (ce qui est corroboré par une concentration en Cd ou ^{62}Ni constante dans les bacs d'exposition), dans l'Equation 12, $\frac{d[M]}{dt}$ est égal à zéro. En

reprenant l'Equation 14, on obtient:

$$k_u = \frac{k_2 \cdot k_1}{k_{-1}} \cdot \{BL\}_{libre} \quad (15)$$

Comme décrit par Xue et al. (1988), la liaison du cation C_i au ligand biologique est caractérisée par sa constante d'affinité K_{C_iBL} :

$$K_{C_iBL} = \frac{\{C_iBL\}}{[C_i] \cdot \{BL\}_{libre}} \quad (16)$$

Plus cette constante d'affinité est grande, plus la capacité de compétition du cation est forte. La capacité de liaison maximale des sites membranaires $\{BL\}_{max}$ est la somme des sites actifs libres $\{BL\}_{libre}$ et les sites déjà occupés par le metal $\{MBL\}$ ou par les ions compétiteurs $\Sigma\{C_iBL\}$.

$$\{BL\}_{max} = \{BL\}_{libre} + \{MBL\} + \sum_i \{C_iBL\} \quad (17)$$

Pour des concentrations métalliques faibles ($\{MBL\} \ll \Sigma\{C_iBL\}$), on obtient à partir de l'Equation 16 et 17:

$$\{BL\}_{libre} = \{BL\}_{max} \cdot \left(\frac{1}{1 + \sum_i K_{C_iBL} \cdot [C_i]} \right) \quad (18)$$

Ainsi, en considérant à la fois l'Equation 15 et 18, on obtient:

$$k_u = k_{u,max} \cdot \left(\frac{1}{1 + K_{CaBL} \cdot [Ca] + K_{ZnBL} \cdot [Zn]} \right) \quad (19)$$

$$\text{avec } k_{u,max} = \frac{k_1 \cdot k_2 \cdot \{BL\}_{max}}{k_{-1}}$$

L'équation, ainsi établie, permet de relier directement la constante d'accumulation (k_u) à la concentration en Ca et en Zn. L'ajustement entre les constantes d'accumulation et l'Equation 19²⁴ a permis de déterminer les constantes d'affinité de liaisons. Dans le cas des expositions au Cd, nous avons obtenu $\log K_{ZnBL} = 7,4 \text{ M}^{-1}$ et $\log K_{CaBL} = 3,5 \text{ M}^{-1}$ ($r^2=0,67$, $n=8$), ce qui indique un effet inhibiteur du Zn plus fort que celui du Ca. Dans le cas des expositions au Ni, seul le Ca a eu un effet inhibiteur. Ainsi, l'ajustement a été réalisé avec les données obtenues lors de l'exposition en présence de différentes concentrations en Ca. Nous avons obtenu une constante de liaison K_{CaBL} très proche de celle déterminée précédemment: $\log K_{CaBL} = 3,6$ ($r^2=0,70$, $n=4$). La constante K_{CaBL} est

²⁴ Régression non-linéaire réalisée par l'utilisation du logiciel XL-Stat.

comparable à celle obtenue par Niyogi (2008) pour la truite arc-en-ciel en présence de Cd (i.e. 3,9) mais bien inférieure à celle obtenue pour le poisson *Pimephales promelas* (Playle et al., 1993). Dans le cas du Zn, la valeur est proche de celle obtenue par Vercauteren et Blust (1996) pour la moule *M. edulis* ($\log K_{ZnBL}=7,15$).

Notons que la plupart des études développent des modèles biologiques tels que le BLM à partir de tests de toxicité à l'équilibre ou n'exposent généralement qu'une partie de l'organisme (branchie) à de fortes concentrations métalliques. A l'inverse, ici, des organismes entiers ont été exposés à des concentrations environnementales et le paramètre d'intérêt fait référence à une mesure cinétique.

4.2 Effet de la matière organique sur l'accumulation du Cd et du Ni

L'effet de la matière organique, observé ici pour le Cd, est en accord avec deux études précédentes ayant des conclusions apparemment contradictoires (Roditi et al., 2000a; Voets et al., 2004). Voets (2004) a en effet conclu que l'accumulation du Cd était inhibée par 55 mg.L⁻¹ d'acides humiques (soit environ 23 mgC.L⁻¹) alors que Roditi (2000a) a observé une accumulation accrue du Cd en présence d'une faible concentration en COD²⁵ (entre 2,0 et 3,4 mgC.L⁻¹). Cet effet, fonction de la concentration de la matière organique, est illustré ici par la courbe en cloche de la Figure 21 C.

Afin d'évaluer le rôle de la spéciation sur l'accumulation du Cd et du Ni, le logiciel de spéciation Visual Minteq a été utilisé pour estimer la fraction de métal libre pour les différentes expositions de MOD. La concentration en Cd²⁺ a chuté de 81 à 1% avec l'augmentation de COD et celle de Ni²⁺, de 31 à 16%. L'évolution de k_u en fonction de la concentration en MOD étant différente de celle de la concentration en métal libre, k_u ne peut pas être relié directement à Cd²⁺ ou Ni²⁺, ou du moins la spéciation ne peut pas expliquer à elle seule l'évolution de k_u .

Le fait que FR et k_u suivent la même allure souligne le rôle majeur de la filtration dans les mécanismes d'accumulation, en particulier chez les bivalves (Wang et al., 1996). Cependant le rapport de k_u sur FR n'étant pas constant sur la gamme de COD testée, et l'allure de ce rapport n'étant pas semblable à celle de la concentration en métal libre, aucun de ces mécanismes (à savoir la complexation des métaux avec la MOD et la variation de FR) ne peut expliquer à lui seul le phénomène observé. Afin d'illustrer ces conclusions et essayer d'expliquer les variations de k_u , le modèle biodynamique a été utilisé selon l'équation suivante:

$$C_{org_48h} = k_u \cdot C_d \cdot t + C_0 \text{ avec } k_u = a' \cdot FR_{app} \quad (20)$$

avec C_{org_48h} la concentration en métal dans les dreissènes après 48h d'exposition, C_d la concentration en métal biodisponible, t le temps, C_0 la contamination initiale des tissus de dreissènes, a' l'assimilation par voie dissoute et FR_{app} le taux de filtration mesuré expérimentalement. Plusieurs simulations ont été réalisées selon la concentration en

²⁵ Matière organique issue d'extrait d'algue.

métal (concentration en métal dissoute totale ou concentration en métal libre) et en prenant en compte ou pas le taux de filtration. Les résultats du modèle ont été confrontés aux valeurs expérimentales (Figure 22).

Que ce soit dans le cas du Cd ou du Ni, prendre en compte le taux de filtration améliore la capacité prédictive du modèle. Pour les faibles concentrations en MOD (de 0 à 6,4 mgC.L⁻¹ dans le cas du Cd et de 0 à 3,2 mgC.L⁻¹ dans le cas du Ni) les concentrations en métal mesurées dans les tissus peuvent être expliquées à la fois par l'évolution du FR et la modification de spéciation. En effet, le modèle explique les valeurs observées si l'on considère que le métal biodisponible est une fraction comprise entre la fraction de métal total et la fraction de métal libre, ou proche de la fraction labile échantillonnée par DGT.

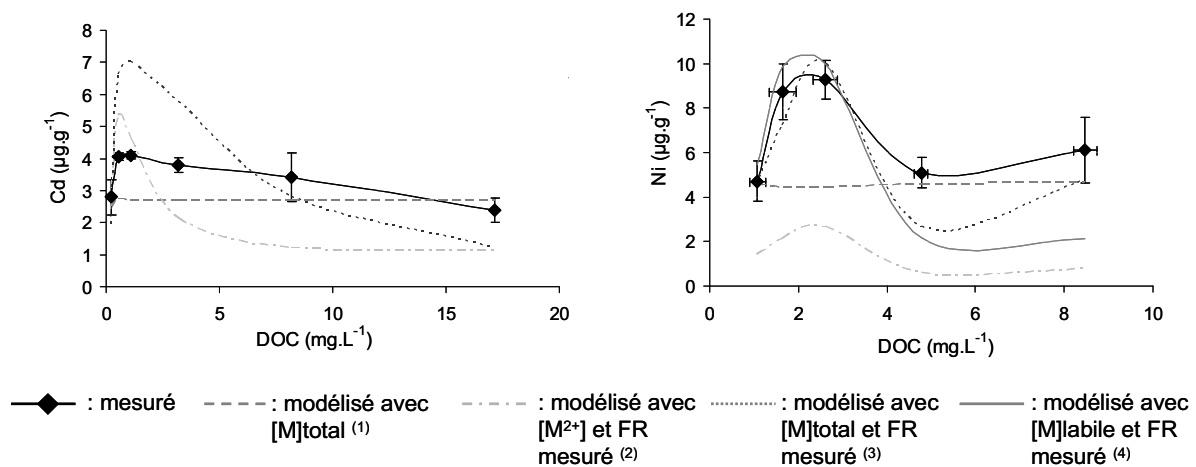


Figure 22: Concentration en métal accumulé dans les tissus de dreissène mesurée et prédite. Les prédictions ont été obtenues à partir du modèle biodynamique en considérant que:

- (1) le métal biodisponible est le métal total et k_u est constant et égal au k_u déterminé dans le milieu de référence
- (2) le métal biodisponible est la fraction libre et k_u est le produit de a' et de FR_{app} , FR_{app} étant la mesure expérimentale et a' la valeur moyenne obtenue à travers les différentes concentrations en COD testées
- (3) le métal biodisponible est le métal total et k_u est déterminé comme en (2)
- (4) le métal biodisponible est le métal labile²⁶ et k_u est déterminé comme en (2)

Cependant, pour des concentrations en COD supérieures à 6,4 mgC.L⁻¹ (Cd) ou 3,2 mgC.L⁻¹ (Ni) tous les modèles sous-estiment l'accumulation des métaux dans les tissus. Ainsi, un mécanisme autre que la modification de la spéciation ou du taux de filtration, influencerait l'accumulation du Cd et du Ni. Une des hypothèses serait que la présence de

²⁶ Concentration labile mesurée par DGT (gel restrictif) dans le cas du Ni uniquement.

MOD modifie la perméabilité de la membrane. En effet plusieurs autres études ont montré l'influence de la matière organique sur la physiologie des organismes (Slaveykova et al., 2003; Vigneault et al., 2000), la variation de la charge au niveau de la membrane plasmique étant supposée être à la source de cette modification de perméabilité (Myers et al., 1975). Les mécanismes ayant un rôle ont été identifiés mais pas totalement quantifiés, c'est pourquoi il n'a pas été possible au cours de ce travail d'intégrer l'effet de la MOD dans un modèle prédictif.

Afin de modéliser précisément l'effet de la MO, il conviendrait de faire des expérimentations supplémentaires. A défaut, nous considérons que la fraction biodisponible est la fraction labile telle que mesurée par DGT.

5. CONCLUSION

Les résultats de cette étude ont montré que l'accumulation du Cd et du Ni par voie dissoute était fortement influencée par la physico-chimie de l'eau (Ca, Zn et COD). Certains de ces paramètres (Ca et/ou Zn) ont pu être pris en compte dans l'évaluation des constantes d'accumulation par voie dissoute k_{u_Cd} et k_{u_Ni} grâce à un modèle de compétition. Ainsi, les relations suivantes ont pu être établies:

$$k_{u_Cd} = FR_{app} \cdot \frac{0.134}{1 + 10^{3.5} \cdot [Ca] + 10^{7.4} \cdot [Zn]} \quad (21)$$

avec k_u et FR_{app} en L.gps-1.j-1 et la concentration en ion en mol.L-1.

De même, dans le cas du Ni, k_u a été relié à la concentration en Ca selon l'équation suivante:

$$k_{u_Ni} = FR_{app} \cdot \frac{0.043}{1 + 10^{3.6} \cdot [Ca]} \quad (22)$$

Le paramètre MO, qui influence lui aussi fortement l'accumulation, n'a pas pu être pris en compte dans ce modèle puisque des mécanismes, autres que la modification de la spéciation et du taux de filtration semblent intervenir. Néanmoins, afin de prédire au mieux l'effet de la MOD, les résultats ont montré la nécessité de prendre en compte le taux de filtration.

La démarche utilisée a montré l'utilité d'intégrer le formalisme décrit dans le BLM au modèle biodynamique afin de mieux appréhender les mécanismes d'accumulation. Elle illustre également les nombreuses interactions possibles au sein des systèmes aquatiques. Cette approche mériterait d'être étendue à d'autres métaux et paramètres chimiques, pour une détermination encore plus fine de l'accumulation par voie dissoute.

Chapitre 3: Accumulation des métaux par voie trophique

1. INTRODUCTION

Le comportement alimentaire des bivalves est primordial dans les mécanismes d'accumulation des métaux (cf. Chapitre 1). De nombreuses études rapportent la capacité de sélection des dreissènes vis-à-vis de leur nourriture. L'assimilation des métaux dépendrait à la fois de la qualité et de la quantité de nourriture mais également du métal considéré (Decho et Luoma, 1996; Roditi et Fisher, 1999). Les estimations du modèle biodynamique (du point de vue trophique) pourraient alors être faussées si la qualité et la quantité de nourriture n'étaient pas convenablement prises en compte. Il convenait donc d'étudier en laboratoire les mécanismes d'accumulation des métaux par voie trophique tout en considérant ces deux aspects.

Ainsi, nous nous sommes intéressés aux deux paramètres du modèle biodynamique décrivant l'accumulation des métaux par voie trophique: le taux d'ingestion (IR) qui correspond à la quantité de nourriture ingérée par un organisme, et l'efficacité d'assimilation (AE) qui correspond au pourcentage de métal ingéré assimilé par l'organisme. Les métaux étudiés ici sont le cadmium, le cuivre, le chrome et le nickel.

Les enjeux de cette étude étaient multiples. Dans un premier temps, l'enjeu a consisté à mettre au point, au laboratoire, un protocole expérimental permettant de calculer AE. Nous avons choisi la technique du "pulse chase feeding" couplée à l'utilisation d'isotopes stables des métaux. Sur la base des protocoles déjà existants dans la littérature, il fallait donc:

- déterminer un protocole de dopage de la nourriture permettant d'obtenir une contamination homogène en métaux,
- mettre au point un système pour collecter les fèces et ainsi suivre le passage de la nourriture contaminée dans les organismes,
- dimensionner l'exposition de façon à analyser de façon fiable les concentrations métalliques dans les diverses matrices (nourriture, dreissène et fèces)
- assurer une exposition constante des organismes, à la fois en terme de qualité et de quantité de nourriture.

Suite à cela, l'objectif, était de mieux comprendre l'influence de la qualité et de la quantité de nourriture sur l'accumulation des métaux, dans l'objectif d'intégrer ces paramètres physico-chimiques au modèle biodynamique.

2. MATERIELS ET METHODES

Les dreissènes (20-22mm) ont été prélevées dans le canal de la Meuse à Commercy en juillet 2009 et ont été acclimatées de la même façon que celle décrite dans le chapitre précédent.

2.1 Principe de l'expérience

2.1.1 Choix de la nourriture

Afin d'observer les grandes tendances du comportement alimentaire des dreissènes, la qualité de la nourriture devait être contrastée. Nous nous sommes donc tournés vers un mélange de particules organiques et inorganiques. Les algues (*Selenastrum capricornutum*) et les particules minérales de kaolinite ont été choisies pour représenter ces deux catégories. Les concentrations en nourriture ont été déterminées de façon à minimiser l'effet de sélection de la nourriture dans un cas (i.e. exposition à faible concentration de nourriture limitant la production de pseudo-fèces²⁷) et le favoriser dans l'autre (i.e. exposition à plus forte concentration). En effet, la capacité de sélection des dreissènes (observée via la production de pseudo-fèces) est en général réduite à faible concentration de nourriture (Bayne, 1993), probablement afin de satisfaire au maximum leurs besoins énergétiques. Des expositions préliminaires en laboratoire ont permis de contrôler la production de pseudo-fèces en présence de différentes concentrations de matière en suspension (MES), et ainsi, de déterminer les concentrations de nourriture les plus appropriées pour les expositions, à savoir 3 et 15 mg.L⁻¹.

2.1.2 Déroulement de l'expérience

Le principe de l'expérience repose sur la méthode du "pulse-chase feeding" combinée à l'utilisation d'isotopes stables des métaux. Les dreissènes ont été exposées pendant une courte période à de la nourriture contaminée en isotopes stables: ⁶²Ni, ⁶⁵Cu, ¹⁰⁶Cd et ⁵³Cr. Ces isotopes stables, de par leur abondance naturelle minoritaire (respectivement 3,6%, 30,8%, 1,2% et 9,5%), permettent de s'affranchir des contaminations métalliques antérieures des tissus et de suivre une variation de la contamination des tissus même très faible. S'ensuit une phase de dépuración pendant laquelle les fèces ont été collectées afin de suivre le passage de cette nourriture contaminée à travers le système digestif des organismes. Suite à cette phase de dépuración, les tissus mous ont été collectés puis analysés afin de mesurer la quantité de métaux internalisée et ainsi en déduire l'efficacité d'assimilation (AE) de chacun des métaux.

Le suivi des métaux dans les fèces a permis de vérifier qu'en fin de phase de dépuración, il ne restait plus de nourriture contaminée par des isotopes stable dans le système

²⁷ Particules non ingérées, englobées dans du mucus et rejetées sous forme d'agglomérats.

digestif des organismes et que, par conséquent, tout le métal isotopique mesuré dans les tissus des dreissènes correspondait bien au métal assimilé par l'organisme.

2.2 Dopage en isotopes stables de la nourriture

Le protocole de contamination des algues a été mis au point sur la base du protocole décrit par Geffard et al. (2008) et des constantes de répartition obtenues dans la littérature (Bossuyt et Janssen, 2004; Bossuyt et Janssen, 2005; Sloof et al., 1995; Wolterbeek et al., 1995). Après 4 jours de culture des algues dans un milieu sans Cu, Zn ni EDTA, les algues ont été exposées à un milieu contaminé en isotopes stables (Eurisotope, Saclay, France) selon les concentrations suivantes: 500 $\mu\text{g.L}^{-1}$ de ^{62}Ni , 740 $\mu\text{g.L}^{-1}$ de ^{65}Cu , 200 $\mu\text{g.L}^{-1}$ de ^{106}Cd et 29 $\mu\text{g.L}^{-1}$ de ^{53}Cr pendant 24 heures. Les solutions isotopiques étant acides, le pH a été réajusté par ajout de soude suite au dopage en métaux.

Les particules de kaolinite, ont été dopées suivant le protocole d'Arifin et Bendell-Young (2000). Ainsi, 25 mg de kaolinite (Kaolin blanc product, Prolabo) ont été mis dans 500mL d'eau Valvert pendant 24 heures avec agitation (350 tr.min^{-1}). Les métaux ont ensuite été introduits à raison de 54 $\mu\text{g.L}^{-1}$ de ^{62}Ni , 14 $\mu\text{g.L}^{-1}$ de ^{65}Cu , 10 $\mu\text{g.L}^{-1}$ de ^{106}Cd et 75 $\mu\text{g.L}^{-1}$ de ^{53}Cr . Le pH a également été réajusté par ajout de soude suite au dopage. Le bécher a alors été passé dans un bain à ultrason pendant 5min afin d'obtenir un mélange homogène. Après 24 heures, le mélange de kaolinite a été dilué dans un volume de 2L et laissé à équilibrer pendant 4 jours.

Suite à cela, les particules d'algues et de kaolinite ont été filtrées sur un filtre polycarbonate (PC) 0,4 μm puis remises en suspension dans 300 mL d'eau minérale Valvert pour être utilisées comme nourriture pour les dreissènes.

Un prélèvement de chacune des solutions d'algue et de kaolinite a été effectué sur filtre PC (0,4 μm) afin de déterminer la contamination effective de la nourriture. Dans le cas des algues, un échantillon supplémentaire a subi un bain d'EDTA (3 mmol.L^{-1} , 10 minutes, pH ajusté à 8) afin de distinguer les métaux adsorbés des métaux internalisés (Bates et al., 1982; Hassler et al., 2004; Knauer et al., 1997).

2.3 Conditions expérimentales

2.3.1 Exposition par voie trophique

Les dreissènes ont été exposées pendant 2 heures à de la nourriture contaminée de différentes qualités (mélange de kaolinite et d'algues comportant 0, 33, 66 ou 100%

d'algues) et de différentes concentrations (3 et 15 mg.L⁻¹) (Tableau 7). Chaque béccher contenait 500 mL de milieu (eau Valvert) et 5 dreissènes. Le temps d'exposition des organismes à la nourriture contaminée (2h) a été déterminé pour permettre une contamination en métaux suffisante des fèces en vue de leur analyse²⁸ et pour éviter toute défécation pendant la période de contamination, susceptible de contaminer les organismes (c'est-à-dire en choisissant une durée d'exposition inférieure au temps de passage digestif).

Tableau 7: Caractérisation des différents milieux d'exposition. Chaque "x" correspond à un béccher. Le blanc correspond au témoin négatif, c'est-à-dire un milieu où les dreissènes sont exposées à de la nourriture non-contaminée.

		Qualité de la nourriture			
		100% kaolinite	66% kaolinite - 33% algues	33% kaolinite - 66% algues	100% algues
Quantité de nourriture	3mg/L	x	o (blanc) x	x	x
	15mg/L	x	x	x x	x

Des paniers, composés de tamis en nylon de porosité 100µm, ont permis une récupération facilitée des fèces tout en assurant une bonne circulation des particules dans le béccher par une agitation magnétique constante (Figure 23).

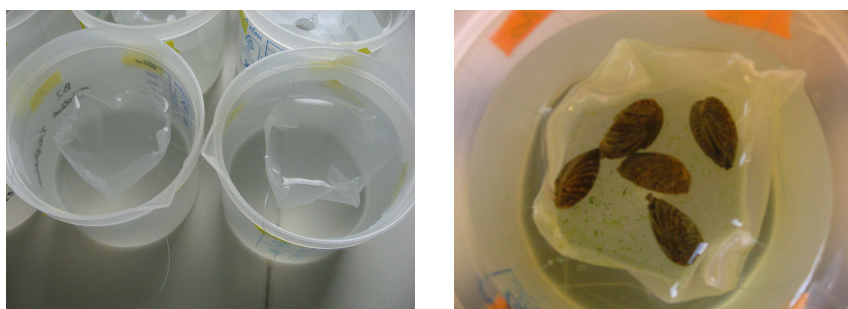


Figure 23: Béchers d'exposition des dreissènes à de la nourriture contaminée en isotopes stables.

Suite à la période de contamination, les dreissènes ont été rincées à l'eau minérale puis transférées dans un nouveau béccher non contaminé pour la phase de dépuración. Elles ont alors été nourries pendant 70h avec de la nourriture non contaminée présentant les mêmes caractéristiques trophiques (qualité et quantité) que pendant la phase d'exposition. Au cours de cette phase de dépuración, les fèces et les pseudo-fèces ont été collectées régulièrement (Figure 24) sur des filtres PC préalablement pesés.

²⁸ Ainsi, la durée d'exposition a été plus longue que celle choisie par Roditi (1999).

Que ce soit pendant la phase d'exposition ou celle de dépuration, les milieux ont été régulièrement redopés en particules afin de maintenir une concentration constante dans le béccher (Figure 24). Les concentrations en particules ont été déterminées en utilisant un compteur de particule Beckman Coulter Z1 DT.

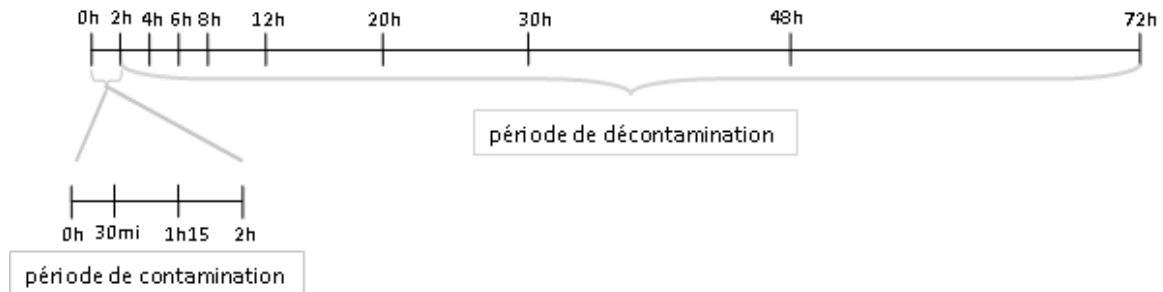


Figure 24: Dates de redopage en nourriture et de prélèvements des fèces.

Les tissus de dreissène ont été prélevés à la fin de la phase de dépuration. Des échantillons d'eau ont été régulièrement prélevés par filtration seringue 0,45µm que ce soit pendant la phase de contamination ou de décontamination.

Suite aux 2h de contamination une partie de chaque milieu d'exposition a été filtré sur filtre PC. Les filtres, chargés en particules, ont été analysés afin de vérifier la contamination de la nourriture en fin d'exposition pour chacun des bécchers. Le reste des milieux d'exposition a été filtré sur des filtres GFF préalablement grillés à 500°C afin de mesurer la fraction inorganique et organique dans les différents types de nourriture.

2.3.2 Contrôle d'une éventuelle exposition par voie dissoute

Suite à l'exposition par voie trophique, le milieu (filtré sur GFF) a été récupéré et utilisé afin d'évaluer l'accumulation éventuelle des métaux dissous résultant d'une désorption des métaux à partir des particules de nourriture. Ainsi, trois dreissènes ont été exposées à ce filtrat pendant 2h. Les tissus ont ensuite été prélevés et analysés.

2.4 Minéralisation des échantillons et analyse des concentrations métalliques

Les prélèvements d'eau ont été acidifiés à 1% avec d' HNO_3 . L'ensemble des échantillons solides de fèces, pseudo-fèces, tissus de dreissènes et particules de nourriture a été lyophilisé, pesé puis minéralisé. La minéralisation des échantillons a été faite par Digiprep, en utilisant un protocole comportant des ajouts successifs d' HNO_3 et H_2O_2 (cas des tissus de dreissènes) ou d' HNO_3/HCl et H_2O_2 (cas des fèces, pseudo-fèces et nourriture) (Lottin, 2009). Un matériel de référence a été utilisé afin de s'assurer de la validité du protocole de minéralisation (ERM-CE 278).

Les échantillons ont été analysés par ICP-MS (ThermoFisher Scientific) au LSCE pour l'ensemble des isotopes du Ni (^{58}Ni , ^{60}Ni , ^{61}Ni , ^{62}Ni et ^{64}Ni), du Cd (^{106}Cd , ^{108}Cd , ^{110}Cd , ^{111}Cd , ^{112}Cd , ^{113}Cd , ^{114}Cd et ^{116}Cd), du Cu (^{63}Cu et ^{65}Cu), du Cr (^{50}Cr , ^{52}Cr , ^{53}Cr et ^{54}Cr) et du Ge (^{72}Ge et ^{74}Ge). Afin de s'affranchir d'éventuelles variations de sensibilité de l'ICP-MS, les échantillons ont été dopés en étalon interne (Ge) avant l'analyse. Afin de limiter toutes interférences poly-atomiques l'ICP-MS a été utilisé dans la configuration CCT. L'intérêt de la CCT dans ce type de suivi a été montré lors des travaux précédents (Pellet, 2009).

Le matériel certifié SRM 1640 (NIST) a été utilisé pour contrôler la fiabilité de l'analyse.

2.5 Cadre d'interprétation

La quantité d'isotope ^{53}Cr , ^{62}Ni , ^{65}Cu et ^{106}Cd nouvellement accumulé a été déterminée selon Croteau et al. (2007). En prenant l'exemple du Cr, la concentration en ^{53}Cr a été calculée suivant l'équation:

$$[^{53}\text{Cr}]_{\text{ajouté}} = [^{53}\text{Cr}]_{\text{mesuré dans l'échantillon}} - [^{53}\text{Cr}]_{\text{initialement présent}} \quad (23)$$

$$[^{53}\text{Cr}]_{\text{ajouté}} = p^{53}\text{Cr} \cdot ([\text{Cr}]_{\text{évalué par } ^{53}\text{Cr}} - [\text{Cr}]_{\text{évalué par } ^{52}\text{Cr}}) \quad (24)$$

Où $p^{53}\text{Cr}$ est l'abondance naturelle du ^{53}Cr , $[^{53}\text{Cr}]$ est la concentration en isotope 53 du chrome et $[\text{Cr}]$ la concentration en élément chrome (tous les isotopes) évaluée soit par la masse de l'isotope 53 ou celle de l'isotope 52. L'abondance naturelle de chacun des isotopes a été calculée dans les solutions standards de calibration de l'ICP-MS. Elle correspond au rapport de l'intensité du signal d'un isotope sur la somme des intensités des signaux de tous les isotopes de l'élément. Il a été vérifié que ces abondances correspondaient à celle de la littérature.

Le taux d'ingestion (IR) a été déterminé comme la quantité de particules filtrées en une période de temps donnée (moins la production de pseudo fèces) rapporté au poids sec des tissus de dreissène ($\text{g} \cdot \text{g}_{\text{ps}}^{-1} \cdot \text{j}^{-1}$). L'efficacité d'assimilation (AE) a été calculée par le rapport entre la quantité de métal résiduelle dans les tissus de dreissène après 70h de dépuración et la quantité de métal ingéré.

Remarque: Différentes relations, en théorie équivalentes, ont été testées afin de calculer l'AE, que ce soit les relations issues de la méthode des ratios ou celles issues du bilan de masse (cf. Chapitre 1 4.2) (Croteau et al., 2007; Wang et Fisher, 1996). En pratique, dans cette étude, ces méthodes ont conduit à des résultats sensiblement différents puisque les bilans de masse réalisés sur l'expérience ont montré un déséquilibre entre l'entrée (i.e. la quantité de métal ingérée) et la sortie (i.e. les métaux assimilés, excrétés sous forme de fèces et de pseudo-fèces et désorbés dans la phase dissoute).

3. RESULTATS ET DISCUSSION

3.1 Contamination de la nourriture

Les concentrations en ^{62}Ni , ^{65}Cu , ^{106}Cd et ^{53}Cr dans les solutions d'algues et de kaolinite sont présentées dans le Tableau 8. Dans ce tableau, sont représentées les concentrations de différentes solutions: les solutions non contaminées avec le dopage en métal, les solutions mères utilisées pour doper les béciers d'expositions et les milieux après les 2h de contamination.

Tableau 8: Concentration ($\mu\text{g.g}_{\text{poids sec}}^{-1}$) en isotopes stables dans les algues et la kaolinite de différents milieux.

	^{53}Cr	^{62}Ni	^{65}Cu	^{106}Cd
Algues non contaminées	0.3	0.007	0.7	0.02
Solution mère d'algues contaminées	35	1089	3617	457
Milieux d'expositions	100% algue - 3mg.L ⁻¹	1.5	29	17
	100% algue - 15mg.L ⁻¹	12	115	68
Kaolinite non contaminée	0.07	0.006	0.4	0.1
Solution mère de kaolinite contaminée	50	0.3	3	0.2
Milieux d'expositions	100% kaolinite - 3mg.L ⁻¹	45	0.3	0.2
	100% kaolinite - 15mg.L ⁻¹	54	0.2	4

Plusieurs points importants peuvent être soulignés:

- La contamination de la nourriture a été importante. Les concentrations en métaux ont été plus élevées dans les solutions mères ayant servi à la contamination des milieux et dans les milieux d'exposition eux-mêmes (mesure effectuée à T=2h) que dans les solutions non contaminées.
- Les algues ont été bien plus contaminées que la kaolinite, exception faite du chrome où les ordres de grandeur sont sensiblement les mêmes. La contamination des algues dans les milieux d'exposition a été, en moyenne, supérieure d'un facteur 300, 400 et 150 pour le Ni, le Cu et le Cd. Les AE calculées par la suite pour le Ni, le Cu et le Cd reflètent donc essentiellement l'assimilation des métaux à partir des algues.
- La contamination des algues a été bien inférieure dans les milieux d'exposition, en comparaison des solutions mères. De plus, des concentrations significatives en métaux dissous ont été mesurées dans l'eau. Ainsi, les variations de contamination mesurées pourraient s'expliquer, au moins en partie, par une désorption des métaux, des algues vers la phase dissoute. Cette hypothèse est corroborée par l'analyse de la répartition des métaux dans les algues (Figure 25). En effet, la majorité des métaux ont été présents dans la fraction extracellulaire (respectivement 86, 60, 83 et 95 % pour le ^{62}Ni , le ^{65}Cu , le ^{106}Cd et le ^{53}Cr).

- A l'inverse, dans le cas de la kaolinite, il ne semble pas y avoir eu désorption des métaux puisque pour l'ensemble des métaux, les concentrations ont été, quasiment, identiques entre la solution mère et les solutions d'expositions.

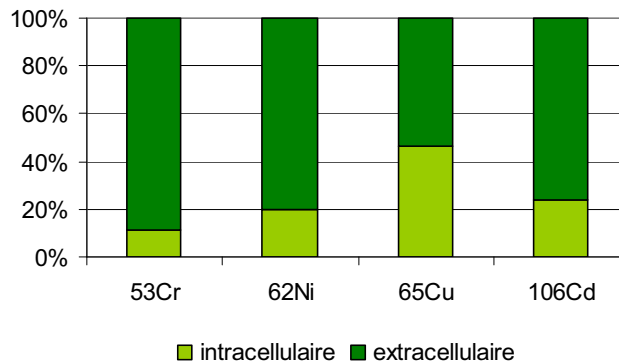


Figure 25: Répartition intra et extracellulaire des métaux dans les algues.

3.2 Contamination de l'eau et des dreissènes par voie dissoute

Des prélèvements dans la phase dissoute ont permis de vérifier la désorption des métaux présents sur les particules. Les concentrations en métaux dissous (Figure 26) dans l'eau ont augmenté au cours de la phase d'exposition par voie trophique. Ces concentrations, qui étaient respectivement dans le contrôle de 0,027, 0,053, 0,014 et 0,002 $\mu\text{g.L}^{-1}$ pour le ⁶²Ni, ⁶⁵Cu, ¹⁰⁶Cd et ⁵³Cr ont atteint au maximum 7, 3, 4 et 0.1 $\mu\text{g.L}^{-1}$ selon les milieux. A l'exception du chrome, les concentrations en métaux dans l'eau ont été d'autant plus grandes que la nourriture contaminée était riche en algue.

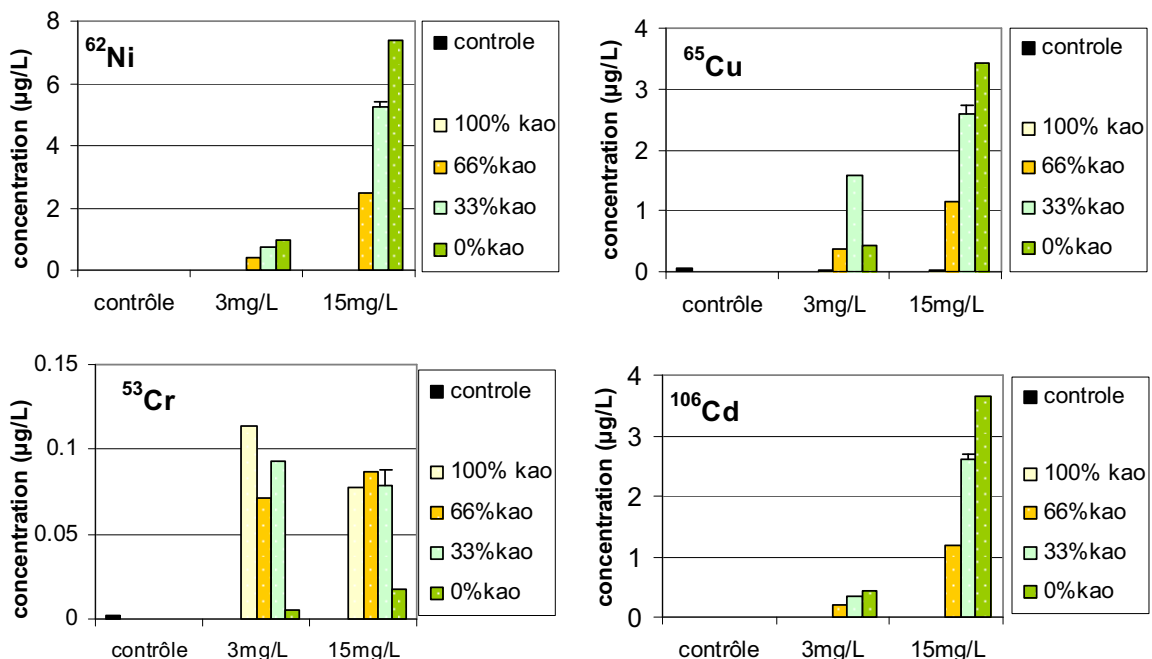


Figure 26: Concentration en ⁶²Ni, ⁶⁵Cu, ¹⁰⁶Cd et ⁵³Cr ($\mu\text{g.L}^{-1}$) dans la phase dissoute des milieux après 2h d'exposition.

Les dreissènes exposées 2h au filtrat ont accumulé les métaux (Figure 27), ce qui tend à montrer que les dreissènes exposées 2h à de la nourriture contaminée ont aussi accumulé les métaux par voie dissoute.

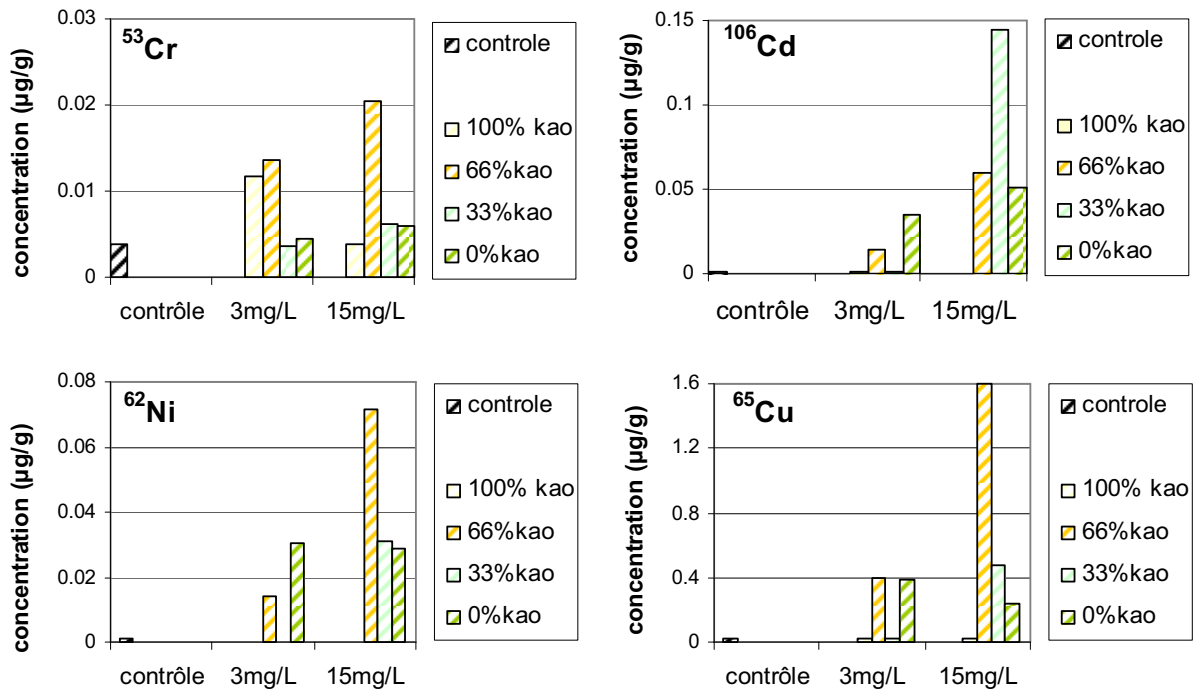


Figure 27: Concentration en ^{62}Ni , ^{65}Cu , ^{106}Cd et ^{53}Cr ($\mu\text{g}\cdot\text{g}_{\text{ps}}^{-1}$) dans les tissus de dreissènes exposées 2h au filtrat des différents milieux.

3.3 Taux d'ingestion des dreissènes

Les taux d'ingestion (IR) ont été plus faibles dans les milieux les moins concentrés quelle que soit la qualité de la nourriture considérée (Figure 28). A faible teneur en MES, le taux d'ingestion semble diminuer quand la qualité organique de la nourriture augmente, alors qu'il reste plus constant à plus forte teneur en MES.

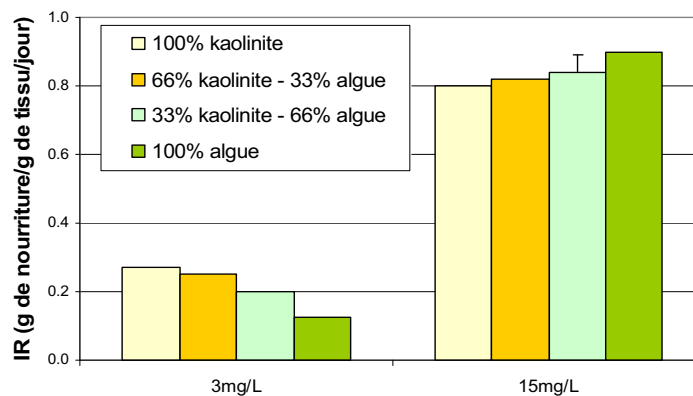


Figure 28: Taux d'ingestion (IR) des dreissènes ($\text{g}_{\text{nourriture_poids_sec}} \cdot \text{g}_{\text{tissu_poids_sec}}^{-1} \cdot \text{j}^{-1}$) au cours de la phase d'exposition.

3.4 Contamination des fèces

L'utilisation d'isotopes stables a permis de suivre le passage de la nourriture contaminée à travers les organismes par le dosage dans les fèces. Ce dosage a montré une contamination dans les fèces qui diminue au cours du temps. Les métaux ingérés ont été excrétés dès le premier prélèvement de fèces, c'est-à-dire dès la fin de la phase d'exposition (Figure 29). Ainsi la durée de transit intestinal (gut retention time: GRT) a été inférieure à la durée d'exposition par voie trophique (i.e. 2h), ce qui a pour conséquence d'approximer l'évaluation du gut passage time²⁹ (GPT) de 2h.

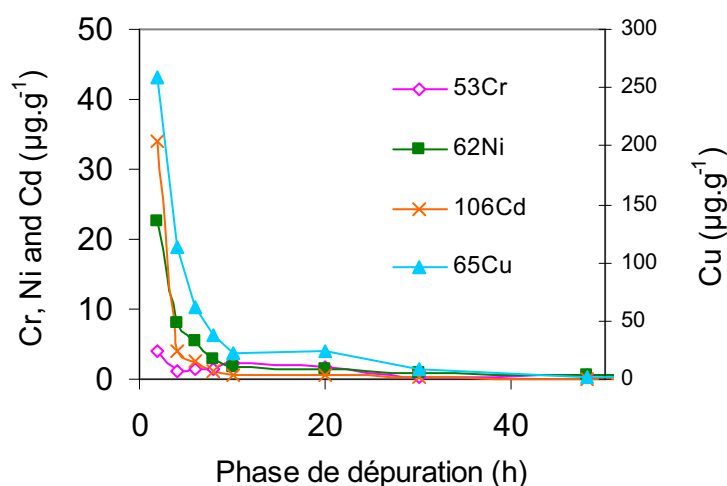


Figure 29: Suivi de la contamination des fèces ($\mu\text{g}\cdot\text{g}_{\text{poids_sec}}^{-1}$) excrétés par les dreissènes exposées à $3\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ d'algues contaminées.

Remarque: Les cinétiques de décontamination des fèces n'ont pas été exactement les mêmes selon le métal considéré. La méthode des ratios, décrite dans le Chapitre 1: 4.2.2, ne peut pas être utilisée par un dosage de contamination dans un unique échantillon de fèces. Néanmoins, en théorie, calculer ce ratio sur l'ensemble des fèces regroupées en pool permet de pallier à ce problème.

A partir des cinétiques de décontamination obtenues par l'analyse des métaux dans les fèces, le temps de passage digestif (GPT) a été calculé. Les résultats, présentés dans le Tableau 9, n'ont pas permis de mettre en évidence de corrélation entre ce temps de passage de la nourriture contaminée et les caractéristiques de la nourriture, bien que dans la littérature cette relation ait été observée (Roditi et Fisher, 1999; Wang et Fisher, 1996).

²⁹ Temps nécessaire pour que 90% des métaux excrétés se retrouvent dans les fèces.

Tableau 9: Temps de passage de la nourriture contaminée (gut passage time) en Cr, Ni, Cu et Cd (h) dans les différents milieux d'exposition.

		Cr	Ni	Cu	Cd
3mg/L	66% kaolinite - 33% algues	19	22	8	13
	33% kaolinite - 66% algues	8	38	7	6
	100% algues	58	51	20	6
15mg/L	66% kaolinite - 33% algues	3	7	7	6
	33% kaolinite - 66% algues	48 ± 6	23 ± 19	8 ± 2	24 ± 23
	100% algues	47	8	9	9

3.5 Efficacité d'assimilation

Etant donné la contamination très largement supérieure des algues par rapport à la kaolinite (Tableau 8), les efficacités d'assimilation calculées se réfèrent toutes (sauf pour le Cr) aux assimilations à partir des particules algales. En effet, sur l'ensemble des expériences réalisées avec différents mélanges d'algue et de kaolinite, l'apport de métaux par la kaolinite a représenté au maximum 2% de l'apport total (exception faite du chrome). Les AE faisant référence au milieu 100% kaolinite ne seront donc pas traitées par la suite.

L'assimilation du chrome reflète à la fois l'assimilation à partir des algues et de la kaolinite, étant donné que la contamination en Cr de ces deux types de particule est du même ordre de grandeur.

3.5.1 Prise en compte de l'accumulation par voie dissoute

Etant donné l'accumulation effective des dreissènes par voie dissoute, la contamination dans les tissus exposés par voie trophique a été corrigée à l'aide des données d'expositions par voie dissoute (cf. 3.2). Pour ce faire nous disposons des résultats de contamination par voie dissoute mesurés après 2h d'exposition. Or la contamination par voie trophique a été mesurée après 2h d'exposition et 70h de dépuración. Il convenait donc d'appliquer une phase de dépuración théorique aux tissus contaminés par voie dissoute. Cette estimation a été réalisée en suivant la cinétique de dépuración décrite dans le modèle biodynamique:

$$\frac{dC_{org}}{dt} = -k_e \cdot C_w \quad (25)$$

$$\text{D'où } C_{org-72h} = C_{org-2h} \cdot e^{-k_e \cdot t} \quad (26)$$

Où C_{org} est la concentration en métaux dissous accumulés dans les tissus ($\mu\text{g} \cdot \text{g}_{ps}^{-1}$), k_e la constante de dépuración (jour^{-1}) et t le temps (jour) correspondant ici à 70h (i.e. 2,9 jours). Les constantes de dépuración k_e ont été obtenues dans la littérature pour chacun des métaux (i.e. $0,011 \text{ j}^{-1}$ pour le Cd et le Cr, $0,019 \text{ j}^{-1}$ pour le Ni et $0,022 \text{ j}^{-1}$ pour le Cu) (Mersch et al., 1993; Roditi et Fisher, 1999; Zarogian et Johnson, 1984).

La Figure 30 présente les concentrations en métaux dans les tissus de dreissènes ($\mu\text{g}\cdot\text{g}_{\text{ps}}^{-1}$) exposées par voie trophique et/ou dissoute (corrigées et non corrigées).

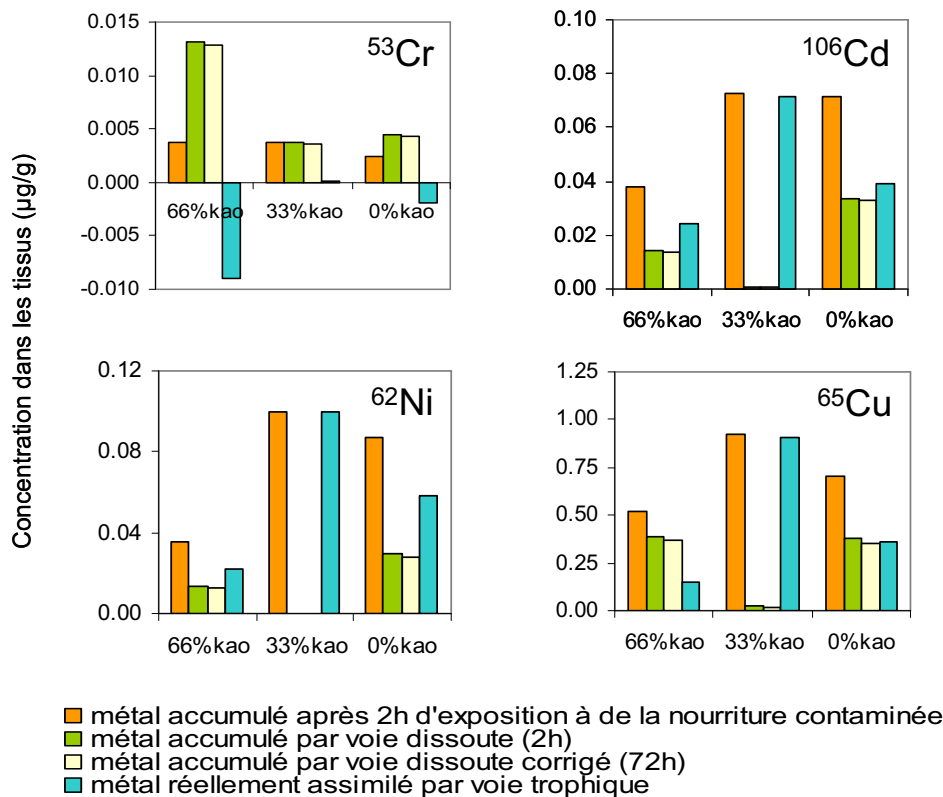


Figure 30: Concentrations en métal accumulés dans les tissus de dreissènes ($\mu\text{g}\cdot\text{g}_{\text{ps}}^{-1}$) par voie dissoute et/ou trophique dans les milieux à $3\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ (100%, 66%, 33% et 0% de kaolinite).

3.5.2 Efficacité d'assimilation et taux d'ingestion

Une variation de la contamination de la nourriture a pu être mise en évidence pour chaque type d'exposition, suite au dosage métallique dans les algues, la kaolinite et les béciers d'exposition. L'efficacité d'assimilation a été calculée à partir de la contamination dans la nourriture mesurée dans le bécier. Cette donnée paraissait, en effet, être la plus adaptée. Notons néanmoins que la variabilité sur la mesure de contamination de la nourriture induit une forte incertitude sur l'efficacité d'assimilation.

L'AE a été calculé sur la base des données de bioaccumulation par voie trophique corrigées de l'accumulation par voie dissoute. Cette correction a dans quelques cas abouti à une AE négative, en particulier dans le cas du Cu et du Cr.

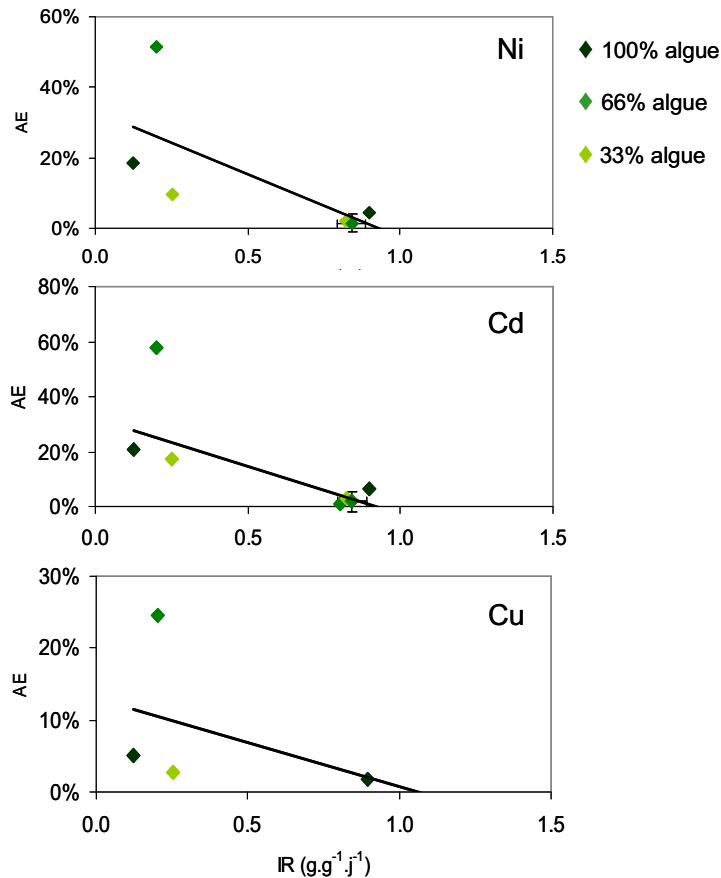


Figure 31: Efficacité d'assimilation (AE) du ^{62}Ni , ^{65}Cu et ^{106}Cd (%) en fonction du taux d'ingestion (IR) ($\mu\text{g}_{\text{ps}}^{-1} \cdot \text{g}_{\text{ps}}^{-1} \cdot \text{j}^{-1}$).

Le chrome a été le métal présentant la plus faible assimilation (<0,1%) quel que soit le milieu considéré, ce qui montre que ce métal peut être utilisé comme traceur inerte de la contamination. Le Cd a montré une assimilation supérieure par rapport à l'ensemble des métaux étudiés: $\text{AE}_{\text{Cd}} > \text{AE}_{\text{Ni}} > \text{AE}_{\text{Cu}} \gg \text{AE}_{\text{Cr}}$ (Figure 31). Les résultats d'assimilation pour le Cd (2-58%) et le Cr (>0,1%) sont aussi variables que ceux observés par Roditi (1999) pour la moule zébrée avec différents types de nourriture (i.e. respectivement 19-72% et 2-19% pour le Cd et le Cr).

D'après l'étude de Reinfelder et al. (1997), l'AE est proportionnelle à la fraction métallique présente dans le cytoplasme du phytoplancton. De ce fait, pour une quantité de nourriture donnée, un enrichissement de la nourriture en algues aurait potentiellement pu augmenter l'AE des métaux à partir des algues. Cependant nos résultats n'ont montré aucune relation claire entre l'AE des métaux (à partir des algues) et la qualité de la nourriture (exprimée en pourcentage de carbone). La répartition des métaux dans les algues au cours des expositions a été majoritairement extracellulaire, et pourrait expliquer cette absence de relation. Notons, de plus, que le temps d'exposition des dreissènes aux différents types de nourriture n'a peut-être pas été suffisant pour induire une réponse digestive des organismes spécifique de la qualité de nourriture (Navarro et

al., 2004; Navarro et al., 2003).

Pour l'ensemble des métaux, l'assimilation a été d'autant plus grande que le taux d'ingestion (IR) était faible (Figure 31), et donc que la quantité de particules était faible (Figure 28). Ceci pourrait s'expliquer par un temps de digestion accrue en présence d'une faible concentration de nourriture conduisant ainsi à une assimilation d'autant plus importante (Roditi et Fisher, 1999). Cependant, aucune corrélation claire n'a pu être mise en évidence entre AE et le temps de passage de la nourriture dans le système digestif (GPT). Cette hypothèse n'a donc pas pu être vérifiée.

4. CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES

Nous avons montré qu'il était possible de suivre le passage de la nourriture contaminée à travers les organismes grâce à un dosage fiable des métaux dans les fèces, par l'utilisation d'isotopes stables. Une étape clé du protocole a également été mise en évidence: la stabilité de l'exposition. Ce n'est pas tant la désorption des métaux à partir de la nourriture qui pose problème, puisque, dans notre cas, nous avons pu nous en affranchir avec une exposition en parallèle par voie dissoute, mais plutôt l'assurance d'une contamination homogène et stable de la nourriture. Les résultats obtenus n'ont pas permis de faire de lien entre la physicochimie des particules et l'efficacité d'assimilation. En effet, bien que les AE aient pu être corrélées au taux d'ingestion, aucune relation claire n'a pu être établie avec la qualité de la nourriture. Il ne nous paraît donc pas possible d'intégrer actuellement un modèle explicitant la physicochimie des particules au modèle biodynamique.

Cette étude nous a néanmoins permis d'estimer l'efficacité d'assimilation du Ni, du Cu, du Cd et du Cr à partir d'algues contaminées dans des milieux présentant différentes caractéristiques trophiques. Ainsi le chrome est apparu comme un élément très peu assimilé par rapport aux 3 autres métaux étudiés. Les assimilations ont été respectivement de 2%-58%, 2%-51%, 2%-25% et <0.1% pour le Cd, le Ni, le Cu et le Cr. Ces valeurs sont néanmoins soumises à une forte incertitude puisque la contamination de la nourriture, utilisée dans le calcul de l'AE, a été variable au cours de l'exposition.

Quelques pistes d'amélioration consisteraient à:

- modifier le protocole de dopage des algues, en faveur d'un temps de contact entre les algues et les métaux plus long. Ceci atténuerait l'effet de désorption des métaux vers la phase dissoute pendant l'exposition et assurerait une contamination stable des particules.
- mettre en place un système de circulation du milieu en continu afin d'éviter les variabilités d'exposition engendrées par des redopages ponctuels en particules. Ainsi, avec une exposition plus stable, des comportements alimentaires plus nets pourraient peut-être être observés.

Validation du modèle biodynamique par des suivis de bioaccumulation chez des dreissènes transplantées *in situ*

Chapitre 4: Influence des facteurs environnementaux sur la
bioaccumulation des métaux

Chapitre 5: Prise en compte des facteurs physiologiques dans un
suivi de bioaccumulation prolongé

Chapitre 4: Influence des facteurs environnementaux sur la bioaccumulation des métaux

1. INTRODUCTION

Dans ce chapitre, nous avons cherché à évaluer la capacité du modèle biodynamique à relier la contamination dans les tissus de dreissènes transplantées à la contamination du milieu. La difficulté à faire ce lien provient du fait que l'accumulation dans les organismes est modulée par des facteurs à la fois biotiques et abiotiques (cf. Chapitre 1:3). Dans cette étude nous nous sommes focalisés sur la capacité du modèle biodynamique à prendre en compte l'effet des facteurs environnementaux puisque le suivi *in situ* a été réalisé sur une période relativement courte (2 mois), nous permettant ainsi de nous affranchir de certaines modifications physiologiques de l'organisme en particulier dues à la ponte.

Ce suivi, de deux mois, a été réalisé sur le site atelier de l'Orge en région parisienne. Au cours de cette étude, différents paramètres ont été analysés; à la fois sur le milieu (physico-chimie, concentration en micropolluants) et sur les organismes transplantés (bioaccumulation, indice de condition). Bien que les contaminants métalliques soient au cœur de notre étude, nous nous sommes également intéressés à l'accumulation des hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP) dans les tissus de dreissènes. Cette étude s'inscrit dans une approche écotoxicologique intégrée puisque l'analyse de diverses réponses biologiques et marqueurs écotoxicologiques sont venus compléter les mesures de bioaccumulation et les mesures chimiques dans le milieu. Plusieurs collaborations ont permis d'étudier une palette très large de réponses biologiques:

- L'équipe d'écotoxicologie de l'Université de Reims s'est attachée à étudier les enzymes digestives³⁰ présentes dans la glande digestive et le stylet cristallin. Ces enzymes ont un rôle important dans le métabolisme digestif puisqu'une modification de leur activité ou de leur synthèse peut modifier l'énergie disponible pour l'organisme.
- L'équipe du Laboratoire des Interactions Ecotoxicologie Biodiversité Ecosystèmes (LIEBE) de l'Université de Metz a analysé l'activité de l'enzyme Glutathion-S-Transférase (GST). Cette enzyme est impliquée dans plusieurs processus de défense contre les contaminants et constitue donc un marqueur d'exposition.

³⁰ Les enzymes digestives étudiées ont été l'amylase et la cellulase.

- Les collègues du Cemagref d'Antony ont étudié la réponse génotoxique des organismes via le test comète et le test micronoyaux, afin d'évaluer l'intégrité de l'ADN au niveau moléculaire et chromosomique.

Cette étude, comprenant l'ensemble des résultats biologiques (bioaccumulation et biomarqueurs) a fait l'objet de l'Article 2. Dans ce chapitre nous nous focaliserons sur l'interprétation des données de bioaccumulation en lien avec la contamination chimique du milieu.

2. MATERIELS ET METHODES

2.1 Sites d'échantillonnage et déploiement des organismes

La campagne s'est déroulée du 20 mars au 15 mai 2008 sur le bassin de l'Orge. Ce bassin présente une variabilité d'occupation des sols relativement marquée avec un amont rural et un aval très urbanisé. Ceci lui confère un intérêt tout particulier dans l'étude des pressions anthropiques. Deux sites ont été étudiés (Figure 32): l'Orge à Athis-Mons à la confluence avec la Seine et la Renarde à Villeconin (91).

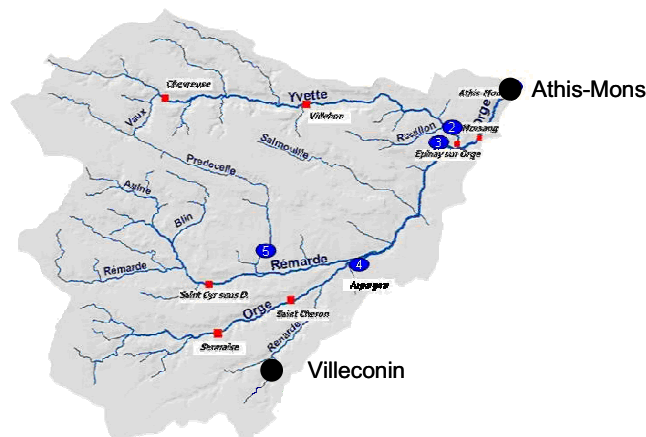


Figure 32: Sites d'études du bassin de l'Orge, Villeconin en amont et Athis-Mons en aval.

Les dreissènes ont été prélevées dans la Meuse la veille du déploiement sur les sites. Elles ont été calibrées (20-22mm), réparties dans des cages (Figure 33), puis transplantées sur les sites (Figure 32).



Figure 33: Dreissènes prélevées sur le site de référence, calibrées 20-22mm puis transplantées sur les sites d'étude dans des cages.

2.2 Prélèvements

La température a été suivie en continu grâce à des sondes (sonde température Hobo). Des prélèvements ponctuels ont été réalisés afin de mesurer les métaux totaux, particulaires et dissous, les HAP particulaires et dissous, le carbone organique dissous (COD) et particulaire (COP), la concentration en chlorophylle, phéopigments, ions majeurs et hydrogénocarbonates (TAC). Ces prélèvements ont été effectués toutes les 2 semaines. Le pH et la conductivité ont été mesurés *in situ* à chaque passage sur les sites. Les métaux labiles ont été évalués par le déploiement de DGT en 2 séries de 4 semaines. Les systèmes DGT (en triplicats) étaient constitués d'une résine chelex, d'un gel de diffusion restrictif et de 2 filtres (un filtre PES de 0,45 µm et un filtre PC de 0,4 µm).

Sur l'ensemble des dreissènes transplantées, 20 organismes ont été prélevés toutes les 2 semaines pour les analyses chimiques (métaux et HAP dans les tissus) et pour la mesure de l'indice de condition.

2.3 Traitement des échantillons au laboratoire

2.3.1 Analyses chimiques de l'eau et des dreissènes

La concentration en métaux dissous du milieu a été évaluée en filtrant 20mL d'eau à travers un filtre PES de porosité 0,45µm. L'échantillon est acidifié (1% HNO_3) puis analysé par ICP-MS au LSCE. Les échantillons destinés à l'analyse des métaux totaux et particulaire sont minéralisés par DigiPREP puis analysés en ICP-MS.

Les 20 dreissènes prélevées par site ont été congelées à -80°C puis lyophilisées. Cinq ont subi individuellement une digestion acide à froid puis ont été utilisées pour l'analyse des

métaux dans les tissus (analyse individuelle par ICP-AES au LEESU³¹). Les 15 restantes ont été poolées, réduites en poudre et ont servi à l'analyse des HAP. Les HAP ont été extraits par micro-onde dans un mélange acétone/heptane (v/v) (50/50) dopé en HAP deutérés (étalons internes). Suite à l'extraction par micro-onde l'échantillon a été filtré, purifié sur colonne de silice, concentré puis analysé par GC-MS. Ce protocole d'extraction a été validé par l'utilisation d'un matériel de référence (Mussel Homogenate IAEA-432).

2.3.2 Indice de condition

L'indice de condition (IC) est défini comme le rapport entre le poids des tissus mous et le poids total de l'organisme (comprenant la coquille). Il donne une idée de l'état de santé globale de l'organisme.

$$IC = \frac{\text{Masse tissus frais}}{\text{Masse tissus frais} + \text{masse coquille}} \quad (27)$$

3. RESULTATS ET DISCUSSION

3.1 Caractérisation des sites

3.1.1 Données physico-chimiques

Les paramètres qui caractérisent le niveau trophique de la rivière (i.e. MES, COD, COP et chlorophylle) ont été significativement plus élevés en aval qu'en amont. La concentration en chlorophylle, par exemple, a été 4 fois plus importante en aval, indiquant un enrichissement organique imputable à la pression urbaine (Billen et al., 2007; Tusseau-Vuillemin, 2001). Ces résultats se trouvent dans l'Article 2 en annexe.

3.1.2 Contamination métallique

Les concentrations en métaux dissous et totaux n'ont pas montré d'évolution au cours du temps (Figure 34). Elles ont été généralement plus variables sur le site aval, exception faite du zinc pour lequel des variations temporelles fortes sont observées sur les 2 sites. Les concentrations métalliques obtenues à Athis-Mons, notamment pour le Cu, le Zn, le Cd et le Pb, ont montré que ce site était très impacté par les activités urbaines (Tableau 10). Les concentrations dissoutes ont été comparables au niveau moyen de contamination de la Seine (Tusseau-Vuillemin, 2007). Seul le Cd dissous n'a pas pu être quantifié à Villeconin (LQ=10 ng.L⁻¹). Cependant, l'utilisation de DGT a permis de quantifier le Cd labile sur ce site (1,1 ng.L⁻¹).

³¹ LEESU: Laboratoire Eau Environnement et Systèmes Urbains, Créteil.

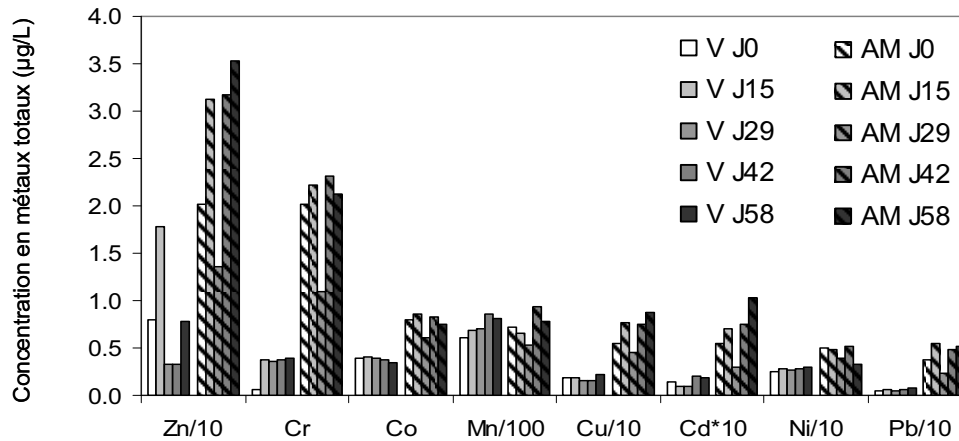


Figure 34: Concentration en métaux totaux dans le milieu ($\mu\text{g.L}^{-1}$) après 0, 15, 29, 42 et 58 jours d'exposition sur le bassin de l'Orge à Villeconin (V) et Athis-Mons (AM).

A partir de ces données, le pourcentage de métaux labiles par rapport aux métaux dissous a pu être calculé (Tableau 11). Ces valeurs sont cohérentes avec celles reportées par Tusseau-Vuillemin (2007) sur la Seine et la Marne, à savoir Co: 20-29%, Ni: 42-52%, Cu:25%, Cd: 29-37%. Il n'est pas apparu de différences marquées entre les sites bien que les ligands organiques présents dans le milieu ne soient probablement pas les mêmes entre l'amont et l'aval du bassin. En effet les teneurs en COD, ligands potentiels des métaux, sont presque deux fois plus fortes en aval à Athis-Mons qu'en amont. Notons que les écarts type sont relativement élevés pour le zinc, principalement dû fait de la variabilité de la concentration en Zn dissous dans le milieu.

Tableau 10: Concentrations en métaux totaux, dissous et labile ($\mu\text{g.L}^{-1}$) à l'amont et à l'aval du bassin de l'Orge. Moyenne pendant l'exposition \pm écart type, $n=5$ pour les concentrations totales et dissoutes. La concentration en métaux labiles a été déterminée par un jeu de 9 DGT ou de 6 DGT dans les cas indiqués par un astérisque. L'écart type a alors été calculé à partir d'une régression linéaire entre l'accumulation des métaux labiles et le temps. La limite de quantification (LQ) du Cd dissous est $0,01 \mu\text{g.L}^{-1}$.

	Villeconin (amont)			Athis-Mons (aval)		
	Total	Dissous	Labile	Total	Dissous	Labile
Zn	8.07 \pm 5.94	3.03 \pm 2.96	0.88 \pm 0.10	26.41 \pm 9.15	9.31 \pm 2.81	2.82 \pm 0.20*
Cr	0.31 \pm 0.14	0.22 \pm 0.09	0.04 \pm 0.01	1.95 \pm 0.49	0.32 \pm 0.07	0.09 \pm 0.02
Co	0.38 \pm 0.02	0.21 \pm 0.02	0.05 \pm 0.00*	0.77 \pm 0.10	0.32 \pm 0.05	0.06 \pm 0.00*
Mn	73.43 \pm 10.28	75.27 \pm 19.45	26.36 \pm 2.66*	72.41 \pm 15.08	42.25 \pm 5.27	12.47 \pm 0.88*
Cu	1.82 \pm 0.26	0.22 \pm 0.04	0.06 \pm 0.01	6.79 \pm 1.73	1.85 \pm 0.31	0.42 \pm 0.05
Cd	0.015 \pm 0.005	<LQ	0.001 \pm 0.000	0.066 \pm 0.027	0.010 \pm 0.003	0.002 \pm 0.000
Ni	2.76 \pm 0.13	1.25 \pm 0.06	0.17 \pm 0.02	4.45 \pm 0.80	1.95 \pm 0.51	0.46 \pm 0.04

Tableau 11: Pourcentage de métaux labiles par rapport aux métaux dissous à Villeconin (V) et à Athis-Mons (AM) au cours du premier et du second mois d'exposition (i.e. de 0 à 29 jours et de 29 à 58 jours). - : valeurs non disponibles car concentrations de métaux dissous ou labiles non déterminées.

	Cr	Mn	Co	Ni	Cu	Zn	Cd
V J0-29	29 ± 6	42 ± 11	26 ± 5	19 ± 1	40 ± 9	31 ± 30	-
V J29-58	9 ± 9	-	-	8 ± 3	19 ± 8	34 ± 17	-
AM J0-29	44 ± 15	31 ± 6	18 ± 3	26 ± 3	30 ± 8	36 ± 13	29 ± 15
AM J29-58	15 ± 7	-	-	22 ± 9	19 ± 6	-	12 ± 5

Remarque: Les DGT étaient habituellement déployées sur les sites pendant 15 jours. Lors de cette campagne, nous avons validé des essais sur une période d'un mois. Les résultats ont, en effet, montré une accumulation linéaire des métaux sur cette durée. La Figure 35 montre un exemple de données d'accumulation du nickel labile dans les DGT obtenues à Athis-Mons.

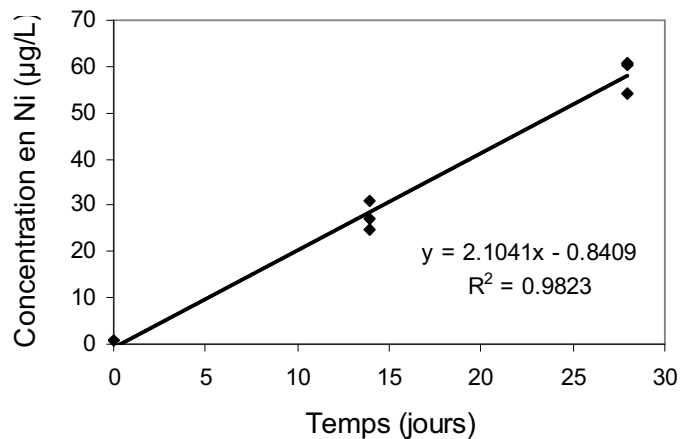


Figure 35: Nickel labile accumulé par les résines de DGT au cours du premier mois d'exposition et mesuré dans l'éluat ($\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) (exemple d'Athis-Mons de J0 à 29).

3.1.3 Contamination en HAP

Suite à des difficultés analytiques, les HAP dissous, particuliers et échantillonnés par les SPMD n'ont pas pu être quantifiés de façon fiable. Cependant, une autre étude (Teil et al., 2009), menées sur le bassin de l'Orge en parallèle de la notre, nous a permis d'évaluer le niveau de contamination en HAP de 2 sites: Roinville (en amont du bassin) et Viry-Chatillon (4 kms en amont d'Athis-Mons). Six HAP ont été dosés dans l'eau brute:

le Benzo(b)fluoranthène, le Benzo(k)fluoranthène, le Benzo(a)pyrène, le Dibenzo(a,h)anthracène, l'Indéno(1,2,3-c,d)pyrène et le Benzo(g,h,i)pérylène. Ces résultats montrent que le site aval est 4 à 5 fois plus contaminé que l'amont.

3.2 Bioaccumulation dans les organismes

3.2.1 Evolution du poids des organismes et de l'indice de condition

Les résultats ont montré une augmentation du poids des tissus sec de presque un facteur 2 en 2 mois à Athis-Mons alors qu'il est resté globalement stable à Villeconin (Figure 36). L'indice de condition des dreissènes a suivi cette même évolution.

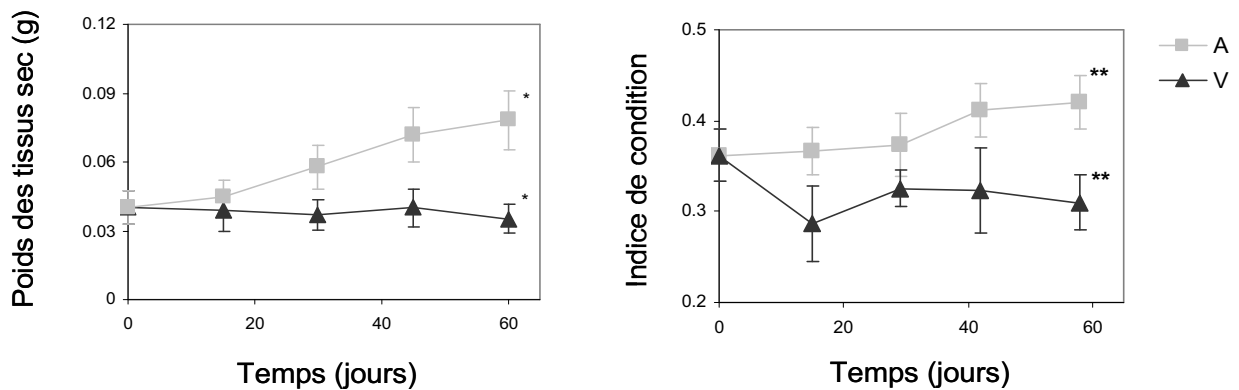


Figure 36: Evolution du poids des tissus sec(g) et de l'indice de condition au cours de l'exposition à Villeconin (V) et Athis-Mons (A). *: valeurs significativement différentes entre les 2 sites (Z-Test, $p < 0,1^*$, $p < 0,01^{**}$).

3.2.2 Bioaccumulation des métaux

Les concentrations en métaux dans les tissus de dreissènes n'ont pas montré de différence significative entre les deux sites étudiés, ni même de différence au cours de l'exposition (Figure 37). L'écart type, relativement important, représente la variabilité biologique (analyse individuelle de 5 dreissènes), et non pas simplement la variabilité analytique.

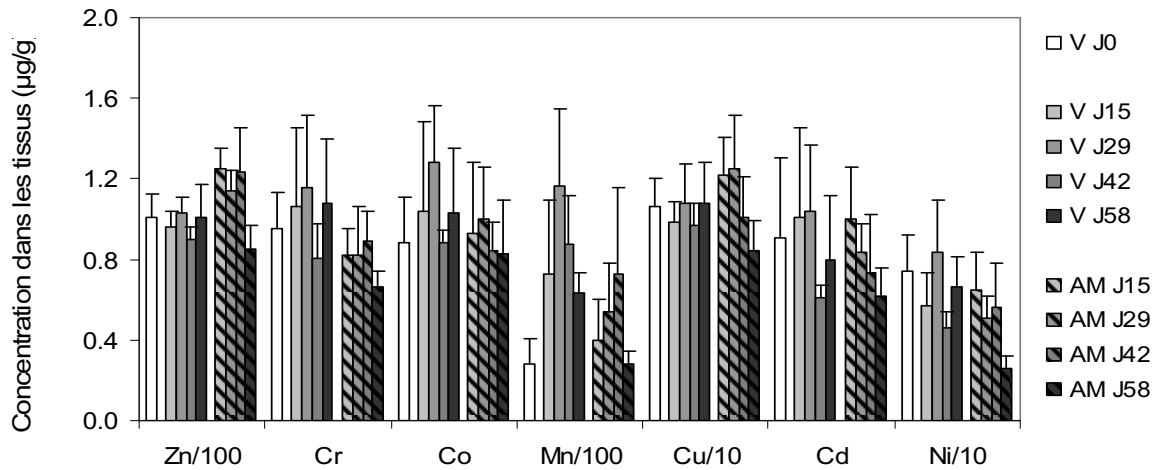


Figure 37: Concentration en métaux dans les tissus de dreissènes ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$) après 0, 15, 29, 42 et 58 jours d'exposition à Villeconin (V) et Athis-Mons (AM).

Bien que les analyses chimiques du milieu montrent une contamination plus importante en aval du bassin, aucune différence n'a été observée au niveau de la contamination métallique des tissus. Néanmoins, en aval, le poids des tissus des dreissènes a quasiment doublé alors qu'il est resté stable en amont. Afin de gommer l'effet de dilution biologique du à cette croissance susceptible de masquer l'impact de la pression chimique, les données ont été interprétées dans le cadre du modèle biodynamique. En effet, le modèle prend en compte les variations de poids des organismes à travers le paramètre de croissance g . En supposant que les dreissènes aient atteint l'équilibre avec le milieu après 15 jours d'exposition, l'influx de métal par voie dissoute et trophique I ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{j}^{-1}$) est contrebalancé par l'efflux:

$$\frac{dC_{org}}{dt} = \underbrace{k_u \cdot C_d + AE \cdot IR \cdot C_p}_{\text{Influx}} - \underbrace{C_{org} \cdot (k_e + g)}_{\text{Efflux}} = 0 \quad (28)$$

$$I = C_{org} \cdot (k_e + g) \quad (29)$$

avec C_{org} la concentration métallique mesurée dans les tissus ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$), k_u la constante cinétique d'assimilation par voie dissoute ($\text{L}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{j}^{-1}$), AE l'efficacité d'assimilation (%), IR le taux d'ingestion ($\text{g}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{j}^{-1}$), k_e le taux d'élimination (j^{-1}), g le taux de croissance (j^{-1}), C_d la concentration en contaminant biodisponible par voie dissoute ($\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) et C_p la concentration en contaminant particulaire ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$).

Les données d'accumulation en termes de concentration dans les tissus et d'influx sont représentées sur la Figure 38. Le taux d'élimination a été obtenu à partir de la littérature³² et g a été calculé à partir de l'évolution du poids des tissus ($g=0,017 \text{ j}^{-1}$ à Athis-Mons et $-0,0022 \text{ j}^{-1}$ à Villeconin). Les influx ont été supérieurs en aval (exception

³² Valeurs des constantes reportées dans le Chapitre 1.

faite du Mn). Les données de bioaccumulation sont donc en relation avec la contamination des sites sous réserve de prendre en compte les différences trophiques et les variations de poids qui en découlent.

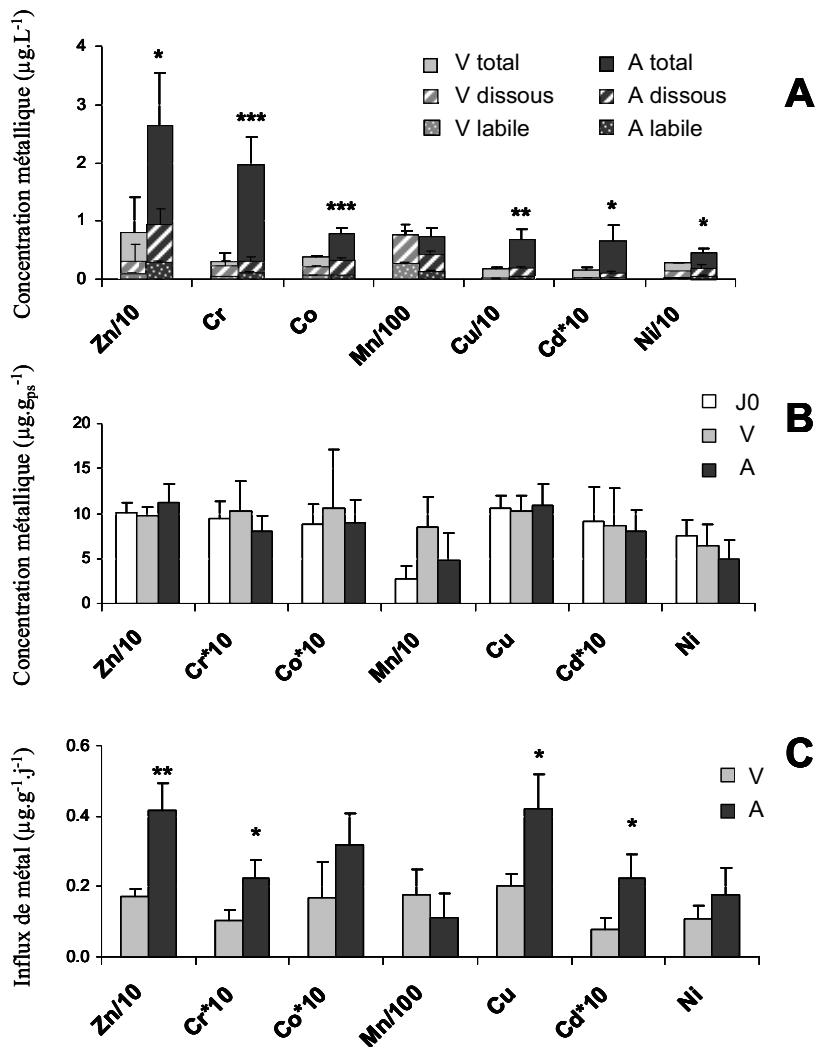


Figure 38: Contamination métallique dans le milieu, bioaccumulation des métaux dans les tissus de dreissène ($\mu\text{g}\cdot\text{g poids sec}^{-1}$) et influx ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{j}^{-1}$). *: valeurs significativement différentes entre les 2 sites (Z-Test, $p < 0,1^*$, $p < 0,01^{**}$, $p < 0,001^{***}$).

3.2.3 Bioaccumulation des HAP

Pour la plupart des HAP, une nette différence d'accumulation a pu être observée entre les deux sites (Figure 39). La concentration en HAP dans les organismes est supérieure à Athis-Mons ce qui est cohérent avec les données de contamination chimique.

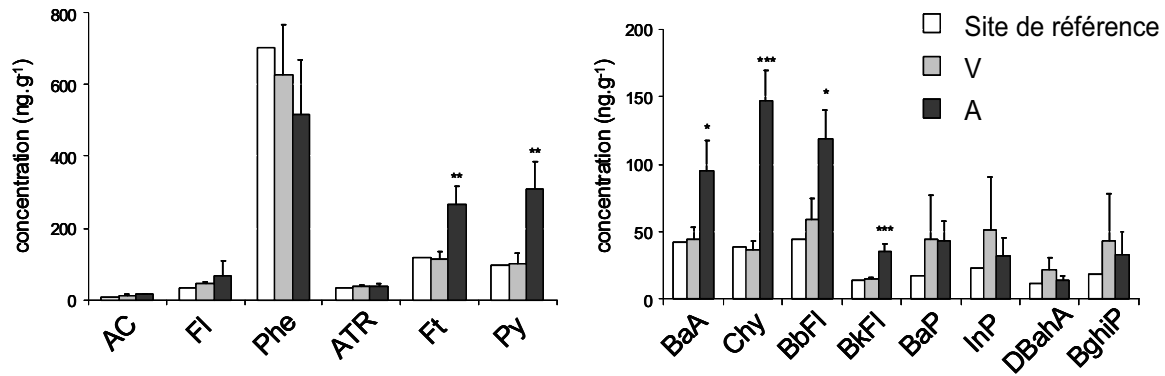


Figure 39: Concentration en HAP dans les tissus de dreissènes (ng.g^{-1}). *: valeurs significativement différentes entre les 2 sites (Z-Test, $p < 0,1^*$, $p < 0,01^{**}$, $p < 0,001^{***}$).

L'approche biodynamique a été appliquée au benzo[a]pyrene (BaP), pour lequel la valeur de k_e ($0,18 \text{ d}^{-1}$) était disponible (Fisher et al., 1993), ce qui n'était pas le cas pour les autres HAP. La concentration en BaP dans les tissus était respectivement de $44 \pm 33 \text{ ng.g}^{-1}$ et $43 \pm 14 \text{ ng.g}^{-1}$, pour l'amont et l'aval, ce qui correspond à $8 \pm 6 \text{ ng.g}^{-1}.\text{d}^{-1}$ et $9 \pm 3 \text{ ng.g}^{-1}.\text{d}^{-1}$ en terme d'influx. Dans ce cas, concentrations et influx sont similaires, très certainement parce que la constante d'élimination du BaP (k_e) est bien plus importante que le taux de croissance g .

4. CONCLUSION

L'objectif de cette étude était d'évaluer la capacité du modèle biodynamique à rendre compte de la contamination des organismes par rapport à celle du milieu. Nous nous sommes placés dans un contexte urbain où la contamination est multiple, diffuse et accompagnées d'une perturbation de la physico-chimie du milieu.

Le facteur confondant trophique, qui perturbait l'évaluation de la contamination par la mesure de la bioaccumulation brute, a été mis en évidence par le modèle biodynamique. L'interprétation des données, à l'aide du modèle biodynamique, a permis de s'en affranchir et à mis en évidence un influx métallique dans les organismes, supérieur en aval.

Cette même approche, appliquée au benzo(a)pyrène, n'a pas permis de rendre compte des différences de contamination.

Au cours de cette étude, des collaborations ont permis la mesure de différentes réponses biologiques. L'intégralité de ces résultats se trouve dans l'Article 2 en annexe. Voici les principales conclusions obtenues à partir de ces données:

- L'interprétation des données d'activités d'enzymes digestives a été complexe. Les différences observées entre l'amont et l'aval résultant de l'effet conjoint du gradient trophique et du gradient de contamination. L'analyse des enzymes digestives et plus globalement, les bilans énergétiques (accessibles par des mesures de taux de protéines, lipide et glycogène), peuvent renseigner sur le métabolisme des organismes et donc être de bons biomarqueurs. Néanmoins, leur interprétation reste encore à approfondir.
- Un gradient de génotoxicité amont/aval a été mis en évidence à travers le test micronoyaux et le test comète réalisés sur des cellules de branchie.
- La plupart des études font état d'une augmentation de l'activité de la GST en réponse à une contamination. En revanche, au cours de notre étude, l'activité de la GST a montré une nette réduction en aval pouvant traduire une capacité réduite de défense et donc favorisant ainsi l'apparition d'effet toxique.

L'utilité du couplage de ces différentes réponses biologiques dans l'évaluation de l'impact écotoxicologique a été mise en évidence dans cette étude. En effet, l'utilisation d'un marqueur unique ne permet pas de statuer sur l'effet toxique. La bioaccumulation renseigne de l'exposition des organismes aux contaminants (moyennant l'interprétation dans un cadre toxicocinétique) tandis que les marqueurs biologiques donnent des informations sur l'effet toxique, l'évaluation de l'effet environnemental étant facilitée par la complémentarité des marqueurs.

Chapitre 5: Prise en compte des facteurs physiologiques dans un suivi de bioaccumulation prolongé

Dans le chapitre précédent, le modèle biodynamique a montré sa capacité à décrire l'accumulation des métaux dans les tissus résultant d'une exposition chimique, notamment en prenant en compte les facteurs confondants environnementaux (niveau trophique influençant le poids des tissus des organismes). Cette validation a été réalisée sur une période relativement courte (2 mois), nous permettant ainsi de nous affranchir des divers comportements physiologiques de la dreissène en relation avec les phases de son cycle biologique (pré et post ponte).

Dans ce chapitre, notre objectif a été d'évaluer la capacité du modèle à quantifier la contamination métallique du milieu sur une année biologique et hydrologique complète. Le but était donc d'évaluer si le comportement physiologique des dreissènes, qui a un impact majeur sur l'accumulation des métaux, pouvait être pris en compte dans ce modèle. Ceci a fait l'objet de l'Article 4.

Des prélèvements de dreissènes transplantées ont été réalisés d'octobre 2008 à septembre 2009 sur trois stations de la Seine, caractérisées par des pressions anthropiques de différentes origines: Marnay-sur-Seine situé 200km en amont de Paris, Bougival et Triel-sur-Seine, tous deux en aval de Paris (Figure 40). Le site de Bougival est soumis à une contamination urbaine diffuse (retombées atmosphériques, rejets par temps de pluie...), et Triel-sur-Seine, situé 15km en aval de la station d'épuration Seine-Aval, est soumis à la fois à la contamination urbaine et au rejet de la station d'épuration d'Achères. Des prélèvements mensuels ont été effectués afin de suivre les paramètres physico-chimiques, la contamination métallique des dreissènes et du milieu.

Ce travail s'inscrit dans un projet collaboratif entre le LSCE, le Cemagref et l'UMR BIOEMCO³³ (le projet MEDISIS³⁴) qui a pour but de mieux comprendre la variabilité des métaux dissous en Seine et d'évaluer de possibles méthodes de suivi des teneurs métalliques par des indicateurs biologiques. Dans le cadre de ce projet, une caractérisation fine des métaux particuliers et de leur labilité a été réalisée par le LSCE (i.e. extractions chimiques séquentielles BCR³⁵ et minéralisation totale des MES prélevées ponctuellement ou collectées dans des trappes à sédiments). Les prélèvements de MES ont été systématiquement réalisés en même temps que les nôtres.

³³ Biogéochimie et écologie des milieux continentaux.

³⁴ Métaux Dissous et bioindicateurs biologiques. Projet financé par l'Institut National des Sciences de l'Univers (INSU) dans le cadre de l'appel d'offre EC2CO (2008-2010) et coordonné par J.M. Mouchel.

³⁵ Community Bureau of Reference of the European Commission.

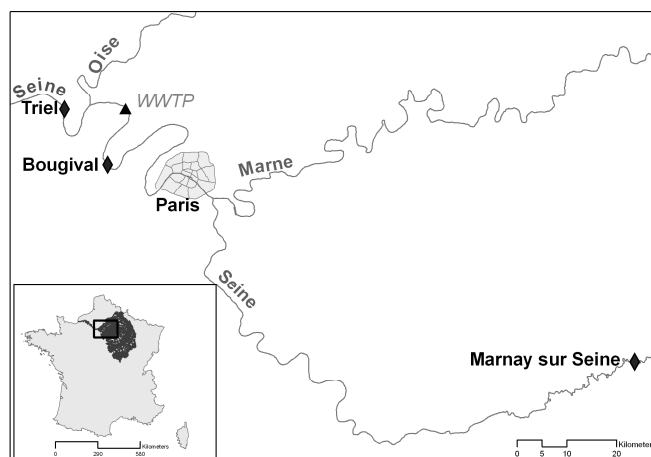


Figure 40: Sites d'étude le long de l'axe Seine: Marnay sur Seine, Bougival et Triel sur Seine. La station d'épuration d'Achères (WWTP) est située entre Bougival et Triel sur Seine (Priadi et al., In press).

L'étude de la variabilité de la répartition des métaux dans la colonne d'eau en Seine a fait l'objet de l'Article 3. Au cours de cette campagne, nous nous sommes également intéressés à la contamination du milieu et des dreissènes par les HAP³⁶ et à la réponse de divers biomarqueurs (activité des enzymes digestives et de la GST, génotoxicité) mesurés à pas de temps trimestriel chez les dreissènes.

1. SUIVI DE LA CONTAMINATION METALLIQUE

1.1 Protocole

Les dreissènes (20-22 mm) ont été prélevées en octobre 2008 sur un site de référence, à Commercy, dans le canal de la Meuse puis déployées le lendemain sur 3 sites, le long de l'axe Seine: Marnay-sur-Seine (Site 1), Bougival (Site 2) et Triel-sur-Seine (Site 3). Des organismes (25 par site) ont été prélevés chaque mois, rassemblés puis analysés afin de suivre la contamination métallique dans les tissus. Le protocole d'analyse est décrit dans l'Article 4. Des paramètres physiologiques de la dreissène ont également été suivis: le taux de croissance (calculé à partir de l'évolution du poids sec des tissus mous), l'indice de condition et le taux de filtration (mesure ex-situ décrite plus loin).

Les paramètres physico-chimiques globaux ont également été analysés: concentration en anions et cations, chlorophylle, phéopigment, COD, COP, MES, MVS, la température (mesurée en continu par des sondes), le pH et la conductivité.

Des prélèvements d'eau mensuels ont permis de suivre la contamination en métaux dissous et totaux. Deux dispositifs, les capteurs passifs DGT et les trappes à sédiment,

³⁶ Article en préparation. Gourlay-Francé C., Bourgeault A., Tusseau-Vuillemin M. H. Monitoring of PAH contamination in water: comparison of biological and physico-chemical tools.

ont permis une mesure intégrée de la contamination dissoute labile et particulaire puisque qu'ils ont chacun échantillonnés les métaux entre deux dates de prélèvement, c'est à dire sur une durée d'un mois. La contamination métallique des particules a été mesurée par extraction séquentielle sur des échantillons collectés par les trappes à sédiment. Ainsi, quatre fractions ont été différenciées dans les MES (Figure 44): les fractions échangeable, réductible, oxydable et résiduelle (Pueyo et al., 2001). Les protocoles et résultats sont décrits dans l'article de Priadi *et al.* (In press).

1.2 Contamination métallique dans l'eau et les particules

Les résultats de contamination en métaux totaux, dissous et labile sont décrits en détail dans l'Article 3. Les concentrations en métaux labiles, totaux et particulaires sont représentées dans le Tableau 12 ainsi que sur les Figure 41 et 42. Les résultats montrent généralement une contamination supérieure en aval. Néanmoins, aucune différence significative n'a pu être observée entre les 2 sites aval ($p < 0,05$, test de Kruskal Wallis) en dépit des apports métalliques, pourtant importants, de la station d'épuration d'Achères (Buzier et al., In press), située entre les Site 2 et 3. Ceci pourrait s'expliquer par un effet de dilution important après la confluence avec l'Oise.

Tableau 12: Concentration moyenne en métaux particulaires ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$) au cours de l'exposition. Ces valeurs représentent la somme des 4 fractions de l'extraction séquentielle (Priadi et al., In press). L'astérisque () indique une différence significative avec les deux autres sites ($p < 0,05$, Test de Kruskal Wallis).*

	Cd	Ni	Cr	Cu	Zn
Site 1	0.3 ± 0.0 *	10.5 ± 1,4	13.2 ± 3.5 *	15.4 ± 1.4 *	75.3 ± 7.7 *
Site 2	2.2 ± 0.8	18.5 ± 2.7 *	32.8 ± 5.1	99.5 ± 31.9	355.9 ± 61.6
Site 3	1.8 ± 0.8	14.6 ± 2.6	25.0 ± 6.6	50.9 ± 17.7	264.0 ± 52.1

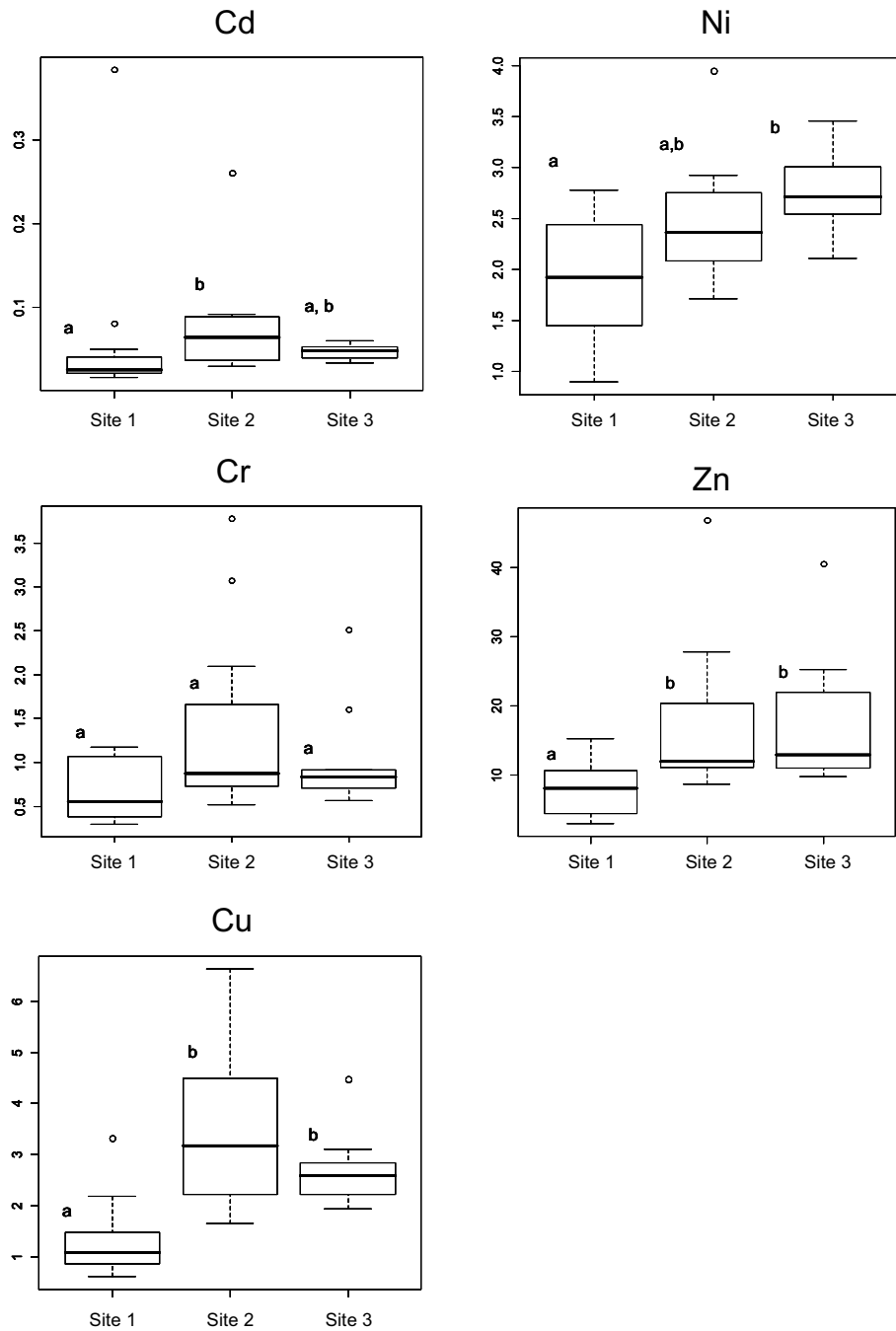


Figure 41: Distribution des concentrations en métaux totaux ($\mu\text{g.L}^{-1}$) à Marnay-sur-Seine (Site 1), Bougival (Site 2) et Triel-sur-Seine (Site 3) au cours de l'année. Sont représentés sur les graphiques, les valeurs minimum et maximales, le 1^{er} et 3^{ème} quartile et la médiane. Les ronds représentent les valeurs aberrantes. Les lettres a et b indiquent des données statistiquement différentes ($p < 0,05$, test de Kruskal Wallis).

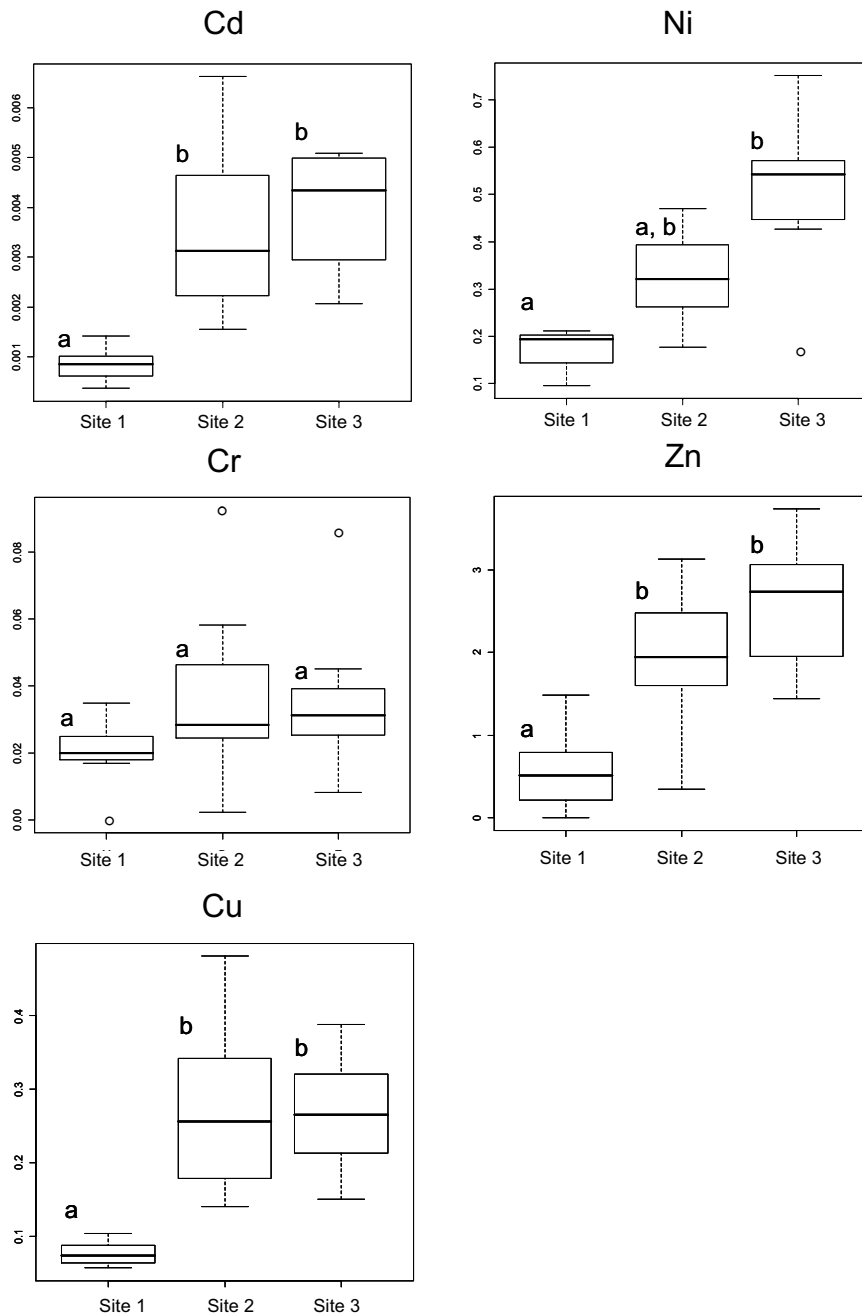


Figure 42: Distribution des concentrations en métaux labiles ($\mu\text{g.L}^{-1}$) à Marnay-sur-Seine (Site 1), Bougival (Site 2) et Triel-sur-Seine (Site 3) au cours de l'année. Sont représentés sur les graphiques, les valeurs minimum et maximales, le 1^{er} et 3^{ème} quartile et la médiane. Les ronds représentent les valeurs aberrantes. Les lettres a et b indiquent des données statistiquement différentes ($p < 0,05$, test de Kruskal Wallis).

1.3 Contamination des organismes

Nous avons estimé une erreur relative de 10% sur les mesures de contamination dans les tissus en nous appuyant sur les résultats de l'étude de Bervoets (2004) (i.e. 15 organismes suffisent pour obtenir une erreur inférieure à 10%) et sur les erreurs relatives obtenues suite à la minéralisation puis à l'analyse de plusieurs échantillons de matériel de référence³⁷ (<10%, $n=4$). Notons que cette erreur relative de 10% tient compte à la fois de la variabilité inter individuelle et des erreurs sur la mesure chimique.

Les données de contamination des organismes sont représentées sur la Figure 43. Dans le cas du Cd, du Cr et du Cu, la contamination des tissus a diminué au mois d'Avril. Par ailleurs, à cette même période, l'indice de condition, qui reflète l'évolution du poids des tissus mous, a été maximal. L'augmentation de l'indice de condition et donc du poids des organismes s'est traduit par une dilution biologique des contaminants accumulés, c'est-à-dire une concentration résultante moins importante. A l'inverse, après la ponte (dont il est vraisemblable qu'elle a eu lieu en Avril pour le Site 2 et en Mai pour les Sites 1 et 3 au vu de l'évolution de l'indice de condition), la perte de poids a conduit à une concentration des contaminants. En effet, contrairement aux contaminants hydrophobes, qui s'accumulent préférentiellement dans les tissus lipidiques et donc potentiellement dans les gonades, les gamètes sont peu contaminés en métaux par rapport à l'ensemble des tissus mous (Phillips, 1980). De ce fait, suite à la ponte, la contamination des tissus (en $\mu\text{g.g}^{-1}$) augmente.

Malgré une différence de contamination significative du milieu entre l'amont et l'aval, le suivi de la contamination métallique dans les organismes n'a pas permis d'observer de différence entre les sites (test de Kruskal and Wallis, $p>0.05$). De plus, bien que le bassin de la Seine soit soumis à une pression anthropique forte, les concentrations métalliques mesurées dans les tissus de dreissènes ont été similaires à celles reportées dans d'autres études sur des sites considérés comme de référence (Camusso et al., 2001; De Lafontaine et al., 2000; Voets et al., 2006). La contamination moyenne au cours de l'exposition, tous sites confondus, a été de $0,8 \pm 0,2 \mu\text{g.g}^{-1}$ pour le Cd, $1,0 \pm 0,4 \mu\text{g.g}^{-1}$ pour le Cr, $11,5 \pm 2,1 \mu\text{g.g}^{-1}$ pour le Cu, $7,4 \pm 2,7 \mu\text{g.g}^{-1}$ pour le Ni et $106,7 \pm 11,8 \mu\text{g.g}^{-1}$ pour le Zn ($n=34$). Ceci souligne la complexité des sites sur lesquels cette étude a été menée, et sur les sites urbains de façon plus générale, puisqu'ils sont caractérisés par des concentrations faibles en divers contaminants où les paramètres physicochimiques et biologiques conditionnent largement la réponse des organismes. Il est donc nécessaire d'utiliser le modèle biodynamique pour comprendre la bioaccumulation.

³⁷ Matériel de référence: Tissus de moule ERM-CE 278.

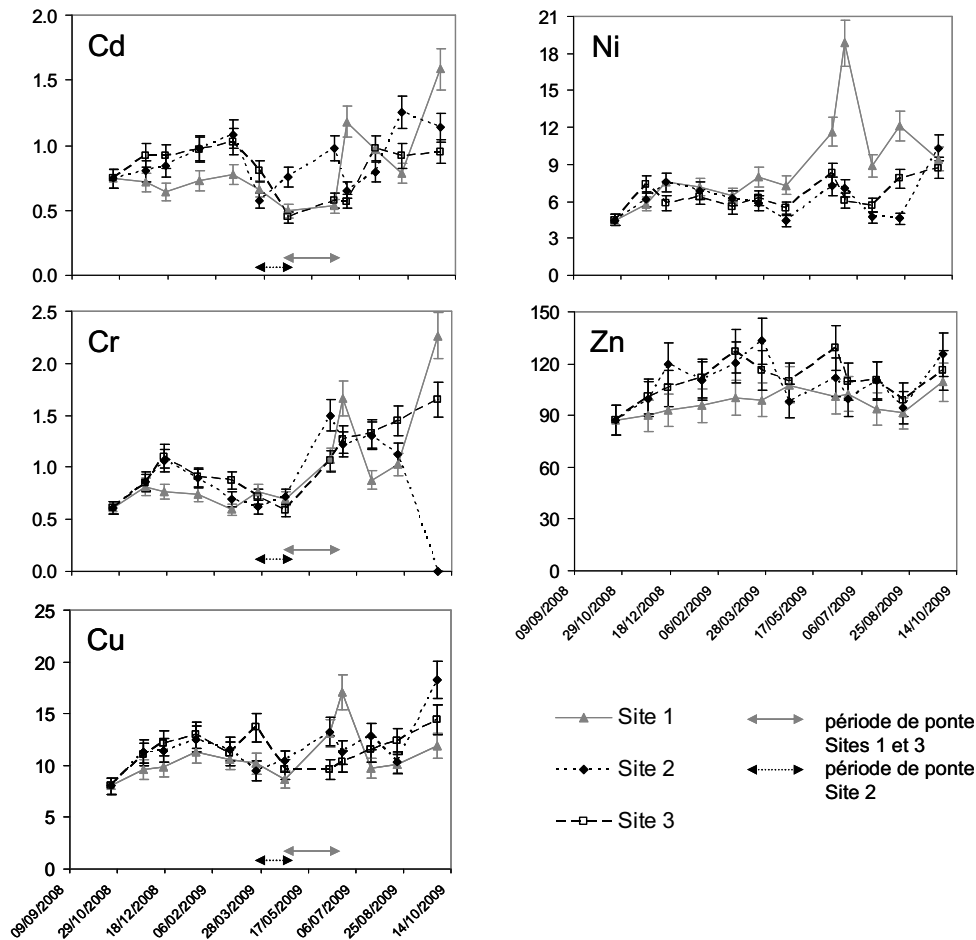


Figure 43: Contamination en métaux dans les tissus des organismes (µg.g⁻¹) au cours de l'exposition.

2. MODELISATION ET PARAMETRES UTILISES

2.1 Formalisme du modèle biodynamique

Afin d'appliquer le modèle biodynamique aux données mensuelles, les équations de base du modèle (i.e. les Equations 1 et 7 du Chapitre 1) ont été intégrées entre les dates t_{i-1} et t_i . Nous avons supposé que les paramètres (k_u , AE, g) et les variables (C_d , C_p et IR) du modèle étaient constants sur chaque mois mais différents d'un mois à l'autre³⁸. La relation utilisée pour la modélisation est alors (Guan et Wang, 2006):

$$C_{org}(t_i) = C_{org}(t_{i-1}) \cdot e^{-(k_e+g)(t_i-t_{i-1})} + C_{org_ss} \cdot (1 - e^{-(k_e+g)(t_i-t_{i-1})}) \quad (30)$$

³⁸ Le paramètre k_e est constant sur toute l'année. Selon le métal considéré, le paramètre k_u est également constant sur l'année ou variable en fonction du taux de filtration, de la concentration en Ca et/ou Zn comme établi dans le Chapitre 1.

$$\text{avec } C_{\text{org}_{ss}} = \frac{k_u \cdot C_d + AE \cdot IR \cdot C_p}{k_e + g} \quad (31)$$

où $C_{\text{org}_{ss}}$ est la concentration dans les tissus à l'équilibre ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$), C_d représente la concentration en métal biodisponible entre t_{i-1} et t_i ($\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) et C_p la concentration en métal dans les MES entre t_{i-1} et t_i ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$), AE l'efficacité d'assimilation (%), IR le taux d'ingestion ($\text{g}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{j}^{-1}$) défini comme le produit du taux de filtration FR ($\text{L}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{j}^{-1}$) et de la concentration en MES ($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) et k_e la constante d'élimination (j^{-1}). Le taux de croissance g (j^{-1}) a été calculé à partir de l'évolution du poids sec des tissus. En période de ponte la valeur de g a été négative, traduisant une concentration des métaux dans les tissus mous des dreissènes suite à l'expulsion de gamètes pauvres en métaux (Phillips, 1980). Nous avons considéré que la concentration initiale dans les organismes $C_{\text{org}}(t_0)$ était celle mesurée dans les organismes en début d'exposition.

2.2 Mesure ex-situ du taux de filtration

Le taux d'ingestion IR est défini comme le produit du taux de filtration (FR) et de la concentration en MES. Dès le retour au laboratoire, les dreissènes ont été utilisées afin de mesurer le taux de filtration (FR_{app}). Cette mesure est réalisée dans une pièce thermostatée ajustée à la température du site, avec de l'eau du site filtrée puis dopée en algues ($1,10^6$ cellule. mL^{-1}). Le protocole utilisé est le même que celui décrit dans le Chapitre 2, à l'exception du fait que les particules ont été mesurées, dans ce cas, avec un compteur de particules (Beckman Coulter Counter, Z1). Les mesures ont été réalisées en triplicats sur des lots de 5 dreissènes. Le taux de filtration *in situ* (FR) a été estimé à partir de celui mesuré au laboratoire (FR_{app}) en considérant la concentration en MES effective des sites. Ainsi, le taux de filtration mesuré en laboratoire a été corrigé selon l'Equation 32 en calculant les taux de filtration théoriques selon la relation empirique établie par Reeders et Bij de Vaate (1990) (i.e. $FR_{\text{théorique}} = 187.1e^{-0.037 \cdot \text{MES}}$):

$$FR = FR_{\text{app}} \cdot \frac{FR_{\text{théorique_MES_insitu}}}{FR_{\text{théorique_MES_laboratoire}}} \quad (32)$$

$$FR = FR_{\text{app}} \cdot e^{-0.037 \cdot (\text{MES}_{\text{insitu}} - \text{MES}_{\text{laboratoire}})} \quad (33)$$

2.3 Une contamination métalliques intégrée

Au vu des résultats obtenus lors des expérimentations en laboratoire par voie dissoute³⁹, nous avons choisi d'utiliser les données de contamination en métaux labiles pour représenter la contamination en métaux biodisponibles dissous. En ce qui concerne la contamination des particules, nous avons utilisé les données obtenues par le LSCE suite aux extractions séquentielles effectuées sur les MES collectées par les trappes à sédiments. Quatre données d'extraction séquentielles manquaient. Ces données ont été extrapolées sur la base des autres valeurs obtenues et des concentrations métalliques

³⁹ Résultats d'exposition par voie dissoute au Ni.

totales mesurées dans les particules⁴⁰, en supposant pour chaque site que la répartition des métaux entre les 4 fractions étaient la même au cours de l'exposition (ce qui a été vérifié par Priadi *et al.* (In press)).

2.4 Choix des paramètres biodynamiques

Les constantes du modèle ont été obtenues à partir de la littérature (Tableau 13), avec le souci, lorsque plusieurs constantes étaient disponibles, de prendre la constante se rapprochant le plus des conditions d'expositions (i.e. seston naturel, concentration en MES ou chlorophylle). La spéciation du Cr n'ayant pas été déterminée lors de la campagne, nous avons utilisé une constante d'accumulation par voie dissoute (k_u) moyenne à partir des données sur le Cr(III) et le Cr(VI) (Roditi et Fisher, 1999).

Tableau 13: Paramètres biodynamiques utilisés dans les différentes modélisations.

	AE (%)	k_u (L.g ⁻¹ .d ⁻¹)	k_e (d ⁻¹)
Cd	26 ^{a1}	$k_u = FR \cdot \left(\frac{0.134}{1 + 10^{3.5} \cdot [Ca] + 10^{7.4} \cdot [Zn]} \right)^b$	0.012 ^{a3}
Cr	1.5 ^{a2}	1.15 ^a	0.015 ^{a3}
Zn	32 ^{c1}	1.047 ^{c2}	0.018 ^{c3}
Ni	-	$k_u = FR \cdot \left(\frac{0.043}{1 + 10^{3.6} \cdot [Ca]} \right)^b$	0.019 ^d
Cu	-	0.163 ^b	0.022 ^e

^a: (Roditi et Fisher, 1999)

^{a1}: AE faisant référence au seston naturel B de la rivière Hudson qui présentait une concentration en MES de 11 mg.L⁻¹

^{a2}: AE faisant référence au seston naturel A de la rivière Hudson qui présentait une concentration en MES de 28 mg.L⁻¹ (l'AE du seston B n'étant pas disponible pour le Cr)

^{a3}: moyenne entre les k_e obtenues suite à une contamination des organismes par voie dissoute et trophique du Cr III et du Cr IV

^b: Valeurs obtenues suite aux expositions par voie dissoute (Chapitre 2). Dans le cas du Cu, des essais avaient été réalisés au laboratoire mais n'apparaissent pas ici puisqu'aucun facteur de contrôle n'avait été testé pour ce métal

^c: (Wang et al., 1996). Données obtenues chez *M. edulis*

^{c1}: AE faisant référence au seston naturel du 11 Mars pour lequel la concentration en chlorophylle était de 11,7 µg.L⁻¹

^{c2}: k_u moyen

^{c3}: moyenne entre les k_e obtenues suite à une contamination des organismes par voie dissoute et trophique

^d: (Zarogian et Johnson, 1984) chez *M. edulis*

^e: (Mersch et al., 1993) k_e estimé à partir des données de contamination des tissus de dreissène pendant une période de dépuraton

⁴⁰ Concentrations en métaux totaux dans les particules mesurées par le LSCE et reportées dans l'Article 3.

2.5 Démarche

Les simulations réalisées avec le modèle biodynamique ont eu différents enjeux:

- Une première simulation a eu pour objectif d'évaluer la capacité des extractions séquentielles à représenter la biodisponibilité des métaux particuliers. Ainsi, nous avons comparé les données de contamination mesurées dans les tissus des organismes à celles prédites par le modèle, en considérant une efficacité d'assimilation de 100% quel que soit le site, la date et le métal considéré. Pour cette simulation, nous avons considéré que la contamination métallique était, soit la somme des 4, 3 ou 2 fractions de l'extraction séquentielle, soit la fraction échangeable seule.
- Dans une seconde simulation, nous avons évalué la capacité prédictive du modèle biodynamique en utilisant les paramètres préexistants dans la littérature. La contamination métallique des particules n'est alors plus considérée comme une variable permettant de traduire la biodisponibilité par voie trophique mais simplement comme une variable forçante du modèle.
- Les simulations suivantes ont eu pour objectif d'affiner l'estimation de AE et d'évaluer sa variabilité selon les sites, la période du cycle biologique et les métaux.

3. LES EXTRACTIONS CHIMIQUES PEUVENT-ELLES MIMER LA BIODISPONIBILITE DES METAUX PARTICULAIRES ?

Divers protocoles d'extraction chimique ont été proposés dans le but de mieux caractériser la fraction biodisponible des métaux particuliers. Selon Luoma (1989), l'extraction HCl est la plus représentative de la fraction biodisponible. En ce qui concerne les extractions séquentielles, selon les auteurs, la fraction biodisponible serait mieux caractérisée, par la phase échangeable (Amiard-Triquet et al., 1998), par la phase échangeable et réductible (Larner et al., 2008 pour des sédiments oxiques) ou par la somme des phases échangeable, réductible et oxydable ((Larner et al., 2008) pour des sédiments anoxique). La Figure 44 schématise les différentes fractions extraites lors de l'extraction séquentielle et les équivalences supposées avec les extractions HCl ou plus classiquement les extractions HNO₃/HCl réalisées par les réseaux de surveillance.

Afin d'évaluer la capacité d'une extraction chimique à estimer la biodisponibilité des métaux particuliers, les concentrations dans les organismes ont été simulées avec le modèle biodynamique en considérant une assimilation de 100% et la contamination dans les particules C_p comme la concentration dans les différentes phases de l'extraction séquentielle (Equation 30 et 31).

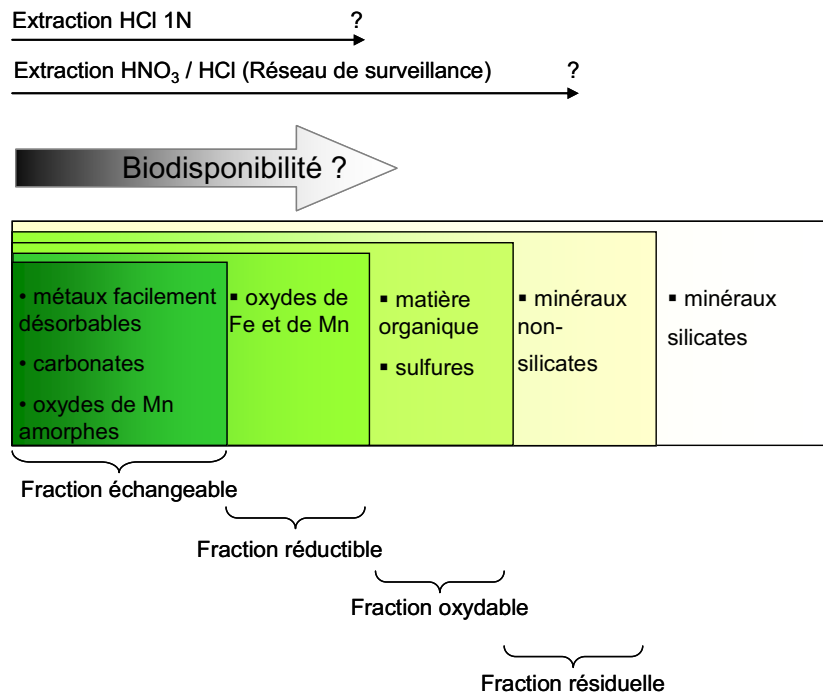


Figure 44: Spéciation des métaux particulaires évaluée par l'extraction séquentielle BCR (fractions échangeable, réductible, oxydable et résiduelle) et équivalence supposée avec les extractions HNO_3/HCl et HCl 1N.

Les résultats, représentés sur la Figure 45, ont montré une surestimation systématique de la contamination prédite dans les tissus par rapport à la contamination mesurée lorsque l'on considère que la concentration en métaux particulaires correspond à la somme des phases Ech+Red+Oxy+Rés, Ech+Red+Oxy ou Ech+Red. En revanche, un meilleur ajustement est obtenu si l'on considère que la contamination métallique particulière correspond à la concentration mesurée dans la fraction échangeable seule. Les valeurs prédites sont alors du même ordre de grandeur que les valeurs mesurées.

Cependant, même si globalement la contamination métallique de la fraction échangeable a permis une meilleure estimation, l'adéquation n'est pas parfaite. En effet, 35% des valeurs prédites sont 3 fois plus élevées ou 3 fois plus faibles que les valeurs mesurées (Figure 46). Par exemple, la contamination de Cr et Ni est toujours surestimée, ce qui suggère que les métaux dans la fraction échangeable ne sont pas entièrement biodisponibles. À l'inverse, la contamination des tissus en Cu est convenablement prédite pour le Site 1 et tend à être sous-estimée pour les Sites 2 et 3 (l'ensemble des simulations sont reportées en annexe dans l'Article 4), ce qui signifie le Cu des fractions moins échangeables, non pris en compte dans la modélisation (i.e. fraction réductible) est probablement biodisponible sur ces sites.

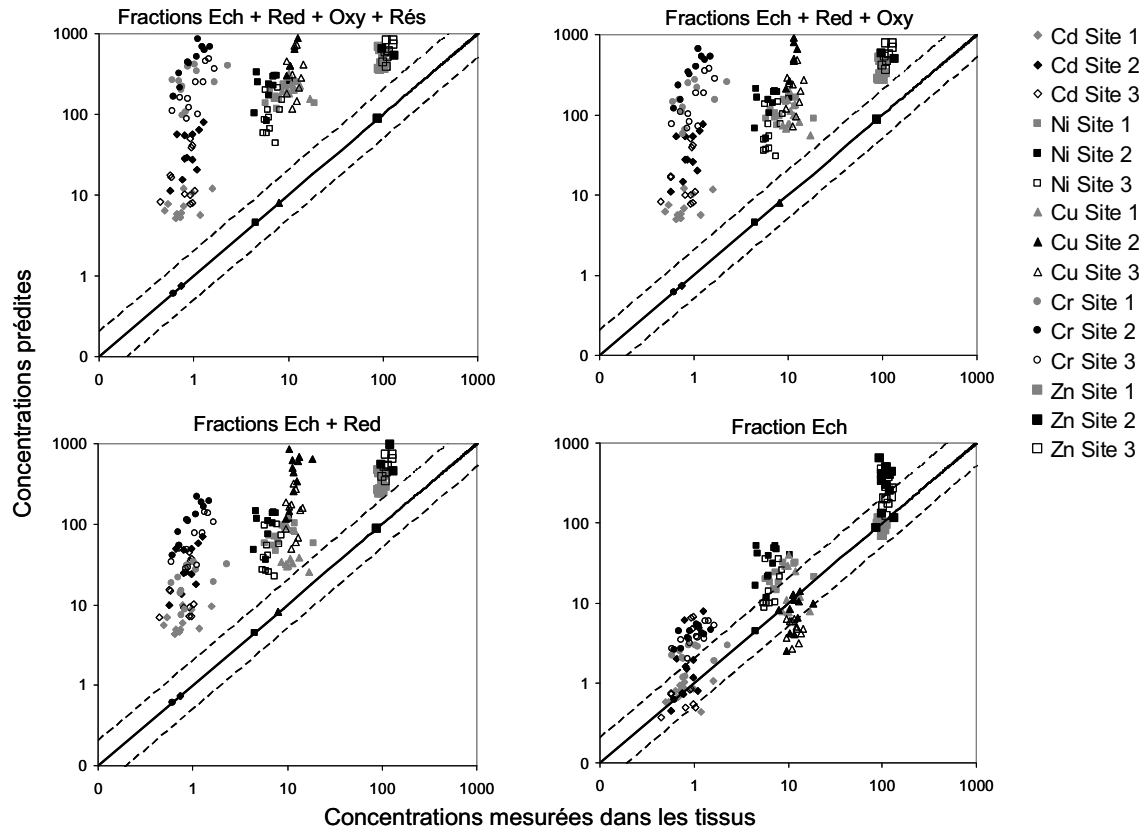


Figure 45: Relation entre les concentrations métalliques mesurées dans les tissus et les concentrations prédites par le modèle en considérant différentes concentrations métalliques selon les fractions de l'extraction séquentielle (Ech: échangeable, Red: réductible, Oxy: Oxydable, Rés: résiduelle). Ici, AE=100%. Les lignes en pointillées représentent une déviation d'un facteur 2 par rapport à la droite 1:1.

Les simulations présentées ici sont conditionnées par l'exactitude supposées des constantes du modèle, à savoir k_u et k_e . Autant cette hypothèse semble réaliste pour la constante d'élimination, puisqu'elle est généralement peu variable⁴¹ (Roditi et Fisher, 1999), autant k_u est largement conditionné par la chimie du milieu (COD, Ca, Zn...) (Cf Chapitre 2). Ces variations n'ont pas été totalement prises en compte dans les simulations, en particulier pour le Zn, le Cu et le Cr. Ainsi, nous avons cherché à savoir si une correction du paramètre k_u pouvait suffire à ajuster les valeurs prédites aux valeurs mesurées. Ces vérifications ont montré qu'avec les fractions Ech+Red, Ech+Red+Oxy et Ech+Red+Oxy+Res même une absence d'accumulation par voie dissoute (i.e. $k_u=0$) n'améliorait pas les prédictions du modèle. Ce même exercice, réalisé sur l'essai avec la fraction échangeable seule, a montré des résultats mitigés selon les métaux et les sites. En prenant l'exemple de Triel-sur-Seine, une absence de voie dissoute pour le Ni et le Cd (i.e. $k_u=0$) ne permettrait pas d'améliorer l'ajustement des données (Figure 47). En ce qui concerne le Zn et le Cr, l'absence d'accumulation par voie dissoute améliore la prédiction puisque le modèle qui surestimait initialement l'accumulation respectivement

⁴¹ Chez la dreissène, la voie d'exposition (par l'eau ou la nourriture) a un impact mineur sur la constante d'élimination du Cr et pas d'impact significatif sur celle du Cd.

d'un facteur 2,4 et 3,7 (Figure 46), ne la surestime plus que d'un facteur 1,2 et 1,4. Dans le cas du Cu, la constante d'accumulation par voie dissoute devrait être multipliée par un facteur 3 pour ajuster les valeurs prédites à celles mesurées. Au vu de ces résultats, nous n'avons pas jugé pertinent de modifier les valeurs de k_u sans disposer d'éléments plus fiables.

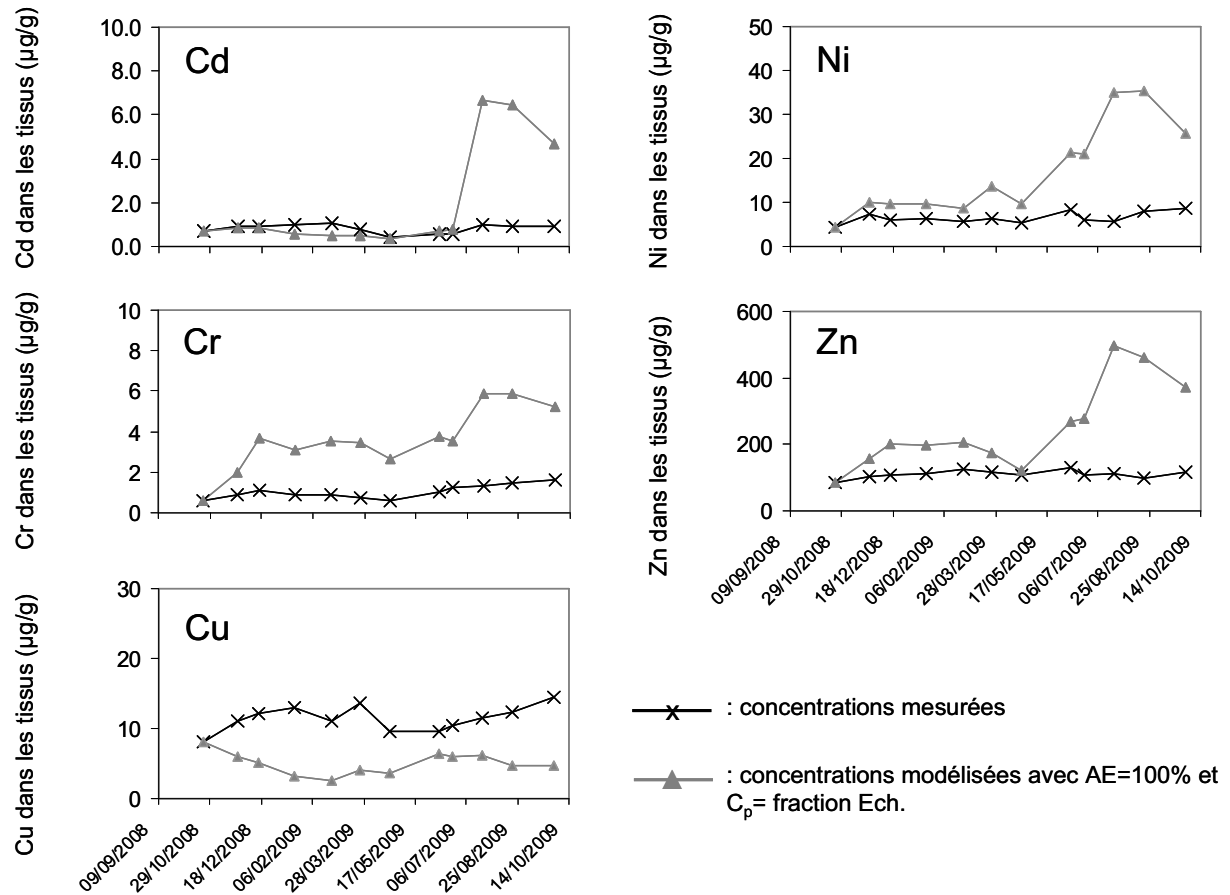


Figure 46: Concentrations mesurées et modélisées en Cd, Cr, Zn, Ni et Cu ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$) dans les tissus de dreissènes au cours de l'exposition à Triel-sur-Seine (Site 3).

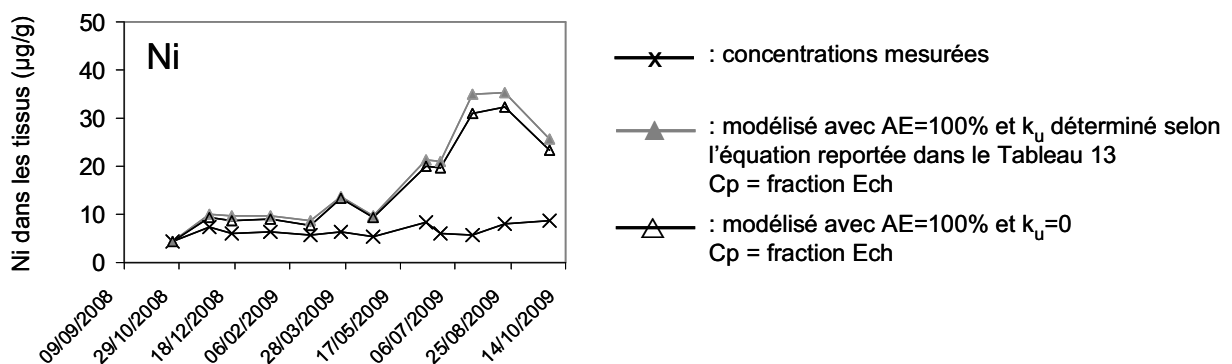


Figure 47: Concentrations mesurées et modélisées en Ni dans les tissus de dreissène au cours de l'exposition à Triel-sur-Seine (Site 3).

Compte tenu du fait que la voie dissoute ne module pas fortement l'accumulation prédite dans les tissus, représenter le métal particulaire biodisponible par la concentration mesurée dans la fraction échangeable ne suffit pas à prédire finement l'accumulation des métaux dans les organismes. Ces résultats montrent ainsi le rôle majeur des paramètres trophique et principalement du paramètre AE dans le modèle biodynamique, puisqu'il permet de moduler l'accumulation par voie trophique et donc potentiellement de traduire les différents comportements des dreissènes face aux métaux. Par la suite, nous avons cherché à évaluer la variabilité de l'AE en fonction du cycle biologique des dreissènes.

4. L'EFFICACITE D'ASSIMILATION EST-ELLE CONSTANTE TOUT AU LONG DE L'ANNEE ?

Afin de répondre à cette question, l'efficacité d'assimilation pour chaque site, chaque métal et chaque date, a été calculée à partir des données de bioaccumulation mesurées selon l'Equation suivante:

$$AE = \left(\left(\frac{C_{org}(t_i) - C_{org}(t_{i-1}) \cdot e^{-(k_e+g)(t_i-t_{i-1})}}{1 - e^{-(k_e+g)(t_i-t_{i-1})}} \right) \cdot (k_e + g) - k_u \cdot C_d \right) \cdot \frac{1}{FR \cdot MES \cdot C_p} \quad (33)$$

Afin de se rapprocher des mesures réalisées couramment avec les extractions HCl, nous avons choisi d'utiliser les concentrations en métaux dans les fractions échangeables et réductibles comme mesure de la contamination particulaire. Notons que cette simulation aurait tout aussi bien pu être réalisée avec les fractions Ech, Ech+Red+Oxy ou même Ech+Red+Oxy+Res. Les évolutions temporelles observées aurait été sensiblement les mêmes puisque le pourcentage de métal dans chaque phase est relativement constant au cours de l'année (Priadi et al., In press). Cependant, si l'on considère que la concentration métallique particulaire est la concentration mesurée dans la fraction échangeable, dans le cas du Cu sur les Sites 2 et 3, une optimisation de l'efficacité d'assimilation n'aurait pas permis d'ajuster les valeurs prédites aux valeurs mesurées puisqu'une AE de 100% entraîne une sous-estimation de l'accumulation dans les organismes (Cf. le cas du Cu à Triel-sur-Seine présenté sur la Figure 46).

Les AE, calculées à chaque site et chaque date, sont représentées sur la Figure 48. Les écarts types sont élevés étant donné qu'ils rendent compte des erreurs sur plusieurs données du modèle (i.e. concentrations en métal labile et bioaccumulé, taux de croissance g , taux de filtration FR et concentration en MES). La variance de l'efficacité d'assimilation $u(AE)$ a été calculée selon l'équation suivante:

$$u^2(AE) = \left(\frac{\partial AE}{\partial g} \right)^2 u^2(g) + \left(\frac{\partial AE}{\partial C_{org}} \right)^2 u^2(C_{org}) + \left(\frac{\partial AE}{\partial C_d} \right)^2 u^2(C_d) + \left(\frac{\partial AE}{\partial FR} \right)^2 u^2(FR) + \left(\frac{\partial AE}{\partial MES} \right)^2 u^2(MES) \quad (34)$$

où $\frac{\partial AE}{\partial x}$ est la dérivée partielle de AE (Equation 33) par rapport au paramètre x et $u(x)$ la variance du paramètre x .

L'AE apparaît relativement stable au cours de l'année, à l'exception d'un pic, fin juin, à Marnay (Site 1) pour tous les métaux. Ce pic résulte d'une forte contamination dans les

tissus associée à un faible taux de filtration, ce qui a entraîné une estimation de l'AE d'autant plus élevée. Le Cr a été le métal ayant la plus faible assimilation (proche de 0) par rapport aux autres métaux, ce qui est en accord avec le caractère inerte du Cr souvent reporté dans la littérature (Wang et Fisher, 1996) et observé précédemment (Cf. Chapitre 3). De plus, pour certains métaux, bien que les différences entre sites ne soient pas significatives, l'assimilation à Marnay-sur-Seine a généralement été plus élevée. Les raisons pour lesquelles les AE ont été plus élevées en amont, ne sont pas claires, d'autant plus que les extractions séquentielles ont montré que le Cd et le Zn étaient plus labiles en aval. On peut émettre l'hypothèse selon laquelle, sur ce site, le niveau trophique plus bas qu'en aval a entraîné une assimilation accrue du carbone (éventuellement par une augmentation du temps de passage de la nourriture dans le système digestif des dreissènes), et de ce fait, une assimilation plus élevée des métaux (Roditi et Fisher, 1999).

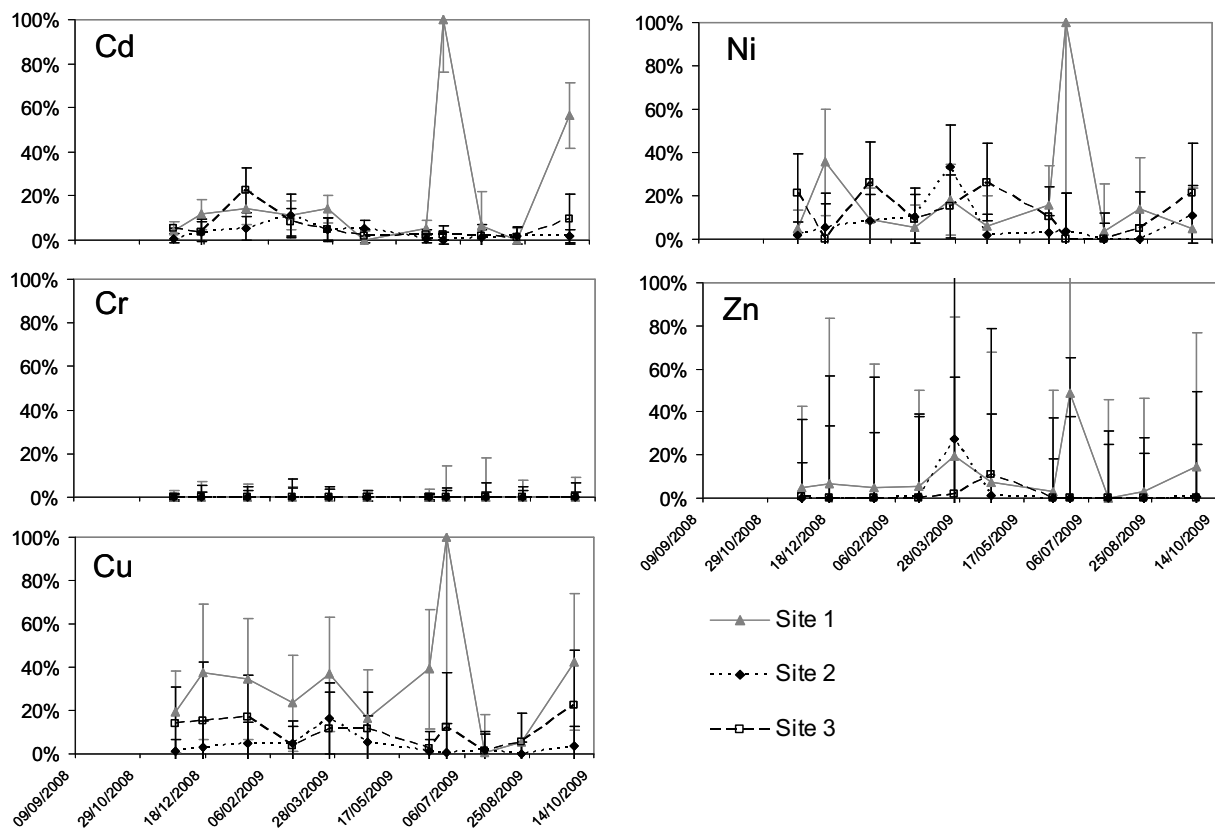


Figure 48: Evolution de l'efficacité d'assimilation (AE), optimisée à partir des données terrain, au cours de l'exposition sur les 3 sites (Site 1: Marnay-sur-Seine, Site 2: Bougival, Site 3: Triel-sur-Seine). L'écart type a été évalué à partir des erreurs sur le taux de filtration (FR), la concentration en MES, le taux de croissance g , et les concentrations en métaux labiles et accumulés dans les organismes.

5. UNE METHODE IN SITU PERMETTANT D'ESTIMER L'AE

Le calcul point par point de l'AE a montré que ce paramètre était relativement stable au cours de l'année avec une différence (non significative) entre les sites. Une modélisation de la bioaccumulation basée sur une valeur d'AE propre à chaque site est donc susceptible de fournir une bonne prédiction des concentrations observées dans les organismes. Par la suite, cette approche a été approfondie et confrontée aux prévisions du modèle obtenues avec les paramètres de la littérature (Tableau 13).

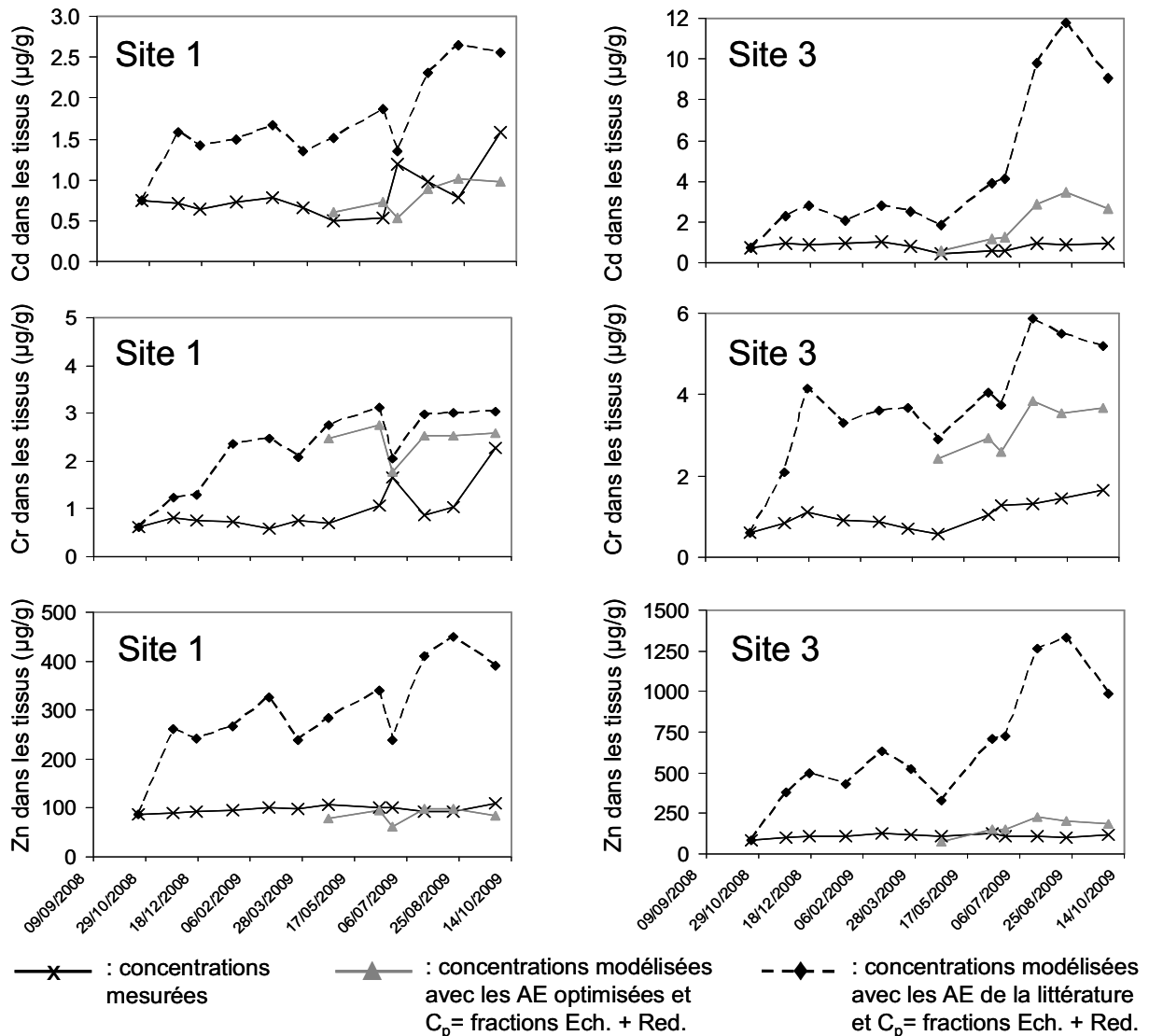


Figure 49: Concentrations dans les tissus de dreissenès mesurées et modélisées à partir des AE de la littérature et des AE optimisées pour le Site 1 (Marnay-sur-Seine) et le Site 3 (Triel-sur-Seine). La concentration métallique dans les particules est la concentration dans les fractions échangeable (Ech.) et réductible (Red.).

Sur la Figure 49, seul le Site 3 est représenté. Les sites aval conduisent sensiblement aux mêmes conclusions. Les résultats montrent que l'utilisation d'une AE optimisée par

site et par métal permet d'obtenir une bonne adéquation entre les concentrations prédites et mesurées (Figure 49). Bien que l'utilisation d'AE provenant de la littérature conduise à une surestimation de l'accumulation des métaux dans les organismes pour tous les sites, on observe une meilleure capacité du modèle à prédire l'accumulation en amont par rapport à l'aval, suggérant que l'AE de la littérature serait plus représentative de la nourriture et du comportement alimentaire du site amont.

Les AE optimisées pour chaque site à partir des données des 5 premiers mois d'exposition sont reportées dans le Tableau 14. Les AE du Site 1 ont été généralement plus élevées que pour les deux autres sites. L'application de ces AE sur les données des 6 derniers mois de l'exposition a permis de rendre compte des différences entre les sites et d'améliorer la prédiction du modèle (Figure 49 et Figure 50). Ainsi, 86% des valeurs prédites sur les 6 derniers mois d'exposition sont en accord avec les valeurs mesurées à un facteur 2 près.

Tableau 14: Efficacités d'assimilation optimisées à partir du jeu de données des six premiers mois d'exposition. Les fractions prises en compte dans l'évaluation de la contamination métallique particulière sont les fractions échangeable et réductible.

	Site 1	Site 2	Site 3
Cd	9 %	1 %	7 %
Cr	0 %	0 %	0 %
Zn	5 %	0 %	0 %
Ni	13 %	3 %	14 %
Cu	27 %	2 %	8 %

En dépit des différences amont/aval observées, tant au niveau des AE optimisées que de la physicochimie des particules (concentration en Chlorophylle, COP, composition en majeurs (Priadi et al., In press): Ca, Si, Al, Mg, P, S, K, Ti), aucune corrélation, que ce soit par l'Analyse en Composante Principale (ACP) ou par la Partial Least Square (PLS), n'a pu être établie⁴².

⁴² Données log-transformées.

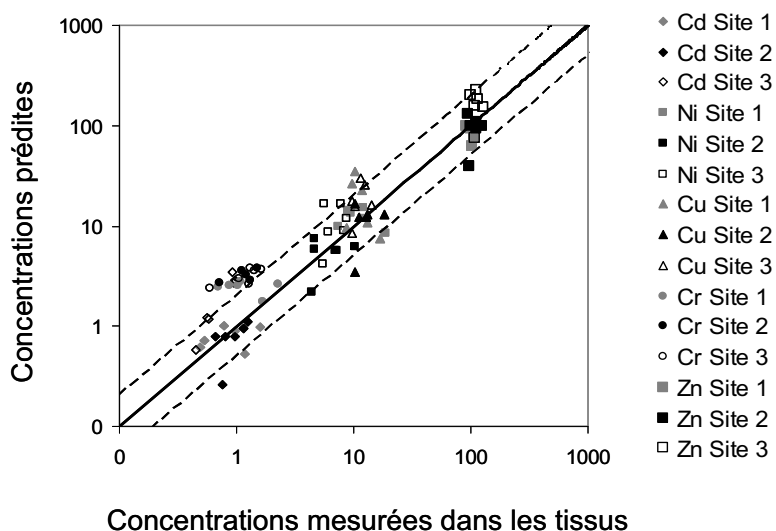


Figure 50: Relation entre les concentrations métalliques mesurées dans les tissus et les concentrations prédites par le modèle ($\mu\text{g.g}^{-1}$) sur les 6 derniers mois d'exposition en considérant l'AE optimisé pour chaque site à partir des données des 5 premiers mois d'exposition. La concentration métallique dans les particules est la concentration dans les fractions échangeable et réductible.

Plutôt que d'estimer l'AE en laboratoire, nous proposons par cette méthode d'estimer l'AE à partir de données terrain, c'est-à-dire en intégrant le plus fidèlement possible les conditions environnementales des sites et la physiologie de l'organisme. De plus, l'optimisation des AE, réalisée sur les 5 premiers mois de l'exposition, a montré des résultats comparables à une optimisation réalisée sur l'année complète. Ainsi une campagne *in situ* de quelques mois permet de calibrer le paramètre AE d'un site donné.

Le modèle de bioaccumulation nous a permis de calculer le pourcentage de métal accumulé par voie trophique (Tableau 15). Ces résultats ont montré que la voie trophique est une voie majoritaire d'accumulation pour le Cd, le Ni et le Cu alors que le Cr n'est pas accumulé par voie trophique. En revanche, la part de Zn accumulé par voie trophique semble dépendante du site considéré.

Tableau 15: Pourcentage de métal accumulé par voie trophique selon les estimations du modèle biodynamique (moyenne sur l'année).

	Site 1	Site 2	Site 3
Cd	95 %	88 %	96 %
Cr	0 %	0 %	0 %
Zn	64 %	0 %	0 %
Ni	89 %	70 %	83 %
Cu	94 %	77 %	83 %

6. CONCLUSION ET PERSPECTIVES

Un suivi annuel a montré la complexité de la relation entre la contamination des organismes et celle du milieu, en particulier dans un milieu sous pression anthropique. L'accumulation par voie trophique est apparue comme un processus clé dans cette relation. Nous avons montré dans cette étude, en utilisant le modèle biodynamique, que les extractions chimiques réalisées sur les particules ne permettaient pas de rendre compte complètement de la variation de la bioaccumulation et que la méthode la plus pertinente pour retranscrire la biodisponibilité des métaux particulaires était de considérer une contamination donnée dans les particules (idéalement la somme des phases échangeable et réductible de l'extraction séquentielle BCR ou une extraction HCl 1N moins longue et moins contraignante d'un point de vue technique) associée à une efficacité d'assimilation (AE) variable selon les sites.

La prise en compte d'une AE propre à chaque site améliore les prévisions du modèle biodynamique par rapport à une application des données de la littérature, indiquant un comportement alimentaire spécifique des organismes selon les sites. La méthode présentée ici nous a permis d'estimer l'AE de chaque métal sur un site donné en quelques mois de suivi de la bioaccumulation. Son originalité réside en ce qu'elle propose une calibration *in situ* du paramètre biodynamique et non en laboratoire. L'avantage majeur est de pouvoir se placer à un niveau de réalisme plus élevé puisqu'on intègre, à la fois le comportement physiologique de l'organisme (croissance, taux de filtration) et les facteurs environnementaux (niveau trophique, chimie de l'eau). Notons toutefois que cette méthode doit reposer sur un modèle biodynamique robuste puisque les AE obtenues sont conditionnées par les autres paramètres du modèle. Il est donc primordial d'élargir nos connaissances sur l'accumulation par voie dissoute à tous les métaux.

Les valeurs d'AE *in situ* n'ont pas permis d'observer de corrélations entre les AE estimées par le modèle et la physicochimie des particules. Cet aspect reste donc à approfondir, éventuellement en menant des expositions en laboratoire en tant que support à la compréhension des mécanismes mis en jeu.

Conclusion et perspectives

Dans le contexte réglementaire de la Directive Cadre sur l'Eau, il est nécessaire d'évaluer l'impact de la contamination chimique sur les milieux aquatiques pour pouvoir établir un diagnostic des masses d'eau. Ce diagnostic est d'autant plus difficile à établir que les substances chimiques sont nombreuses, que leur dosage est délicat étant donné leur faible niveau de concentration dans l'eau et que leurs effets varient selon leurs spéciations, leurs interactions et la physiologie des organismes. Ainsi, les concentrations mesurées dans le milieu ne rendent pas forcément compte de la biodisponibilité, ni de l'impact sur les organismes vivants.

Afin d'avoir une vision plus globale de l'impact écotoxicologique, les recherches actuelles s'orientent vers l'utilisation d'une batterie de marqueurs complémentaires, relatifs à différents niveaux d'organisation de l'organisme, et plus ou moins sensibles à certains types de contaminants. L'enjeu est alors de définir les tests et les organismes les plus pertinents pour avoir la meilleure représentation possible des effets des contaminants. Néanmoins, ces biomarqueurs ne sont pas spécifiques des substances présentes dans le milieu. Ainsi, la mise en place de ces batteries de biomarqueurs n'exclut pas la mesure chimique dans le milieu puisque, du point de vue réglementaire, il reste essentiel de pouvoir identifier les contaminants à l'origine des effets observés. La bioaccumulation, en tant que marqueur d'exposition, est un élément de diagnostic qu'il est fondamental d'intégrer à cette palette de marqueurs. En effet, l'accumulation qui est la première réponse biologique à la contamination, trouve largement sa place ici puisqu'elle renseigne sur la biodisponibilité des contaminants.

Cependant, le lien entre contamination et bioaccumulation n'est pas direct. L'objectif de notre étude était de mieux comprendre les mécanismes de bioaccumulation, à la fois par voie dissoute et par voie trophique, en relation avec la pression chimique et la physiologie des organismes. Afin de faciliter la compréhension des mécanismes mis en jeu, nous avons intégré dans notre démarche un modèle de bioaccumulation: le modèle biodynamique. La dreissène a été choisie comme organisme d'étude pour sa capacité à concentrer les métaux, sa résistance aux stress (et donc la possibilité de réaliser des suivis actifs de la bioaccumulation en la transplantant) et sa répartition géographique relativement large.

Les facteurs contrôlant l'accumulation par voie dissoute ont été étudiés en laboratoire après avoir mis au point une méthode d'exposition des organismes. Cette étude concernait l'influence de trois paramètres: la concentration en Zn, en Ca et en matière organique dissoute sur deux métaux: le Cd et le Ni. Les expositions ont montré l'intérêt d'utiliser les isotopes stables des métaux, notamment dans le cas du Ni, pour permettre d'exposer les organismes à de faibles concentrations métalliques tout en assurant un suivi fiable de la bioaccumulation. Le Zn et le Ca ont un effet inhibiteur sur l'accumulation du Cd. Dans le cas du Ni, seul le Ca a un effet inhibiteur alors que le Zn augmente la

bioaccumulation. En parallèle de ces expositions, le taux de filtration a été mesuré afin de contrôler l'activité physiologique des dreissènes. Il est resté stable quel que soit la concentration en Ca ou en Zn, montrant ainsi que les inhibitions observées sont vraisemblablement dues à des compétitions entre les ions en solution. En s'inspirant du modèle du ligand biologique (BLM), un modèle a été établi permettant de prédire la constante d'accumulation par voie dissoute (k_u) à partir des concentrations en ions compétiteurs (Zn et/ou Ca). La matière organique modifie la spéciation des métaux et le taux de filtration des dreissènes. La prise en compte de ces deux facteurs, via le modèle biodynamique a mis en évidence un troisième mécanisme, probablement associé à une modification de la perméabilité de la membrane biologique. Bien que cette étude n'ait pas permis d'intégrer la totalité des facteurs confondants testés dans un modèle prédictif, en particulier la matière organique, elle montre l'intérêt du couplage entre le modèle de bioaccumulation et l'approche BLM.

L'étude des mécanismes d'accumulation des métaux par voie trophique a nécessité la mise en place d'un protocole de suivi du passage de la nourriture contaminée à travers les organismes. La méthodologie du pulse chase feeding a été mise en place avec l'utilisation d'isotopes stables. Elle avait pour but d'évaluer l'influence de la qualité et de la quantité de nourriture sur l'assimilation des métaux. Bien que des améliorations puissent être apportées au protocole d'exposition, notamment au niveau de la phase de contamination des particules, les résultats ont tout de même permis d'observer des comportements différents selon les métaux. Ainsi, le Cr est très peu assimilable comparé au Ni, au Cu ou au Cd. En présence d'une faible concentration en particules ($\sim 3 \text{ mg.L}^{-1}$) on observe une assimilation plus forte des métaux, que l'on pourrait attribuer à une assimilation en carbone et nutriments accrue en présence d'une source de nourriture réduite. En revanche, aucune relation n'a pu être établie entre l'efficacité d'assimilation (AE) et la qualité de la nourriture. Cette étude était une première étape vers l'élaboration de protocoles d'exposition permettant d'évaluer plus finement le rôle du comportement alimentaire des dreissènes dans les mécanismes d'accumulation par voie trophique.

En parallèle des expositions en laboratoire, deux expériences de transplantation ont été menées.

- Une exposition de deux mois sur deux sites (amont et aval) du bassin de l'Orge a validé la capacité du modèle biodynamique à évaluer la pression chimique du milieu en prenant en compte l'influence des facteurs environnementaux sur l'organisme. En effet, alors qu'en termes de concentrations métalliques dans les tissus ($\mu\text{g.g}^{-1}$), aucune différence significative n'était observable entre des sites pourtant contrastés du point de vue de la contamination chimique, le calcul de l'influx métallique ($\mu\text{g.g}^{-1}.\text{j}^{-1}$) a permis de mettre en relation la bioaccumulation et la pression chimique. Ici, le modèle biodynamique a permis de mettre en évidence la dilution biologique des métaux consécutive à la croissance des tissus.
- Lors d'une campagne de transplantation d'un an sur trois sites de la Seine, nous avons suivi l'évolution mensuelle de la bioaccumulation et de la contamination

chimique des sites. Les données de biomonitoring, associées à différentes simulations avec le modèle biodynamique, ont conduit aux conclusions suivantes:

- Les extractions chimiques ne suffisent pas à évaluer la fraction biodisponible des métaux particulaires.
- L'efficacité d'assimilation (AE) est stable au cours de l'année alors que la variabilité spatiale semble plus marquée.
- Les AE de la littérature, quoi que permettant de prédire des concentrations accumulées proches de celles mesurées, ne permettent pas de prendre en compte les différences entre sites.
- L'accumulation par voie trophique est la voie d'accumulation prédominante pour certains métaux tels que le Cd, le Ni et le Cu.

A partir des ces résultats, nous avons mis au point une méthode permettant d'estimer l'AE pour chaque site et chaque métal. Les optimisations réalisées sur les cinq premiers mois de la campagne ont été validées avec les six derniers mois. Ainsi, quelques mois de biomonitoring suffisent à estimer une AE au plus près des conditions environnementales. Cette technique nécessite, néanmoins, d'être validée avec d'autres jeux de données⁴³.

Ce travail de recherche a montré que la dreissène, associée au modèle biodynamique, est un bon outil de surveillance de la contamination métallique des milieux continentaux. En effet, à partir du suivi de la contamination d'organismes transplantés, le modèle biodynamique a montré sa capacité à évaluer la contamination métallique biodisponible du milieu, tout en prenant en compte les paramètres environnementaux et physiologiques de l'organisme. A travers les études menées en laboratoire et *in situ*, nous avons montré l'importance de calibrer les différents paramètres biodynamiques aux systèmes aquatiques étudiés (i.e. prise en compte de la chimie de l'eau dans les mécanismes d'accumulation par voie dissoute, mesure du taux de filtration, efficacité d'assimilation site spécifique). De plus, le rôle prépondérant de la physiologie des organismes sur l'accumulation des métaux a été mis en évidence (période du cycle biologique, comportement alimentaire, taux de filtration). De ce fait, une détermination de la spéciation des métaux présents dans le milieu, à travers par exemple l'utilisation de capteurs passifs DGT ou une caractérisation chimique des métaux particulaires, ne permettra pas de rendre compte de la biodisponibilité métallique.

L'étude des processus de bioaccumulation constitue une étape indispensable vers l'établissement des NQE dans le biote. Néanmoins, afin de fixer des seuils de contamination dans des organismes aquatiques modèles, garantissant du bon état écologique des systèmes aquatiques, il est nécessaire de relier la contamination des tissus à l'effet toxique, puisqu'une mesure de contamination dans les organismes ne renseigne pas des fractions métalliques biologiquement actives ou non. La

⁴³ La transplantation de dreissènes et le suivi de la bioaccumulation sur un an sont prévus sur le Rhin dans le cadre d'un projet de collaboration avec EDF. Les données issues de ce projet pourront servir à valider la méthodologie proposée ici.

bioaccumulation, en jouant le rôle de pont entre l'exposition et l'effet, est ainsi une étape clé pour comprendre l'effet des métaux sur les organismes aquatiques.

Perspectives de recherche

Afin d'approfondir les travaux menés et pouvoir à plus long terme utiliser la dreissène comme outil de biomonitoring, plusieurs perspectives de recherche sont envisagées:

- L'étude de l'accumulation par voie dissoute a permis de mettre au point une méthode qui prend en compte l'effet compétiteur des ions (Ca, Zn) sur la constante d'accumulation k_u . Afin d'avoir une vision plus globale des possibles interactions dans le milieu aquatique, il sera nécessaire d'étendre cette étude à d'autres facteurs d'influence, tels que la concentration en carbonate et en sodium, et à d'autres métaux.
- Un point important sera également d'identifier les mécanismes mis en jeu en présence de MO, tant au niveau des mécanismes d'accumulation des métaux qu'au niveau du taux de filtration. En effet, lors de cette étude, nous avons identifié le rôle de la spéciation des métaux et du taux de filtration sur la bioaccumulation des métaux. Néanmoins un troisième mécanisme, supposé être une modification de la perméabilité de la membrane, semble intervenir. Il conviendrait, ainsi, de valider cette hypothèse en laboratoire.
- Bien que nos expérimentations en laboratoire sur la voie trophique n'aient pas permis de relier l'efficacité d'assimilation à la qualité de la nourriture, la technique basée sur les isotopes stables semble prometteuse. Des expériences complémentaires, ayant pour objectif de faire le lien entre les efficacités d'assimilation établies en laboratoire et celle estimées par des campagnes *in situ*, contribueraient à une meilleure compréhension des mécanismes d'accumulation par voie trophique. Pour cela, il serait nécessaire de coupler un même type d'extraction chimique sur la nourriture utilisée au laboratoire et celle disponible sur le terrain. Nous pourrions envisager dans les deux cas (*in situ* et au laboratoire) de caractériser la labilité des métaux particuliers par des extractions HCl 1N (technique moins lourde que les extractions séquentielles) ou des extractions par le liquide digestif des organismes. De plus, pour mieux comprendre le comportement alimentaire des dreissènes, une caractérisation fine des particules semble nécessaire (éventuellement en quantifiant l'apport énergétique de la nourriture). Ce travail fera l'objet d'une thèse⁴⁴ à partir de novembre 2010 au Cemagref.

⁴⁴ Biodisponibilité des métaux particuliers co-encadrée par C. Gourlay (Cemagref) et S. Ayrault (LSCE).

- Le taux de filtration est un paramètre clé, à la fois pour la voie dissoute et la voie particulaire, puisqu'il va contrôler l'entrée des contaminants dans l'organisme. Bien que de nombreuses études ait été menées sur le sujet, nous n'avons pas de vision globale de l'influence des paramètres physico-chimiques (température, concentration en oxygène dissous, concentration en matière en suspension, chimie de l'eau, carbone organique dissous...) et de leur interactions croisées. Une étude basée sur les plans d'expérience permettrait d'obtenir cette vue d'ensemble tout en limitant le nombre d'expériences.
- De façon plus globale, il apparaît primordial de continuer à associer différents marqueurs biologiques afin de caractériser au mieux la pression chimique et son impact sur l'écosystème. Afin d'affiner encore davantage le diagnostic, et pouvoir mieux relier entre elles les observations réalisées via les divers marqueurs, une évaluation du statut énergétique des organismes pourrait être envisagée. En effet, l'exposition à des contaminants va induire chez les organismes, des mécanismes de défense (réparation des dommages à l'ADN, synthèse de protéines telles que les métallothionéines prenant en charge les métaux, réparation des protéines inactivées...) qui sont coûteux en énergie et qui vont donc potentiellement diminuer l'énergie de réserve au dépend de la croissance et de la reproduction. Généralement, les organismes ayant un statut énergétique élevé seront plus aptes à faire face à la contamination, non pas en accumulant moins de métal, mais plutôt en le détoxifiant mieux. Ainsi, une approche énergétique contribuerait à une meilleure compréhension des liens entre exposition (pression chimique et condition trophique), bioaccumulation et toxicité. Cette voie est actuellement privilégiée par les équipes du PIREN Seine, à travers notamment, l'étude de l'activité des enzymes digestives⁴⁵ et des réponses génotoxiques⁴⁶ chez la dreissène.

⁴⁵ Thèse de Frédéric Palais à l'Université de Reims (2007-2011): Potentiel d'évaluation de la qualité des eaux de la Vesle à l'aide d'une stratégie de biosurveillance intégrée.

⁴⁶ Thèse de C. Michel au Cemagref d'Antony (2008-2011): Comparaison de la Génotoxicité exprimée par les moules zébrées en milieu urbain et de la génotoxicité intrinsèque des micro-polluants biodisponibles: intérêts pour évaluer la génotoxicité du milieu aquatique.

Bibliographie

- Admiraal W., Blanck H., Buckert-De Jong M., Guasch H., Ivorra N., Lehmann V., Nyström B.A.H., Paulsson M. et Sabater S. 1999. Short-term toxicity of zinc to microbenthic algae and bacteria in a metal polluted stream. *Water Research* 33(9):1989-1996.
- Akopian M., Garnier J., Testard P. et Ficht A. 2001. Estimating the benthic population of *Dreissena polymorpha* and its impact in the lower Seine River, France. *Estuaries* 24(6 B):1003-1014.
- Amiard-Triquet C., Altmann S., Amiard J.C., Ballan-Dufrançais C., Baumard P., Budzinski H., Crouzet C., Garrigues P., His E., Jeantet A.Y. and others. 1998. Fate and effects of micropollutants in the Gironde Estuary, France: A multidisciplinary approach. *Hydrobiologia* 373-374:259-279.
- Andral B., Stanisiere J.Y., Sauzade D., Damier E., Thebault H., Galgani F. et Boissery P. 2004. Monitoring chemical contamination levels in the Mediterranean based on the use of mussel caging. *Marine Pollution Bulletin* 49(9-10):704-712.
- Arifin Z. et Bendell-Young L.I. 1997. Feeding response and carbon assimilation by the blue mussel *Mytilus trossulus* exposed to environmentally relevant seston matrices. *Marine Ecology Progress Series* 160:241-253.
- Arifin Z. et 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.
- Attar E.N. et Maly E.J. 1982. Acute toxicity of cadmium, zinc, and cadmium-zinc mixtures to *Daphnia magna*. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 11(3):291-296.
- Babich H. et Stotzky G. 1982. Nickel toxicity to fungi: Influence of environmental factors. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 6(6):577-589.
- Bates S.S., Tessier A., Campbell P.G.C. et Buffle J. 1982. Zinc adsorption and transport by *Chlamydomonas variabilis* and *Scenedesmus subspicatus* (Chlorophyceae) grown in semicontinuous culture. *Journal of Phycology* 18:521-529.
- Bayne B.L. 1993. Feeding physiology of bivalves: Time-dependence and compensation for changes in food availability. *Bivalve Filter Feeders in Estuarine and Coastal Ecosystem Processes*:1-24.
- Beliaeff B., O'Connor T.P., Daskalakis D.K. et Smith P.J. 1997. U.S. Mussel watch data from 1986 to 1994: Temporal trend detection at large spatial scales. *Environmental Science and Technology* 31(5):1411-1415.
- Bervoets L., Voets J., Chu S., Covaci A., Schepens P. et Blust R. 2004. Comparison of accumulation of micropollutants between indigenous and transplanted zebra mussels (*Dreissena polymorpha*). *Environmental Toxicology and Chemistry* 23(8):1973-1983.
- Bervoets L., Voets J., Covaci A., Chu S., Qadah D., Smolders R., Schepens P. et Blust R. 2005. Use of transplanted zebra mussels (*Dreissena polymorpha*) to assess the

- bioavailability of microcontaminants in Flemish surface waters. *Environmental Science and Technology* 39(6):1492-1505.
- Billen G., Garnier J., Mouchel J.M. et Silvestre M. 2007. The Seine system: Introduction to a multidisciplinary approach of the functioning of a regional river system. *Science of the Total Environment* 375(1-3):1-12.
- Blackmore G. et Wang W.X. 2002. Uptake and efflux of Cd and Zn by the green mussel *Perna viridis* after metal preexposure. *Environmental Science and Technology* 36(5):989-995.
- Blackmore G. et Wang W.X. 2003. Inter-population differences in Cd, Cr, Se, and Zn accumulation by the green mussel *Perna viridis* acclimated at different salinities. *Aquatic Toxicology* 62(3):205-218.
- Blanche M. 1867. Sur l'occurrence de *Dreissena polymorpha* dans la Seine. *Bulletin de Société de Sciences Naturelles de Rouen* 2:69-70.
- Bossuyt B.T.A. et Janssen C.R. 2004. Long-term acclimation of *Pseudokirchneriella subcapitata* (Korshikov) Hindak to different copper concentrations: Changes in tolerance and physiology. *Aquatic Toxicology* 68(1):61-74.
- Bossuyt B.T.A. et Janssen C.R. 2005. Copper regulation and homeostasis of *Daphnia magna* and *Pseudokirchneriella subcapitata*: Influence of acclimation. *Environmental Pollution* 136(1):135-144.
- Brown B.E. 1983. Metal-containing 'granules' - potential biological indicators of pollution? *Marine Pollution Bulletin* 14(10):369-372.
- Buchwalter D.B., Cain D.J., Clements W.H. et Luoma S.N. 2007. Using biodynamic models to reconcile differences between laboratory toxicity tests and field biomonitoring with aquatic insects. *Environmental Science and Technology* 41(13):4821-4828.
- Buzier R., Tusseau-Vuillemin M.H., Keirsbulck M. et Mouchel J.M. In press. Inputs of total and labile trace metals from wastewater treatment plants effluents to the Seine River. *Physics and Chemistry of the Earth*.
- Buzier R., Tusseau-Vuillemin M.H. et Mouchel J.M. 2006. Evaluation of DGT as a metal speciation tool in wastewater. *Science of the Total Environment* 358(1-3):277-285.
- Calow P. et Fletcher C.R. 1972. A new radiotracer technique involving ^{14}C and ^{51}Cr , for estimating the assimilation efficiencies of aquatic, primary consumers. *Oecologia* 9(2):155-170.
- Campbell P.G.C. 1995. Interaction between trace metals and aquatic metals and aquatic organisms: A critique of the free-ion activity model. In: Tessier A, Turner DR, editors. *Metal Speciation and Bioavailability in Aquatic Systems*. Chichester: John Wiley and Sons. p 45-102.
- Campbell P.G.C., Errécalde O., Fortin C., Hiriart-Baer V.P. et Vigneault B. 2002. Metal bioavailability to phytoplankton - Applicability of the biotic ligand model. *Comparative Biochemistry and Physiology - C Toxicology and Pharmacology* 133(1-2):189-206.

- Camusso M., Balestrini R. et Binelli A. 2001. Use of zebra mussel (*Dreissena polymorpha*) to assess trace metal contamination in the largest Italian subalpine lakes. *Chemosphere* 44(2):263-270.
- Cantrell C.A. 2008. Technical Note: Review of methods for linear least-squares fitting of data and application to atmospheric chemistry problems. *Atmospheric Chemistry and Physics Discussions* 8(2):6409-6436.
- Casas S., Gonzalez J.L., Andral B. et Cossa D. 2008. Relation between metal concentration in water and metal content of marine mussels (*Mytilus galloprovincialis*): Impact of physiology. *Environmental Toxicology and Chemistry* 27(7):1543-1552.
- Chuang C.Y. et Wang W.X. 2006. Co-transport of metal complexes by the green mussel *Perna viridis*. *Environmental Science and Technology* 40(14):4523-4527.
- Clausen I. et Riisgard H.U. 1996. Growth, filtration and respiration in the mussel *Mytilus edulis*: No evidence for physiological regulation of the filter-pump to nutritional needs. *Marine Ecology Progress Series* 141(1-3):37-45.
- Clifford M. et McGeer J.C. 2009. Development of a biotic ligand model for the acute toxicity of zinc to *Daphnia pulex* in soft waters. *Aquatic Toxicology* 91(1):26-32.
- Cossa D., Bourget E. et Pouliot D. 1980. Geographical and seasonal variations in the relationships between trace metal content and body weight in *Mytilus edulis*. *Marine Biology* 58(1):7-14.
- Coughlan J. 1969. The estimation of filtering rate from the clearance of suspensions. *Marine Biology* 2(4):356-358.
- Croteau M.N. et Luoma S.N. 2007. Characterizing dissolved Cu and Cd uptake in terms of the biotic ligand and biodynamics using enriched stable isotopes. *Environmental Science and Technology* 41(9):3140-3145.
- Croteau M.N. et Luoma S.N. 2008. A biodynamic understanding of dietborne metal uptake by a freshwater invertebrate. *Environmental Science and Technology* 42(5):1801-1806.
- Croteau M.N., Luoma S.N. et Pellet B. 2007. Determining metal assimilation efficiency in aquatic invertebrates using enriched stable metal isotope tracers. *Aquatic Toxicology* 83(2):116-125.
- Croteau M.N., Luoma S.N., Topping B.R. et Lopez C.B. 2004. Stable metal isotopes reveal copper accumulation and loss dynamics in the freshwater bivalve *Corbicula*. *Environmental Science and Technology* 38(19):5002-5009.
- Davison W. et Zhang H. 1994. In situ speciation measurements of trace components in natural waters using thin-film gels. *Nature* 367(6463):546-548.
- De Jonge M., Blust R. et Bervoets L. 2010. The relation between Acid Volatile Sulfides (AVS) and metal accumulation in aquatic invertebrates: Implications of feeding behavior and ecology. *Environmental Pollution* 158(5):1381-1391.
- De Lafontaine Y., Gagné F., Blaise C., Costan G., Gagnon P. et Chan H.M. 2000. Biomarkers in zebra mussels (*Dreissena polymorpha*) for the assessment and monitoring of water quality of the St Lawrence River (Canada). *Aquatic Toxicology* 50(1-2):51-71.

- De Schamphelaere K.A.C. et 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(1):48-54.
- De Schamphelaere K.A.C. et Janssen C.R. 2004a. Development and field validation of a biotic ligand model predicting chronic copper toxicity to *Daphnia magna*. *Environmental Toxicology and Chemistry* 23(6):1365-1375.
- De Schamphelaere K.A.C. et Janssen C.R. 2004b. Effects of chronic dietary copper exposure on growth and reproduction of *Daphnia magna*. *Environmental Toxicology and Chemistry* 23(8):2038-2047.
- Decho A.W. et Luoma S.N. 1996. Flexible digestion strategies and trace metal assimilation in marine bivalves. *Limnology and Oceanography* 41(3):568-572.
- Degryse F., Smolders E., Zhang H. et Davison W. 2009. Predicting availability of mineral elements to plants with the DGT technique: A review of experimental data and interpretation by modelling. *Environmental Chemistry* 6(3):198-218.
- Depledge M.H. et Rainbow P.S. 1990. Models of regulation and accumulation of trace metals in marine invertebrates. *Comparative Biochemistry and Physiology - C Pharmacology Toxicology and Endocrinology* 97(1):1-7.
- Dewitt T.H., Swartz R.C. et Lamberson J.O. 1989. Measuring the acute toxicity of estuarine sediments. *Environmental Toxicology and Chemistry* 8(11):1035-1048.
- Di Toro D.M., Allen H.E., Bergman H.L., Meyer J.S., Paquin P.R. et Santore R.C. 2001. Biotic ligand model of the acute toxicity of metals. 1. Technical basis. *Environmental Toxicology and Chemistry* 20(10):2383-2396.
- Di Toro D.M., Mahony J.D., Hansen D.J., Scott K.J., Carlson A.R. et Ankley G.T. 1992. Acid volatile sulfide predicts the acute toxicity of cadmium and nickel in sediments. *Environmental Science and Technology* 26(1):96-101.
- Di Toro D.M., Mahony J.D., Hansen D.J., Scott K.J., Hicks M.B., Mayr S.M. et Redmond M.S. 1990. Toxicity of cadmium in sediments: The role of acid volatile sulfide. *Environmental Toxicology and Chemistry* 9(12):1487-1502.
- Du Laing G., Rinklebe J., Vandecasteele B., Meers E. et Tack F.M.G. 2009. Trace metal behaviour in estuarine and riverine floodplain soils and sediments: A review. *Science of the Total Environment* 407(13):3972-3985.
- Fan W. et Wang W.X. 2003. Extraction of spiked metals from contaminated coastal sediments: A comparison of different methods. *Environmental Toxicology and Chemistry* 22(11):2659-2666.
- Ferreira D. 2009. Caractérisation de la biodisponibilité du cuivre dans les écosystèmes aquatiques par échantillonnage passif (DGT : Diffusion Gradient in Thin films), bio-indication (bryophytes aquatiques), et modélisation (BLM: Biotic Ligand Model). Aix-Marseille: Thèse de l'Université Paul Cézanne.
- Ferreira D., Ciffroy P., Tusseau-Vuillemin M.H., Garnier C. et 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(8):1117-1124.

- Ferreira D., Tousset N., Ridame C. et Tusseau-Vuillemin M.H. 2008. More than inorganic copper is bioavailable to aquatic mosses at environmentally relevant concentrations. *Environmental Toxicology and Chemistry* 27(10):2108-2116.
- Fisher S.W., Gossiaux D.C., Bruner K.A. et Landrum P.F. 1993. Investigations of the toxicokinetics of hydrophobic contaminants in the zebra mussel (*Dreissena polymorpha*). In: Nalepa TF, Schloesser DW, editors. *Zebra Mussels: Biology, Impacts and Controls*. Boca Raton: Lewis. p 465-490.
- Fortin C. et Campbell P.G.C. 2000. Silver uptake by the green alga *Chlamydomonas Reinhardtii* in relation to chemical speciation: Influence of chloride. *Environmental Toxicology and Chemistry* 19(11):2769-2778.
- Frayse B., Baudin J.P., Garnier-Laplace J., Boudou A., Ribeyre F. et Adam C. 2000. Cadmium uptake by *Corbicula fluminea* and *Dreissena polymorpha*: Effects of pH and temperature. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 65(5):638-645.
- Geffard O., Geffard A., Chaumot A., Vollat B., Alvarez C., Tusseau-Vuillemin M.H. et 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(5):1128-1134.
- George S.G. et Coombs T.L. 1977. The effects of chelating agents on the uptake and accumulation of cadmium by *Mytilus edulis*. *Marine Biology* 39(3):261-268.
- Gitan R.S., Luo H., Rodgers J., Broderius M. et Eide D. 1998. Zinc-induced inactivation of the yeast ZRT1 zinc transporter occurs through endocytosis and vacuolar degradation. *Journal of Biological Chemistry* 273(44):28617-28624.
- Gossiaux D.C., Landrum P.F. et Fisher S.W. 1996. Effect of temperature on the accumulation kinetics of PAHs and PCBs in the zebra mussel, *Dreissena polymorpha*. *Journal of Great Lakes Research* 22(2):379-388.
- Gourlay C., Tusseau-Vuillemin M.H., Mouchel J.M. et Garric J. 2005. The ability of dissolved organic matter (DOM) to influence benzo[a]pyrene bioavailability increases with DOM biodegradation. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 61(1):74-82.
- Griscom S.B. et Fisher N.S. 2004. Bioavailability of sediment-bound metals to marine bivalve molluscs: An overview. *Estuaries* 27(5):826-838.
- Griscom S.B., Fisher N.S. et Luoma S.N. 2000. Geochemical influences on assimilation of sediment-bound metals in clams and mussels. *Environmental Science and Technology* 34(1):91-99.
- Guan R. et Wang W.X. 2006. Multiphase biokinetic modeling of cadmium accumulation in *Daphnia magna* from dietary and aqueous sources. *Environmental Toxicology and Chemistry* 25(11):2840-2846.
- Gunther A.J., Davis J.A., Hardin D.D., Gold J., Bell D., Crick J.R., Scelfo G.M., Sericano J. et Stephenson M. 1999. Long-term bioaccumulation monitoring with transplanted bivalves in the San Francisco Estuary. *Marine Pollution Bulletin* 38(3):170-181.
- Guthrie J.W., Mandal R., Salam M.S.A., Hassan N.M., Murimboh J., Chakrabarti C.L., Back M.H. et Grégoire D.C. 2003. Kinetic studies of nickel speciation in model

- solutions of a well-characterized humic acid using the competing ligand exchange method. *Analytica Chimica Acta* 480(1):157-169.
- Handy R.D., Musonda M.M., Phillips C. et Falla S.J. 2000. Mechanisms of gastrointestinal copper absorption in the african walking catfish: Copper dose-effects and a novel anion-dependent pathway in the intestine. *Journal of Experimental Biology* 203(15):2365-2377.
- Hassler C.S., Slaveykova V.I. et Wilkinson K.J. 2004. Discriminating between intra- And extracellular metals using chemical extractions. *Limnology and Oceanography: Methods* 2(JUL.):237-247.
- Hassler C.S. et 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(3):620-626.
- Heijerick D.G., De Schampelaere K.A.C. et Janssen C.R. 2002. Predicting acute zinc toxicity for *Daphnia magna* as a function of key water chemistry characteristics: Development and validation of a biotic ligand model. *Environmental Toxicology and Chemistry* 21(6):1309-1315.
- Hemelraad J., Kleinveld H.A. et De Roos A.M. 1987. Cadmium kinetics in freshwater clams. III. Effects of zinc on uptake and distribution of cadmium in *Anodonta cygnea*. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 16(1):95-101.
- Horgan M.J. et 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(2):249-255.
- Hornberger M.I., Luoma S.N., Cain D.J., Parchaso F., Brown C.L., Bouse R.M., Wellise C. et Thompson J.K. 2000. Linkage of bioaccumulation and biological effects to changes in pollutant loads in south San Francisco Bay. *Environmental Science and Technology* 34(12):2401-2409.
- IARC. 2010. Agents Classified by the IARC Monographs, Volumes 1-100. <http://monographs.iarc.fr/ENG/Classification/ClassificationsAlphaOrder.pdf>
- Jansen S., Blust R. et Van Leeuwen H.P. 2002. Metal speciation dynamics and bioavailability: Zn(II) and Cd(II) uptake by mussel (*Mytilus edulis*) and carp (*Cyprinus carpio*). *Environmental Science and Technology* 36(10):2164-2170.
- Karp-Boss L., Boss E. et Jumars P.A. 1996. Nutrient fluxes to planktonic osmotrophs in the presence of fluid motion. *Oceanography and Marine Biology: an annual review*. Vol. 34:71-107.
- Knauer K., Behra R. et Sigg L. 1997. Effects of free Cu²⁺ and Zn²⁺ ions on growth and metal accumulation in freshwater algae. *Environmental Toxicology and Chemistry* 16(2):220-229.
- Kola H., Laglera L.M., Parthasarathy N. et Wilkinson K.J. 2004. Cadmium adsorption by *chlamydomonas reinhardtii* and its interaction with the cell wall proteins. *Environmental Chemistry* 1(3):172-179.
- Komjarova I. et 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(2):138-144.

- Kooijman S.A.L.M. 1993. Dynamic energy budgets in biological systems, theory and applications in ecotoxicology. Cambridge.
- Kooijman S.A.L.M. 2000. Dynamic energy and mass budgets in biological systems. Cambridge University Press.
- Kozlova T., Wood C.M. et McGeer J.C. 2009. The effect of water chemistry on the acute toxicity of nickel to the cladoceran *Daphnia pulex* and the development of a biotic ligand model. *Aquatic Toxicology* 91(3):221-228.
- Kraak M.H., Kuipers F., Schoon H., de Groot C.J. et Admiraal W. 1994. The filtration rate of the zebra mussel *Dreissena polymorpha* used for water quality assessment in Dutch rivers. *Hydrobiologia* 294(1):13-16.
- Landrum P.F., Lee H. et Lydy M.J. 1992. Toxicokinetics in aquatic systems: Model comparisons and use in hazard assessment. *Environmental Toxicology and Chemistry* 11(12):1709-1725.
- Larner B.L., Palmer A.S., Seen A.J. et Townsend 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(2):147-157.
- Latouche Y.D. et Mix M.C. 1982. The effects of depuration, size and sex on trace metal levels in bay mussels. *Marine Pollution Bulletin* 13(1):27-29.
- Le Goff F. et Bonnomet V. 2004. Devenir et comportement des métaux dans l'eau : biodisponibilité et modèles BLM. http://www.ineris.fr/centredoc/03_0693_Rapp_Technique_biodisp_ecot.pdf. Rapport technique INERIS.
- Leah J.H. 1993. Impacts of the Zebra mussel (*Dreissena polymorpha*) on water quality and fish spawning reefs in western lake Erie. In: Nalepa TF, Schloesser DW, editors. *Zebra mussels: Biology, Impacts and Control*. Boca Raton, FL: Lewis publishers. p 381-397.
- Leenheer J.A., Croué J.P., Benjamin M., Korshin G.V., Hwang C.J., Bruchet A. et Aiken G.R. 2000. Comprehensive isolation of natural organic matter from water for spectral characterizations and reactivity testing. *ACS Symposium Series*. p 68-83.
- Li L., Xu Z., Wu J. et Tian G. 2010. Bioaccumulation of heavy metals in the earthworm *Eisenia fetida* in relation to bioavailable metal concentrations in pig manure. *Bioresource Technology* 101(10):3430-3436.
- Long A. et Wang W.X. 2005. Assimilation and bioconcentration of Ag and Cd by the marine black bream after waterborne and dietary metal exposure. *Environmental Toxicology and Chemistry* 24(3):709-716.
- Lores E.M., Snyder R.A. et Pennock J.R. 1999. The effect of humic acid on uptake/adsorption of copper by a marine bacterium and two marine ciliates. *Chemosphere* 38(2):293-310.
- Lottin D. 2009. Bioaccumulation de métaux par voie trophique chez une moule d'eau douce (*Dreissena polymorpha*). Rapport de Master SAGE (Systèmes aquatiques et gestion de l'eau). Antony: Cemagref. 49 p.

- Luoma S.N. 1983. Bioavailability of trace metals to aquatic organisms - A review. *Science of the Total Environment* Vol. 28:1-22.
- Luoma S.N. 1989. Can we determine the biological availability of sediment-bound trace elements? *Hydrobiologia* 176-177:379-396.
- Luoma S.N., Johns C., Fisher N.S., Steinberg N.A., Oremland R.S. et Reinfelder J.R. 1992. Determination of selenium bioavailability to a benthic bivalve from particulate and solute pathways. *Environmental Science and Technology* 26(3):485-491.
- Luoma S.N. et Rainbow P.S. 2005. Why Is Metal Bioaccumulation So Variable? Biodynamics as a Unifying Concept. *Environmental Science and Technology* 39(7):1921-1931.
- Mackie G.L. 1991. Biology of the exotic zebra mussel, *Dreissena polymorpha*, in relation to native bivalves and its potential impact in Lake St Clair. *Hydrobiologia* 219:251-268.
- Madon S.P., Schneider D.W., Stoeckel J.A. et 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(2):401-413.
- Mersch J., Morhain E. et 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(8):1475-1485.
- Meybeck M., De Marsily G. et Fustec E. 1998. La Seine en son bassin. Elsevier, editor. Paris: UMR Sisyphe CNRS/université Paris-VI. 749 p.
- Meybeck M., Lestel L., Bonté P., Moilleron R., Colin J.L., Rousselot O., Hervé D., de Pontevès C., Grosbois C. et 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(1-3):204-231.
- Meyer J.S., Adam C., Brix K.V., Luoma S.N., Mount D.R., Stubblefield W.A. et Wood C.M. 2005. Toxicity of dietborne metals to aquatic organisms. Pensacola: Setac press.
- Morel F.M.M. 1983. Principles of Aquatic Chemistry John Wiley & Sons, New York. 446 P.
- Morin S. 2006. Bioindication des effets des pollutions métalliques sur les communautés de diatomées benthiques. Approche *in situ* et expérimentales. Bordeaux: Université de Bordeaux 1. 302 p.
- Myers V.B., Iverson R.L. et Harriss R.C. 1975. The effect of salinity and dissolved organic matter on surface charge characteristics of some euryhaline phytoplankton. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 17(1):59-68.
- Navarro J.M., Fernandez-Reiriz M.J. et Labarta U. 2004. Short-term feeding response of the scallop *Argopecten purpuratus* exposed to two different diets. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom* 84(4):775-779.
- Navarro J.M., Labarta U., Fernandez-Reiriz M.J. et Velasco A. 2003. Feeding behavior and differential absorption of biochemical components by the infaunal bivalve *Mulinia*

- edulis* and the epibenthic *Mytilus chilensis* in response to changes in food regimes. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 287(1):13-35.
- Ng T.Y.T. et Wang W.X. 2005. Modeling of cadmium bioaccumulation in two populations of the green mussel *Perna viridis*. *Environmental Toxicology and Chemistry* 24(9):2299-2305.
- Nicolle F. 2007. Biodisponibilité et bioaccumulation du cadmium dissous chez la moule zébrée (*Dreissena polymorpha*). Rapport de stage de Master. Antony: Cemagref. 53 p.
- Niyogi S., Kent R. et Wood C.M. 2008. Effects of water chemistry variables on gill binding and acute toxicity of cadmium in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): A biotic ligand model (BLM) approach. *Comparative Biochemistry and Physiology - C Toxicology and Pharmacology* 148(4):305-314.
- Paquin P.R., Gorsuch J.W., Apte S., Batley G.E., Bowles K.C., Campbell P.G.C., Delos C.G., Di Toro D.M., Dwyer R.L., Galvez F. and others. 2002. The biotic ligand model: A historical overview. *Comparative Biochemistry and Physiology - C Toxicology and Pharmacology* 133(1-2):3-35.
- Pellet B. 2009. Facteurs de contrôle de la contamination d'un organisme modèle en milieu aquatique multicontaminé: Institut des Sciences et Industries du Vivant et de l'Environnement (Agro Paris Tech).
- Pellet B., Geffard O., Lacour C., Kermoal T., Gourlay-Francé C. et Tusseau-Vuillemin M.-H. 2009. A model predicting waterborne Cd bioaccumulation in *Gammarus pulex*: the effects of dissolved organic ligands, calcium and temperature. *Environmental Toxicology and Chemistry* 28(11):2434-2442.
- Pempkowiak J., Kozuch J. et Southon T. 1994. The influence of structural features of marine humic substances on the accumulation rates of cadmium by a blue mussel *Mytilus edulis*. *Environment International* 20(3):391-395.
- Phillips D.J. et Rainbow P.S. 1989. Strategies of trace metal sequestration in aquatic organisms. *Marine Environmental Research* 28(1-4):207-210.
- Phillips D.J.H. 1980. *Quantitative Aquatic Biological Indicators: Their Use to Monitor Trace Metal and Organochlorine Pollution*. London: Applied Science Publishers Ltd.
- Playle R.C., Dixon D.G. et Burnison K. 1993. Copper and cadmium binding to fish gills: Estimates of metal-gill stability constants and modelling of metal accumulation. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 50(12):2678-2687.
- Pollard A.I. et Yuan L. 2006. Community response patterns: Evaluating benthic invertebrate composition in metal-polluted streams. *Ecological Applications* 16(2):645-655.
- Priadi C., Ayrault S., Pacini S. et Bonte P. In press. Urbanization impact of the Greater Paris Region on metal mobility in suspended sediments in the Seine River, France: Role of iron oxides. *International Journal of Environmental Science and Technology*.
- Pueyo M., Rauret G., Lück D., Yli-Halla M., Muntau H., Quevauviller P. et Lopez-Sanchez 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(2):243-250.
- Qiu J.W., Xie Z.C. et Wang W.X. 2005. Effects of calcium on the uptake and elimination of cadmium and zinc in asiatic clams. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 48(2):278-287.
- Rainbow P.S. 1995. Biomonitoring of heavy metal availability in the marine environment. *Marine Pollution Bulletin* 3:183-192.
- Rainbow P.S. 2002. Trace metal concentrations in aquatic invertebrates: why and so what? *Environmental Pollution* 120(3):497-507.
- Rainbow P.S. et Black W.H. 2002. Effects of changes in salinity and osmolality on the rate of uptake of zinc by three crabs of different ecologies. *Marine Ecology Progress Series* 244:205-217.
- Rainbow P.S. et Black W.H. 2005. Physicochemistry or physiology: Cadmium uptake and effects of salinity and osmolality in three crabs of different ecologies. *Marine Ecology Progress Series* 286:217-229.
- Rainbow P.S., Blackmore G. et Wang W.X. 2003. Effects of previous field-exposure history on the uptake of trace metals from water and food by the barnacle *Balanus amphitrite*. *Marine Ecology Progress Series* 259:201-213.
- Ramade F. 2007. Introduction à l'écotoxicologie. Fondements et applications. Doc T, editor. 618 p.
- Rand G. 1995. Fundamentals of aquatic toxicology. Effects, environmental fate and risk assessment. Boca Raton London: CRC Press. 1125 p.
- Reeders H.H. et Bij de Vaate A. 1990. Zebra mussels (*Dreissena polymorpha*): a new perspective for water quality management. *Hydrobiologia* 200-201(1):437-450.
- Reeders H.H., Bij De Vaate A. et 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(1):133-141.
- Reinfelder J.R. et Fisher N.S. 1991. The assimilation of elements ingested by marine copepods. *Science* 251(4995):794-796.
- Reinfelder J.R., Wang W.X., Luoma S.N. et 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(3):443-452.
- Roditi H.A., Caraco N.F., Cole J.J. et Strayer D.L. 1996. Filtration of Hudson River water by the zebra mussel (*Dreissena polymorpha*). *Estuaries* 19(4):824-832.
- Roditi H.A. et Fisher N.S. 1999. Rates and routes of trace element uptake in zebra mussels. *Limnology and Oceanography* 44(7):1730-1749.
- Roditi H.A., Fisher N.S. et Sañudo-Wilhelmy S.A. 2000a. Uptake of dissolved organic carbon and trace elements by zebra mussels. *Nature* 407(6800):78-80.
- Roditi H.A., Fisher N.S. et Sañudo-Wilhelmy S.A. 2000b. Field testing a metal bioaccumulation model for zebra mussels. *Environmental Science and Technology* 34(13):2817-2825.

- Roesijadi G. et Robinson W.E. 1994. Metal regulation in aquatic animals: Mechanisms of uptake, accumulation, and release. *Aquatic Toxicology. Molecular, Biochemical and Cellular Perspectives*:387-420.
- Santore R.C., Mathew R., Paquin P.R. et DiToro D. 2002. Application of the biotic ligand model to predicting zinc toxicity to rainbow trout, fathead minnow, and *Daphnia magna*. *Comparative Biochemistry and Physiology - C Toxicology and Pharmacology* 133(1-2):271-285.
- Schneider D.W., Madon S.P., Stoeckel J.A. et Sparks R.E. 1998. Seston quality controls zebra mussel [*Dreissena polymorpha*] energetics in turbid rivers. *Oecologia* 117(3):331-341.
- Shi D. et Wang W.X. 2004. Modification of trace metal accumulation in the green mussel *Perna viridis* by exposure to Ag, Cu, and Zn. *Environmental Pollution* 132(2):265-277.
- Shi D. et Wang W.X. 2005. Uptake of aqueous and dietary metals by mussel *Perna viridis* with different Cd exposure histories. *Environmental Science and Technology* 39(23):9363-9369.
- Sigg L., Behra P. et Stumm W. 2006. Chimie des milieux aquatiques. Chimie des eaux naturelles et des interfaces dans l'environnement. Paris, France: Dunod. 564 p.
- Simkiss K. et Taylor M. 1995. Transport of metals across membranes. In: Tessier A, Turner D, editors. Metal speciation and bioavailability in aquatic systems. Chichester: John Wiley & Sons. p 1-44.
- Slaveykova V.I., Wilkinson K.J., Ceresa A. et Pretsch E. 2003. Role of fulvic acid on lead bioaccumulation by *Chlorella kesslerii*. *Environ Sci Technol* 37(6):1114-1121.
- Sloof J.E., Viragh A. et Van der Veer B. 1995. Kinetics of cadmium uptake by green algae. *Water, Air, and Soil Pollution* 83(1-2):105-122.
- Smolders R., Bervoets L. et Blust R. 2002. Transplanted zebra mussels (*Dreissena polymorpha*) as active biomonitors in an effluent-dominated river. *Environmental Toxicology and Chemistry* 21(9):1889-1896.
- Spehar R.L., Leonard E.N. et Defoe D.L. 1978. Chronic effects of cadmium and zinc mixture on flagfish, *Jordanella floridae*. *Trans. Am. Fish. Soc.* 107:354-360.
- Sprung M. et Rose U. 1988. Influence of food size and food quantity on the feeding of the mussel *Dreissena polymorpha*. *Oecologia* 77(4):526-532.
- Stackhouse R.A. et Benson W.H. 1989. Interaction of humic acid with selected trace metals: Influence on bioaccumulation in daphnids. *Environmental Toxicology and Chemistry* 8(7):639-644.
- Stańczykowska A. et Lewandowski K. 1993. Effect of filtering activity of *Dreissena polymorpha* (Pall.) on the nutrient budget of the littoral of Lake Mikolajskie. *Hydrobiologia* 251(1-3):73-79.
- Stuijzand S.C., Kraak M.H.S., Wink Y.A. et Davids C. 1995. Short-term effects of nickel on the filtration rate of the zebra mussel *Dreissena polymorpha*. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 54(3):376-381.

- Suedel B.C., Boraczek J.A., Peddicord R.K., Clifford P.A. et Dillon T.M. 1994. Trophic transfer and biomagnification potential of contaminants in aquatic ecosystems. *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology* 136:21-89.
- Sulzman E.W., Marshall J.D., Brooks J.R., Lajtha K., Garten C.T., Jr P.J.H., Todd D.E., Lau B.B. et Brice D.J. 2007. *Stable isotopes in Ecology and Environmental Science*, 2nd Edition. Michener R, Lajtha K, editors. 592 p.
- Sunda W.G., Engel D.W. et Thuotte R.M. 1978. Effect of chemical speciation on toxicity of cadmium to grass shrimp, *Palaemonetes pugio*: importance of free cadmium ion. *Environmental Science and Technology* 12(4):409-413.
- Tan Q.G. et Wang W.X. 2008. The influences of ambient and body calcium on cadmium and zinc accumulation in *Daphnia magna*. *Environmental Toxicology and Chemistry* 27(7):1605-1613.
- Teil M.-J., Alliot F., Blanchard M., Bourges C., Dagnat C., Desportes A., Gasperi J., Labadie P., Lorgeoux C., Moilleron R. and others. 2009. Contamination de l'Orge et de la Seine par des micropolluants organiques : PBDE, phtalates, alkylphénols et HAP sous différentes conditions hydrologiques. Rapport d'activité 2008 du programme Piren-Seine. 24p.
- Tessier A., Buffle J. et Campbell P.G.C. 1994. Uptake of trace metals by aquatic organisms. In: Buffle J, De Vitre RR, editors. *Chemical and biological Regulation of Aquatic Systems*. Boca Raton: Lewis publishers. p 197-230.
- Tessier A., Campbell P.G.C. et Blsson M. 1979. Sequential extraction procedure for the speciation of particulate trace metals. *Analytical Chemistry* 51(7):844-851.
- Thévenot D., Meybeck M. et Lestel L. 2002. Métaux lourds: des bilans en mutations. Rapport de synthèse Piren-Seine 1998-2001: Piren-Seine, Sisyphe, Univ. Paris 6/CNRS. p 76.
- Thévenot D.R., Lestel L., Tusseau-Vuillemin M.-H., Gonzalez J.-L. et Meybeck M. 2009. Les métaux dans le bassin de la Seine. Plaquette du programme Piren Seine.
- Thévenot D.R., Moilleron R., Lestel L., Gromaire M.C., Rocher V., Cambier P., Bonté P., Colin J.L., de Pontevès C. et 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(1-3):180-203.
- Thomann R.V. 1981. Equilibrium model of fate of microcontaminants in diverse aquatic food chains. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 38(3):280-296.
- Tran D., Boudou A. et Massabuau J.C. 2001. How water oxygenation level influences cadmium accumulation pattern in the asiatic clam *Corbicula fluminea*: A laboratory and field study. *Environmental Toxicology and Chemistry* 20(9):2073-2080.
- Tsui M.T.K. et Wang W.X. 2007. Biokinetics and tolerance development of toxic metals in *Daphnia magna*. *Environmental Toxicology and Chemistry* 26(5):1023-1032.
- Tusseau-Vuillemin M.H. 2001. Do food processing industries contribute to the eutrophication of aquatic systems? *Ecotoxicology and Environmental Safety* 50(2):143-152.

- Tusseau-Vuillemin M.H., Gilbin R., Bakkaus E. et 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(9):2154-2161.
- Tusseau-Vuillemin M.H., Gourlay C., Lorgeoux C., Mouchel J.M., Buzier R., Gilbin R., Seidel J.L. et Elbaz-Poulichet F. 2007. Dissolved and bioavailable contaminants in the Seine river basin. *Science of the Total Environment* 375(1-3):244-256.
- Vanderploeg H.A., Liebig J.R., Carmichael W.W., Agy M.A., Johengen T.H., Fahnenstiel G.L. et 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(6):1208-1221.
- Vasseur P. et Cossu-Leguille C. 2003. Biomarkers and community indices as complementary tools for environmental safety. *Environment International* 28(8):711-717.
- Vercauteren K. et Blust R. 1996. Bioavailability of dissolved zinc to the common mussel *Mytilus edulis* in complexing environments. *Marine Ecology Progress Series* 137(1-3):123-132.
- Vigneault B., Percot A., Lafleur M. et Campbell P.G.C. 2000. Permeability changes in model and phytoplankton membranes in the presence of aquatic humic substances. *Environ Sci Technol* 34(18):3907-3913.
- Voets J. 2008. Accumulation and effects of trace metals in zebra mussels (*Dreissena polymorpha*). Antwerpen: Thèse de l'Université d'Anvers. 278 p.
- Voets J., Bervoets L. et Blust R. 2004. Cadmium Bioavailability and Accumulation in the Presence of Humic Acid to the Zebra Mussel, *Dreissena polymorpha*. *Environmental Science and Technology* 38(4):1003-1008.
- Voets J., Talloen W., de Tender T., van Dongen S., Covaci A., Blust R. et Bervoets L. 2006. Microcontaminant accumulation, physiological condition and bilateral asymmetry in zebra mussels (*Dreissena polymorpha*) from clean and contaminated surface waters. *Aquatic Toxicology* 79(3):213-225.
- Wallace W.G., Lee B.G. et Luoma S.N. 2003. Subcellular compartmentalization of Cd and Zn in two bivalves. I. Significance of metal-sensitive fractions (MSF) and biologically detoxified metal (BDM). *Marine Ecology Progress Series* 249:183-197.
- Wallace W.G. et Lopez G.R. 1996. Relationship between subcellular cadmium distribution in prey and cadmium trophic transfer to a predator. *Estuaries* 19(4):923-930.
- Wallace W.G., Lopez G.R. et Levinton J.S. 1998. Cadmium resistance in an oligochaete and its effect on cadmium trophic transfer to an omnivorous shrimp. *Marine Ecology Progress Series* 172:225-237.
- Wallace W.G. et Luoma S.N. 2003. Subcellular compartmentalization of Cd and Zn in two bivalves. II. Significance of trophically available metal (TAM). *Marine Ecology Progress Series* 257:125-137.
- Wang W.-X. et Fisher N.S. 1998. Assimilation efficiencies of chemicals contaminants in aquatic invertebrates: a synthesis. *Environmental Toxicology and Chemistry* 18(8):2034-2045.

- Wang W.-X., Fisher N.S. et Luoma S.N. 1995. Assimilation of trace elements ingested by the mussel *Mytilus edulis*: effects of algal food abundance. *Marine Ecology Progress Series* 129(1-3):165-176.
- Wang W. 1987. Factors affecting metal toxicity to (and accumulation by) aquatic organisms - overview. *Environment International* 13(6):437-457.
- Wang W.X. et Fisher N.S. 1996. Assimilation of trace elements and carbon by the mussel *Mytilus edulis*: Effects of food composition. *Limnology and Oceanography* 41(2):197-207.
- Wang W.X. et Fisher N.S. 1997. Modeling the influence of body size on trace element accumulation in the mussel *Mytilus edulis*. *Marine Ecology Progress Series* 161:103-115.
- Wang W.X. et Fisher N.S. 1999. Delineating metal accumulation pathways for marine invertebrates. *Science of the Total Environment* 237-238:459-472.
- Wang W.X., Fisher N.S. et Luoma S.N. 1996. Kinetic determinations of trace element bioaccumulation in the mussel *Mytilus edulis*. *Marine Ecology Progress Series* 140(1-3):91-113.
- Wang W.X. et Rainbow P.S. 2006. Subcellular partitioning and the prediction of cadmium toxicity to aquatic organisms. *Environmental Chemistry* 3(6):395-399.
- Wang W.X. et Rainbow P.S. 2008. Comparative approaches to understand metal bioaccumulation in aquatic animals. *Comparative Biochemistry and Physiology - C Toxicology and Pharmacology* 148(4):315-323.
- Wang W.X., Yan Q.L., Fan W. et Xu Y. 2002. Bioavailability of sedimentary metals from a contaminated bay. *Marine Ecology Progress Series* 240:27-38.
- Wildridge P.J., Werner R.G., Doherty F.G. et Neuhauser E.F. 1998. Acute effects of potassium on filtration rates of adult zebra mussels, *Dreissena polymorpha*. *Journal of Great Lakes Research* 24(3):629-636.
- Winter J.E. 1973. The filtration rate of *Mytilus edulis* and its dependence on algal concentration, measured by a continuous automatic recording apparatus. *Marine Biology* 22(4):317-328.
- Wolterbeek H.T., Viragh A., Sloof J.E., Bolier G., van der Veer B. et de Kok J. 1995. On the uptake and release of zinc (^{65}Zn) in the growing alga *Selenastrum capricornutum* Printz. *Environmental Pollution* 88(1):85-90.
- Woodward D.F., Brumbaugh W.G., DeLonay A.J., Little E.E. et Smith C.E. 1994. Effects on rainbow trout fry of a metals-contaminated diet of benthic invertebrates from the Clark Fork River, Montana. *Transactions of the American Fisheries Society* 123(1):51-62.
- Xue H.B., Stumm W. et Sigg L. 1988. The binding of heavy metals to algal surfaces. *Water Research* 22(7):917-926.
- Young M.L. 1975. The transfer of ^{65}Zn and ^{59}Fe along a *Fucus serratus* (L.)→ *Littorina obtusata* (L.) food chain. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom* 55:583-610.

Zaroogian G.E. et Johnson M. 1984. Nickel uptake and loss in the bivalves *Crassostrea virginica* and *Mytilus edulis*. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 13(4):411-418.

Annexes

Article 1:

Bourgeault A., Gourlay-Francé C., Tusseau-Vuillemin M. H., 2010. Modelling the effect of water chemistry on the bioaccumulation of waterborne Cd in zebra mussels. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 29(10):2182-2189.

Article 2:

Bourgeault A., Gourlay-Francé C., Vincent-Hubert F., Palais F., Geffard A., Biagianti Risbourg S., Pain-Devin S., Tusseau-Vuillemin M.-H., 2010. Lessons from a transplantation of zebra mussels into a small urban river: An integrated ecotoxicological assessment. *Environmental Toxicology*, 25(5):468-478.

Article 3:

Priadi C., Bourgeault A., Ayrault S., Gourlay-Francé C., Tusseau-Vuillemin M. H., Philippe Bonté, Jean-M. Mouchel. Time-integrated metal partitioning using sediment trap and DGT samplers in an urban river: Comparison of spatial and temporal variability with discrete metal partitioning.

En cours de soumission au Journal of Environmental Monitoring.

Article 4:

Bourgeault A., Priadi C., Gourlay-Francé C., Ayrault S., Tusseau-Vuillemin M. H. Assessment of metals Assimilation Efficiencies from field bioaccumulation modelling.

En préparation pour Environmental Science and Technology.

Article 1

Modelling the Effect of Water Chemistry on the Bioaccumulation of Waterborne Cadmium in Zebra Mussels

Environmental Toxicology and Chemistry

29(10): 2182-2189

(Submitted 2 February 2010; Returned for Revision 13 March 2010; Accepted 9 May 2010)

Adeline Bourgeault^{†‡}, Catherine Gourlay-Francé^{†‡*} and Marie-Hélène Tusseau-Vuillemin^{†‡}

[†] Cemagref, Unité de Recherche Hydrosystèmes et Bioprocédés, Parc de Tourvoie - BP 44, F-92163 Antony,
France

[‡] Fédération Ile de France de Recherche sur l'Environnement FR-3020, 4 place Jussieu, F-75005 Paris, France

Abstract – The present study aims at investigating the effects of zinc, calcium and Dissolved Organic Carbon (DOC) on the waterborne cadmium bioaccumulation of a freshwater bivalve (*Dreissena polymorpha*). Mussels were exposed for 48hrs at $3\mu\text{g.L}^{-1}$ of Cd in different media. Their physiological activities were assessed by separately measuring the filtration rate in the same exposure water. Increased zinc (from 3 to 89 $\mu\text{g.L}^{-1}$) and calcium (from 37 to 131 mg.L^{-1}) concentrations in water led to a 3-fold and 7-fold reduction of cadmium bioaccumulation, whereas the effect of DOC varied greatly depending on its concentration. At low DOC concentrations (from 0.2 to 1.1 mg.L^{-1}), the uptake of Cd increased, whereas at higher concentrations (from 1.1 to 17.1 mg.L^{-1}), the uptake decreased. The filtration activity was not strongly influenced by either Zn or Ca concentration, whereas it was modified in enriched DOC media in the same manner as Cd uptake. A competitive model was built to predict the waterborne uptake rate constant of cadmium (k_u) as a function of Zn and Ca concentrations in the water. Over the range of DOC concentrations we tested, organic matter was shown to influence Cd bioaccumulation in two ways: by modifying Cd speciation and thus its bioavailability and its interaction with the biological membrane, and by affecting the mussel's physiology and therefore its sensitivity to metal. The present study provides a useful means of adjusting the toxico-kinetic constant to the water's physico-chemical characteristics and proposes a unifying model which takes into account the different geochemical and biological influences on bioaccumulation.

Keywords: Cadmium bioavailability, Zebra mussel, Uptake rate constant, Predictive model, Filtration rate

INTRODUCTION

The water's chemical composition (concentration of majors ions, contaminants and organic matter) has often been pointed out as influencing the biological response [1-3]. Indeed, the bioaccumulation and the toxicity of Cd are modulated by different parameters such as calcium, zinc and DOC concentrations. Different studies reported a decreased bioaccumulation of cadmium in different species when Ca concentration increased: *Daphnia magna* [4], *Corbicula fluminea* [5], *Lymnea stagnalis* [6] and *Gammarus pulex* [7]. It was also demonstrated that zinc had a protective effect on Cd toxicity [8, 9]. The protective effect of dissolved organic matter (DOM) has been reported by different studies,[10, 11] since it modifies Cd speciation. However, some exceptions were also reported, in particular for some bivalves like *Mytilus edulis* or *Dreissena polymorpha* [12-14].

Different models have been proposed to explain the toxicity of dissolved metals to organisms. It is generally accepted that this toxicity is related to the metal's binding to specific uptake sites on the surface of organisms. Metal binding depends on the metal speciation..The Biotic Ligand Model (BLM), assesses and predicts the bioavailability of dissolved metals using information on water chemistry [15] and more precisely on the free ion activity. It takes into account the competition and the complexation of the free metal ion in order to describe the metal's capacity to bind to a biological ligand. Toxic-

kinetic models have been developed to link the water's pollutant concentration and the bioaccumulation in aquatic organisms. One of these models, the biodynamic model [16], describes the accumulation in organisms as the result of an accumulation from the dissolved and the particulate phases and as a elimination phenomenon caused by an efflux of contaminant and growth. Using this model to interpret field bioaccumulation data requires the determination of uptake and elimination rate constants in controlled laboratory conditions. These constants are potentially modified by physico-chemical parameters like DOC, seston quality [17] or water temperature [18] and are thus limited in their application to other aquatic systems with different trophic levels or water chemistry. Although the BLM and the biodynamic model do not describe the effect of metals on organisms in the same way, both models are based on common principles (at least as far as waterborne metal is concerned) derived from enzyme-like kinetics and membrane transport as pointed out by Croteau and Luoma [6].

Nevertheless, although water composition was experimentally shown to strongly influence bioaccumulation kinetics, water chemistry still needs to be explicitly integrated into toxico-kinetic models to improve waterborne in-situ bioaccumulation modelling. In the framework of the BLM, the toxicity of metals was most often determined from toxicity tests in which organisms were exposed to high metal concentrations. Yet the mechanisms involved under environmental concentrations can differ from the ones observed with acute toxicity tests.

The present study aims at evaluating the effect of different water chemistry parameters (i.e. Zn, Ca and DOC concentrations) on a cadmium biodynamic constant - the uptake rate constant. We also aim at proposing a model to quantify the influence of these three parameters simultaneously. Zebra mussels were exposed to dissolved Cd under various environmental concentrations of zinc, calcium and dissolved organic matter. The range of concentrations was wide enough to include most river systems [19]. Through semi-static exposures, we assessed the influence of water composition on dissolved Cd accumulation in a freshwater bivalve, *Dreissena polymorpha*. The Zebra mussel is widely recognized as a suitable indicator and is often used for the biomonitoring of freshwater [20]. Indeed it has characteristics that make it a good biomonitor of contamination: it is an integrative tool that concentrates both dissolved and particulate contaminants through its filtration activity, and its tolerance to different types of stress enables transplantation.

MATERIALS AND METHODS

Collection and handling of mussels

Zebra mussels were collected in the Meuse-Marne canal near Commercy (France) (48°45'33"N, 5°36'05"W) in July 2008 and January 2009 and selected by length (20 to 22mm). Mussels were acclimated in the laboratory on a diet of *Chlorella* powder (Naturland Bio-Chlorella, GSE Vertrieb GmbH Saarbrücken, Germany) for at least 15 days prior to experiments. The animals were acclimated in aerated mineral water

(Valvert spring, Etalle, Belgium) at 15°C with a 10:14hrs light:dark photoperiod. Ammonium, nitrite and nitrate concentrations were daily monitored and the water was renewed when the concentrations reached 2, 0.25 and 25 mg.L⁻¹ respectively.

Experimental design

Aldrich humic acid (HA) (Sigma, France), CaCl₂ (analytical grade, Fisher Scientific, France) or ZnSO₄·7H₂O (analytical grade, Acros Organics, Belgium) were added to Valvert mineral water to prepare the experimental media. Cadmium stock solution was prepared from cadmium chloride (CdCl₂·2.5H₂O, analytical grade, Fisher Scientific). HA stock solution (1 g.L⁻¹) was prepared by dissolving Aldrich humic acid in ultrapure water (Elga, France). The solution was then stirred for 24hrs and filtered through a 0.45µm membrane filter to remove particles.

Each experimental chamber contained 12L of water and 15 mussels. In order to limit Cd adsorption onto the chamber walls and ensure a constant exposure, the acid-washed chambers were conditioned with the spiked medium one night prior to experiment. The medium was renewed after 24hrs of exposure. Mussels were exposed for 48hrs to 3 µg.L⁻¹ of Cd in a thermostated room with a 10:14hrs light:dark photoperiod. At this Cd concentration, no toxicity is observed on the physiological activities of zebra mussels [21]. The mussels were not fed during the 48hrs of exposure. Varying amounts of ZnSO₄·7H₂O, CaCl₂ or HA solution were added to the mineral water to obtain Zn, Ca and DOC concentrations that ranged respectively from 3 to 89 µg.L⁻¹, from 37 to 131 mg.L⁻¹ and from 0.2 to 17.1 mg.L⁻¹. These large ranges of concentrations encompass the majority of freshwater systems including unusual as highly carbonated systems [22], some rivers highly contaminated [23] or highly loaded in organic matter [24]. Two chambers containing only mineral water were prepared for the control treatments. The detailed water composition and temperature are presented in Table 1.

Five mussels were collected at 0, 10, 24 and 48h. Mussels were individually dissected, freeze-dried and weighed. Dried tissues were then individually digested in polypropylene tubes (Sarstedt, France) with HNO₃ (65% supra pur Merck, France) and H₂O₂ (30% supra pur Merck, France): 50µL.mg_{dry wt}⁻¹ of HNO₃ were added on day 1 and 20µL.mg_{dry wt}⁻¹ of H₂O₂ on day 2. Digests were then filled out with ultrapure water (430 µL.mg_{dry wt}⁻¹) on day 7. Zinc and cadmium concentrations in mussel tissues were analyzed with a graphite furnace (Cd) or flame (Zn) atomic absorption spectrophotometry (AAS Spectra 220Z and 220FS, Varian). A reference material (Mussel Tissue ERM-CE 278) was used to validate the digestion method. The measured concentrations have a relative standard deviation of 3% (Cd) and 14% (Zn) from the certified values (*n*=3); these results were considered satisfactory. All metal concentration in tissue was expressed in µg of metal per g of dry weight tissue (µg.g_{dw}⁻¹).

		[DOC] mg.L ⁻¹	[Ca ²⁺] mg.L ⁻¹	[Zn] µg.L ⁻¹	[Cd] µg.L ⁻¹	T° °C	pH
Zn experiment	Reference 1	0.2 ± 0.1	70.5 ± 1.8	1.6 ± nd	3.3 ± 0.1	10.8 ± 0.9	7.5 ± 0.3
		0.1 ± 0.1	72.5 ± 0.6	12.6 ± 3.6	3.2 ± 0.1	11.7 ± 0.4	7.6 ± 0.2
		0.3 ± 0.2	72.3 ± 0.6	44.4 ± 0.5	3.2 ± 0.1	11.1 ± 0.5	7.5 ± 0.2
		0.2 ± 0.1	72.3 ± 0.7	89.2 ± 1.9	3.3 ± 0.1	10.8 ± 0.6	7.5 ± 0.3
Ca experiment		0.2 ± 0.1	36.5 ± 0.4	1.6 ± 1.6	3.4 ± 0.1	11.1 ± 1.5	7.7 ± 0.4
	Reference 1	0.2 ± 0.1	70.5 ± 1.8	1.6 ± nd	3.3 ± 0.1	10.8 ± 0.9	7.5 ± 0.4
		0.2 ± 0.1	99.4 ± 0.9	1.4 ± nd	3.2 ± 0.1	10.6 ± 0.5	7.7 ± 0.4
		0.2 ± 0.2	131.4 ± 3.8	2.0 ± 1.1	3.1 ± 0.2	10.4 ± 0.2	7.6 ± 0.5
HA experiment	Reference 2	0.2 ± 0.1	59.8 ± 3.4	<LQ	2.1 ± 0.8	12.3 ± 1.3	8.5 ± 0.1
		0.5 ± 0.2	75.0 ± 2.8	<LQ	2.7 ± 0.2	13.7 ± 1.1	8.3 ± 0.1
		1.1 ± 0.1	71.1 ± 8.3	<LQ	2.6 ± 0.2	13.1 ± 0.6	8.2 ± 0.1
		3.1 ± 0.1	72.3 ± 6.2	<LQ	2.6 ± 0.2	13.3 ± 0.5	8.1 ± 0.2
		8.2 ± 0.3	73.7 ± 1.6	<LQ	2.6 ± 0.2	13.1 ± 0.5	8.1 ± 0.2
		17.1 ± 0.3	70.0 ± 4.0	<LQ	2.6 ± 0.2	13.9 ± 0.4	8.0 ± 0.2

Table 1 : Water chemistry used in bioaccumulation experiments. Mean calculated over 48hrs of exposure (n=5) ± standard deviation. LQ: limit of quantification (2µg.L⁻¹ for Zn). When the measure was below the LQ, the corresponding value was considered to be equal to LQ/2. nd: not determined, standard deviation corresponding to a mean established on a set of values including 4 values below the LQ.

Water was sampled at 0, 10, 24 (before and after the renewal of water) and 48hrs to determine the concentration of major ions, pH, DOC, Cd and Zn concentrations. Ion concentrations were determined by chromatography (Dionex DX-120, France) and dissolved organic carbon was analysed using a Total Organic Carbon analyzer (Bioritech 1010, France). Water samples (5 mL) were acidified with 50µL HNO₃ for total dissolved metal determination. Low Zn and Cd concentrations were measured with a graphite furnace atomic absorption spectrometry (GF-AAS) whereas high Zn concentrations were determined by flame AAS. A certified reference water sample (SCP Science, EP-L-2, France) was analysed at least once during each analytical run to confirm the analytical results; the values we obtained were within the confidence interval (n=5).

Filtration rate measurements

It was not possible to directly determine the filtration rate (*FR*) during Cd accumulation experiments without disturbing either the medium or the organisms. The filtration activity was thus monitored through parallel experiments with the addition of a tracer in the medium (algae). Five mussels were placed in a 500mL-chamber containing water whose composition was similar to the one used in bioaccumulation experiments (without Cd) on a sieve which allowed stirring to take place. Algae *Selenastrum capricornutum* were added at a concentration of 1.10⁶ cells.mL⁻¹. Previous research has shown that the filtration rate of mussels depends on the concentration of particles in the solution [25]. Consequently, the apparent filtration rate (*FR_{app}*) is only a proxy of the actual filtration rate occurring during Cd accumulation experiments. However, since the algae concentration was the same in all filtration rate estimations, we infer in the following that differences in *FR_{app}* between exposure media are caused by the water composition. The *FR_{app}* was estimated from the decrease in algae concentration after 3hrs, following [26]:

$$FR_{app} = \frac{V}{n \cdot t} \ln \frac{C_0}{C_T} \quad (1)$$

where FR_{app} is the apparent filtration rate ($\text{mL.mussel}^{-1}.\text{hrs}^{-1}$), V is the water volume (mL), n is the number of mussels, t is the length of the experiment (hrs) – namely 3 hrs –, C_0 and C_T are the starting and the final particle concentrations (cells.mL^{-1}). One additional chamber containing no mussels was used as control to measure any decay of algae caused by sedimentation. Algae concentration was determined by measuring the optical density of water samples with a spectrophotometer (680 nm). For each medium the spectrophotometer was zeroed on exposure water. Moreover, optical density is biased in the presence of humic acids. For each HA concentration, a calibration curve was therefore established to link absorbance and algae concentration. For reproducibility concern, the measurement was carried out on two sets of mussels for Zn and Ca treatments. Given the experimental difficulty to make a reproducible HA solution, FR_{app} was measured only once for DOC treatment.

Uptake rate constant estimation

A first-order toxico-kinetic model [16] was used, assuming the efflux of metal to be negligible because of the short length of exposure and the very low efflux rate constant of Cd (ie 0.011 j^{-1}) [27]. Thus, the concentration of Cd in soft tissues C ($\mu\text{g.g}_{\text{dry wt}}^{-1}$) was related to the uptake rate constant from the dissolved phase k_u ($\text{L.g}^{-1}.\text{d}^{-1}$) and the bioavailable dissolved metal concentration $[M]$ ($\mu\text{g.L}^{-1}$) as follows:

$$\frac{dC}{dt} = k_u \cdot [M] \quad (2)$$

The uptake rate constant of Cd (k_u) was determined by linear regression of all individual Cd in soft tissue (C) as a function of time (least-squares estimation) divided by the mean dissolved Cd concentration. The associated standard deviation included the uncertainty from both the slope of the line and the chemical Cd measurements in water.

RESULTS

Bioaccumulation experiments

The dissolved Cd concentrations decreased by 5% on average (max. 13%) in each treatment over the first 24hrs of exposure, as well as over the next 24hrs. The decrease was counterbalanced by the renewal of water after 24hrs. Hence, we consider that dissolved Cd concentration in water remained stable during exposure. The average concentrations are given in Table 1. For each series of experiment (Ca and Zn on one side and DOC on the other side), we verified that temperature and pH remain constant (maximum variation of 1.6°C and 0.5 pH unit).

Examples of Cd accumulation kinetics are presented in Figure 1. Whatever the Zn, Ca or DOC concentrations tested, a significant (T-test, $p < 0.05$) amount of Cd was accumulated after 48hrs of exposure (final concentrations from 1.02 ± 0.05 to 2.71 ± 0.01 for Zn, 0.88 ± 0.19 to 2.90 ± 0.31 for Ca, 2.40 ± 0.76 to $4.11 \pm 0.23 \mu\text{g.g}_{\text{dry wt}}^{-1}$ for DOC) compared to controls (control Zn/Ca treatment: $0.38 \pm 0.08 \mu\text{g.g}_{\text{dry wt}}^{-1}$; control DOC

treatment: $0.75 \pm 0.13 \mu\text{g.g}_{\text{dry wt}}^{-1}$). In some cases, no significant accumulations were detected after the first 10hrs of exposure. Hence, only concentrations in mussels between 10 and 48hrs were considered to calculate k_u by linear regression of the concentration in organisms against time. The linearity of accumulation was checked *a posteriori* by correlation coefficients ranging from 0.64 to 0.89 ($n=15$) with an exception for the 150mg.L^{-1} Ca treatment ($r^2=0.25$, $n=15$). As shown on Figure 2, no significant increase in accumulated Zn concentration was detected in mussel tissue whatever the concentration of Zn (from 2.7 to $89.2 \mu\text{g.L}^{-1}$).

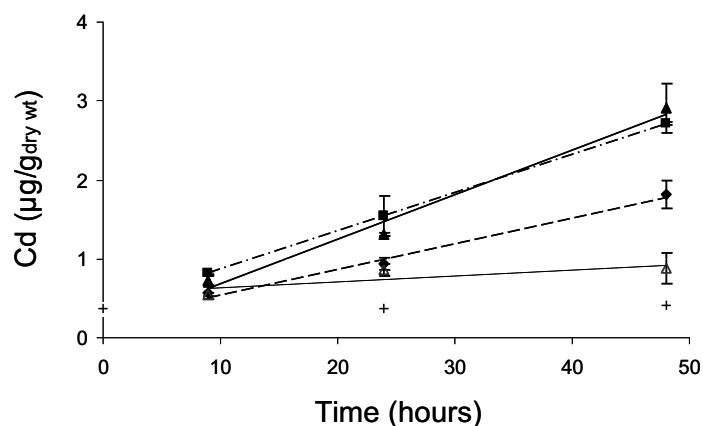


Figure 1: Cd bioaccumulation kinetics from the dissolved phase in *D. polymorpha* at four different calcium concentrations. Points are mean and standard deviation ($n=5$). \blacktriangle — [Ca] = 36 mg/L, $r^2 = 0.89$; \blacksquare - - - [Ca] = 70 mg/L, $r^2 = 0.89$; \blacklozenge ····· [Ca] = 99 mg/L, $r^2 = 0.88$; \triangle - ····· [Ca] = 131 mg/L, $r^2 = 0.25$; + control without Cd.

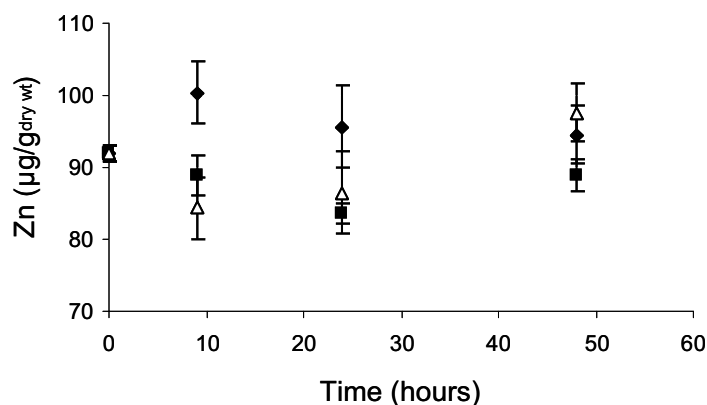


Figure 2: Mussel zinc body burden during the exposure to three different Zn concentrations. Points are mean and standard deviation ($n=5$). \blacksquare Zn=13 $\mu\text{g/L}$; \blacklozenge Zn=44 $\mu\text{g/L}$; \triangle Zn=89 $\mu\text{g/L}$.

The Cd uptake rate constants in various media are presented on Figure 3. The range of k_u (ie from 0.06 to $0.70 \text{ L.g}_{\text{dry wt}}^{-1}.\text{d}^{-1}$) is lower compare to Roditi's study [27] (i.e. 2.3- $3.22 \text{ L.g}_{\text{dry wt}}^{-1}.\text{d}^{-1}$). The Zn, Ca and DOC levels significantly affected the uptake rate constant of cadmium ($p < 0.01$, z-test). Increases in ambient Zn (especially at low Zn concentrations) and Ca concentration strongly decreased the Cd uptake rate constant. Indeed, exposure to a range of Zn (2.7 to $89.2 \mu\text{g.L}^{-1}$) and Ca (36.5 to 131.4 mg.L^{-1}) concentrations resulted in a 3-fold (0.35 vs $0.13 \text{ L.g}_{\text{dry wt}}^{-1}.\text{d}^{-1}$) and 7-fold (0.42 vs 0.06

$L \cdot g_{dry} \cdot wt \cdot d^{-1}$) reduction of the Cd uptake rate constant. The uptake rate constant (k_u) was affected differently by DOC compared to Ca and Zn: at low DOC concentrations (0.2 to 1.1 mgDOC.L⁻¹), k_u increased, whereas at higher concentrations (1.1 to 17.1 mgDOC.L⁻¹), k_u decreased.

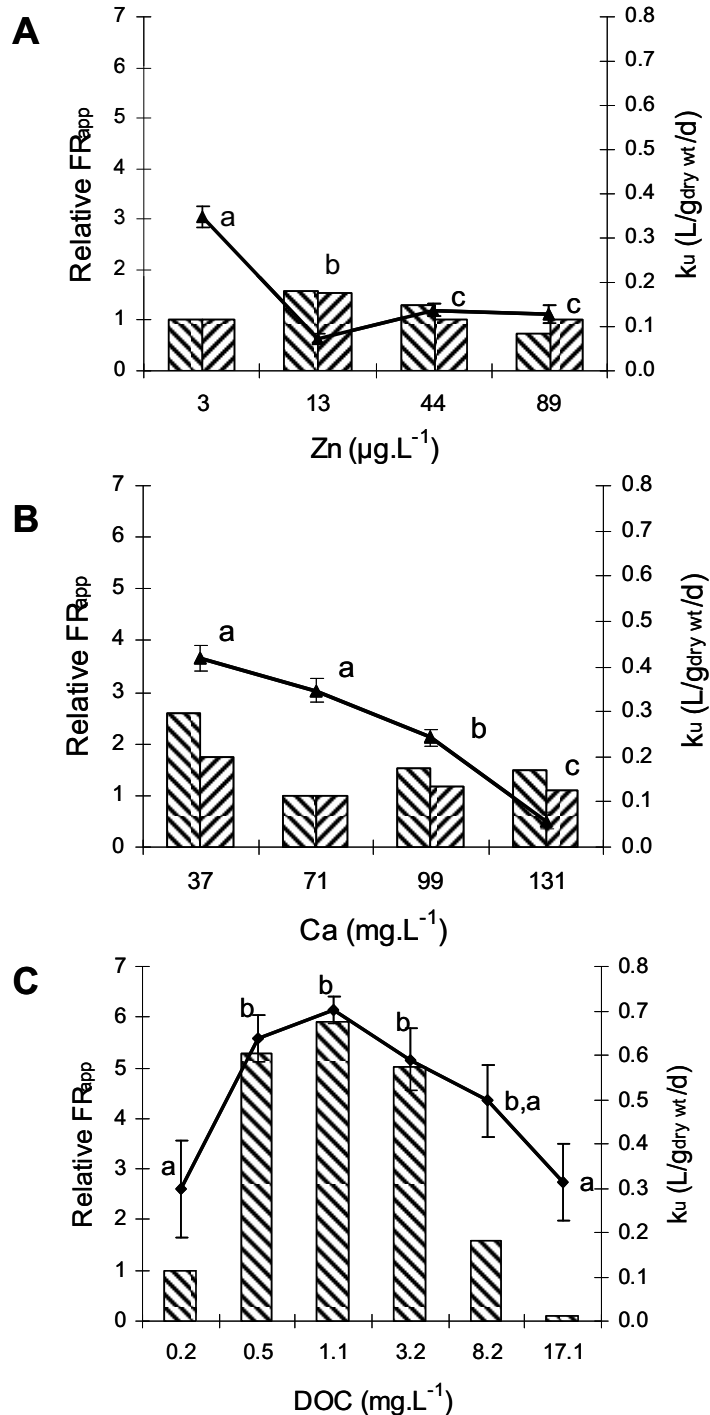


Figure 3: Effects of Zn (A), Ca (B) and dissolved organic carbon (C) on Cd uptake rate constant (k_u) and associated relative apparent filtration rate (FR_{app}). k_u are mean and standard deviation, ($n=15$). Different letters denote a statistical difference among the range of concentration, z-test ($p < 0.01$). For comparison purposes, FR_{app} was normalized by the FR app in the reference medium (mineral water only), leading to an estimation of a relative FR_{app} . ▨ FR_1 ; ▩ FR_2 ; -▲ - k_u .

Filtration rate experiments

Apparent filtration rates are presented in Figure 3. For experiments with Ca and Zn, FR_{app} was determined on two sets of mussels. Relative FR_{app} varies up to 1.6-fold with Zn concentrations, 2.6-fold with Ca concentrations and 5.9-fold with DOC concentrations. Considering the rather high standard deviation between relative FR_{app} measurements (up to 50% variation between the two measurements), it was considered that FR_{app} is the same whatever the Ca and Zn concentrations. In the case of DOC, even though only one measure was performed for each concentration tested, the difference observed over the range of concentrations was considered as significant. As can be observed on Figure 3, FR_{app} and k_u followed similar patterns when DOC concentrations varied.

DISCUSSION

Zinc body burden

Zn accumulation was not detected in tissues, which is rather common for essential metals [28]. The measured Zn concentrations in mussel tissues fluctuated around $90 \mu\text{g}\cdot\text{g}_{\text{dry wt}}^{-1}$, which is comparable to the common regulated concentration [29]. In mussels, the influx of Zn is counterbalanced by the efflux, resulting in an approximately constant body burden over a wide range of concentrations [29]. Studies that report the accumulation of Zn in mussels generally use sensitive isotopic methods [30] or high and environmentally unrealistic exposure concentrations in the $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ order [31] which probably exceed the threshold of non-regulation.

Effect of Ca and Zn and modelling establishment

The decrease of k_u with increasing Ca and Zn concentrations shows that these ions inhibit Cd accumulation. Whatever the treatment, the apparent filtration rate remains constant. Moreover the free ion concentration remains constant (estimation using the software Visual MINTEQ, Visual Basic 0.6, Sweden). Thus, this inhibition effect cannot be imputed to a physiological modification of the organism but rather to a process acting on the accessibility of Cd to gill binding sites. This result corroborates previously published observations that Cd is accumulated through high affinity Ca channels [5] and inhibits the uptake pathway of this cation [32]. The competitive effect between Ca and Cd for binding sites on the gills' surface has been reported in various other species [5, 7], as well as the competitive effect between Cd and Zn [8, 31].

In order to describe the observed competitive effect, data was interpreted using a two-compartment model in which the uptake rate was related to the concentrations of Ca and Zn. It is considered that metal is transferred from water to the organism through sites on the biological membrane by interacting first with a free surface site (BL_{free}):



In our experiment, given the low initial Cd body burden and the absence of significant efflux (as described in the Results part), we assume that externalization is negligible when compared to internalization. The bioaccumulation processes can thus be simplified as:



The concentration of the surface complex $\{MBL\}$, internalized metal $\{M_{int}\}$ and dissolved metal $[M]$ are therefore given by:

$$\frac{d\{MBL\}}{dt} = k_1 \cdot \{BL\}_{free} \cdot [M] - (k_{-1} + k_2) \cdot \{MBL\} \quad (5)$$

$$\frac{d\{M_{int}\}}{dt} = k_2 \cdot \{MBL\} \quad (6)$$

$$\frac{d[M]}{dt} = k_{-1} \cdot \{MBL\} - k_1 \cdot [M] \cdot \{BL\}_{free} \quad (7)$$

where k_1 , k_{-1} and k_2 are respectively the adsorption, dissociation and internalization rate constants. The symbols $\{\}$ and $[\]$ correspond to the activities of surface and dissolved species respectively.

The metal concentration that is measured in mussel soft tissue (C) is the sum of the metal adsorbed to membrane $\{MBL\}$ and the internalized metal $\{M_{int}\}$, thus:

$$\frac{dC}{dt} = \frac{d\{MBL\}}{dt} + \frac{d\{M_{int}\}}{dt} \quad (8)$$

Assuming that adsorption is characterized by fast exchange rates, whereas internalisation is characterized by slow exchanges [33, 34], at any moment $\frac{d\{MBL\}}{dt}$ is null, and

therefore $\frac{dC}{dt}$ is restricted to $\frac{d\{M_{int}\}}{dt}$. Combining Equation 6 and Equation 2, k_u can thus be expressed as follows:

$$k_u = \frac{k_2 \cdot \{MBL\}}{[M]} \quad (9)$$

Assuming the dissolved metal concentration in the water around the biological membrane to be constant during exposure (which is corroborated by a constant Cd concentration in the exposure medium), $\frac{d[M]}{dt}$ equals zero. Combining Equation 9 with Equation 7, we obtain:

$$k_u = \frac{k_2 \cdot k_1}{k_{-1}} \cdot \{BL\}_{free} \quad (10)$$

As described by Xue et al. [35], the binding of cations C_i to the biotic ligand is characterized by its affinity constant K_{C_iBL} which is:

$$K_{C_iBL} = \frac{\{C_iBL\}}{[C_i] \cdot \{BL\}_{free}} \quad (11)$$

The higher the binding affinity constant is, the greater the ion competition will be.

The maximal binding site concentration $\{BL\}_{max}$ is the sum of the free biotic ligand $\{BL\}_{free}$, metal bound to the biotic ligand $\{MBL\}$ and competitor cations bound to the biotic ligand $\sum \{C_iBL\}$.

$$\{BL\}_{max} = \{BL\}_{free} + \{MBL\} + \sum_i \{C_iBL\} \quad (12)$$

For low concentrations of metals ($\{MBL\} \ll \sum \{C_iBL\}$), we obtain from Equation 11 and 12:

$$\{BL\}_{free} = \{BL\}_{max} \cdot \left(\frac{1}{1 + \sum_i K_{C_i, BL} \cdot [C_i]} \right) \quad (13)$$

Thus, considering Equation 10 and 13 we obtain:

$$k_u = k_{u_{max}} \cdot \left(\frac{1}{1 + \sum_i K_{C_i, BL} \cdot [C_i]} \right) \quad (14)$$

$$\text{where } k_{u_{max}} = \frac{k_1 \cdot k_2 \cdot \{BL\}_{max}}{K_{-1}}$$

Following Wang et al. [36], we define k_u as the product of the metal's absorption efficiency α (%) and the animal's filtration rate FR ($L \cdot g_{dry\ wt}^{-1} \cdot d^{-1}$):

$$k_u = \alpha \cdot FR = \alpha' \cdot FR_{app} \quad (15)$$

The measured filtration rate (i.e. FR_{app}) is not the actual FR (see M&M). Hence, absorption efficiency was identified as α' . Combining Equation 14 and 15, the metal's absorption efficiency can thus be expressed as:

$$\alpha' = \frac{k_{u_{max}}}{FR_{app_ref}} \cdot \left(\frac{1}{1 + K_{CaBL} \cdot [Ca] + K_{ZnBL} \cdot [Zn]} \right) \quad (16)$$

The apparent filtration rate was the same whatever the Ca or Zn treatment; that is why a reference filtration rate FR_{app_ref} was used. FR_{app_ref} was measured in the reference media at $17.9 L \cdot g_{dry\ wt}^{-1} \cdot d^{-1}$. The k_u data obtained from the present study was adjusted to Equation 16 by using the statistical XLstat package. Values of K_{ZnBL} , K_{CaBL} and $\frac{k_{u_{max}}}{FR_{app_ref}}$ were simultaneously determined by non-linear regression of α' against Zn and Ca

concentration using the least-squares method ($r^2 = 0.67$, $n=8$). Adjusted curves are presented on Figure 4. The results yield binding affinity constants of $\log K_{ZnBL} = 7.4 M^{-1}$ and $\log K_{CaBL} = 3.5 M^{-1}$. These binding affinity constants indicate that increasing calcium concentrations in the exposure media result in a decrease in the bioaccumulation of Cd, but to a lesser degree than with Zn. The $\log K_{CaBL}$ value is comparable to the value based on cadmium accumulation datasets reported by Niyogi et al. [37] for rainbow trout (namely 3.9), but well under the value for fathead minnow (5) [38]. For zinc, the value (7.4) is close to the one reported by Vercauteren and Blust [39] for the mussel *Mytilus edulis* ($\log K_{ZnBL}$ value of 7.15).

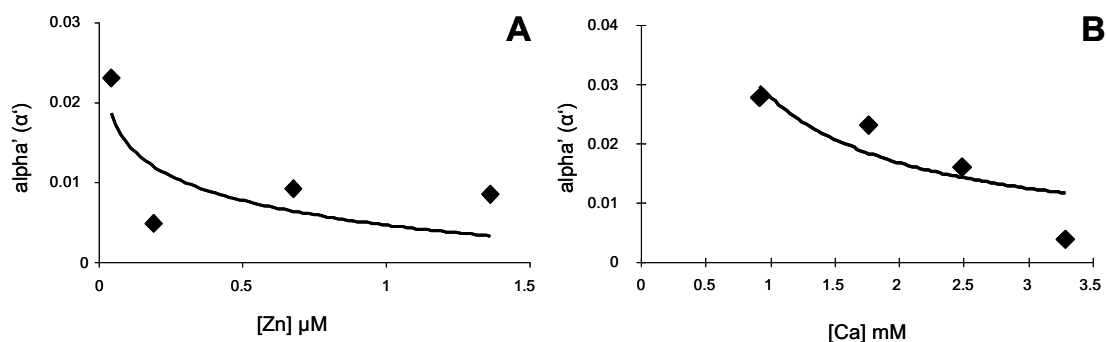


Figure 4: Relationship between the absorption efficiency α' (%) and the concentration of zinc (A) and calcium (B).

Most studies developed biological models like the BLM from toxicity tests at equilibrium, and usually exposed only a part of the organisms (gills) to high metal concentrations. By contrast, in the present study, whole mussels were exposed to realistic environmental metal concentrations with a dynamic parameter as the endpoint. We managed to express the uptake rate constant as a function of certain water chemistry parameters and therefore to assess the usefulness of the biotic ligand approach to predict bioaccumulation. The predicted k_u is given by the following equation:

$$k_u = FR_{app} \cdot \left(\frac{0.134}{1 + 10^{3.5} \cdot [Ca] + 10^{7.4} \cdot [Zn]} \right) \quad (17)$$

where k_u and FR_{app} are in $L \cdot g_{dry\ wt}^{-1} \cdot d^{-1}$ and ion concentrations in $mol \cdot L^{-1}$.

Influence of DOM on Cd bioaccumulation

The effects of DOM on Cd bioaccumulation in *D. polymorpha* observed in the present study are consistent with apparently contradictory results obtained by Voets et al. [10] and Roditi et al. [14]. Voets et al. [10] found that the presence of approximately 55 $mg \cdot L^{-1}$ (i.e. $\sim 23 \text{ mgDOC} \cdot L^{-1}$) of Aldrich humic acid in the medium prevented Cd accumulation whereas Roditi et al. [14] showed that a small amount of DOC (concentrations of DOC derived from algae ranged from 1.96 to 3.28 $mg \cdot L^{-1}$) enhanced metal uptake. The former concluded to a protective effect of DOM whereas the latter concluded to an enhancing effect. The difference is very likely related to DOC concentration, as illustrated by *the bell curve* observed here. The present study highlights the importance of evaluating the effect of a parameter over a large range of concentrations. Niyogi et al. [37] obtained a similar trend studying Cd bioaccumulation in rainbow trout gills with a DOC range from 0 to 38 $mgDOC \cdot L^{-1}$. These results showed a slight (10%) increase in Cd gill accumulation for DOC concentrations from 0 to 5 $mg \cdot L^{-1}$ and a decrease for higher DOC values.

In order to investigate the role of Cd speciation on bioaccumulation, a geochemical speciation software (Visual MINTEQ-Nica Donan Model) was used to determine free cadmium concentrations in each DOC treatment. The concentration of Cd^{2+} dropped from 81 to 1% of the total dissolved Cd concentration as DOC concentrations increased (0.2 to 17.1 $mg \cdot L^{-1}$). Due to the differences in trends of k_u and free Cd concentration, k_u is obviously not directly related to the Cd^{2+} concentration, or at least a modification of the speciation is not sufficient in itself to explain the evolution of k_u . The fact that k_u and filtration rate display similar trends, highlights the major role that FR may play in bioaccumulation mechanisms, especially for bivalves [36] (Eqn. 15). Nevertheless, α' is not constant over the range of DOC concentrations and its variation does not follow the same trend as Cd^{2+} concentrations: α' decreases at low levels of DOC and increases at high concentrations. Hence, when taken separately, none of these mechanisms (Cd complexation by DOM and variation of FR) can explain the observed variations of k_u with DOM. To illustrate these conclusions and attempt to explain variations of k_u by a combination of the FR and Cd speciation, we present on Figure 5 the various measured

and modelled Cd concentrations in tissues after 48hrs of exposure. The simulations were obtained from the integrated form of Equation 0 under the following hypotheses:

First, the bioavailable concentration of Cd is the total water concentration of Cd and k_u is the one estimated in the reference treatment ($0.297 \text{ L}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$). Thus, Cd concentrations in mussel tissue after 2 days of exposure are expressed as:

$$C_{48hrs} = 0.297 \cdot [M] \cdot 2 + C_0$$

Second, the bioavailable concentration of Cd is the total water concentration and k_u is calculated as α' times FR_{app} , FR_{app} being the experimental ones and α' the mean value of α' over the range of DOC tested (0.101). Cd concentrations in mussel tissues are given by the following equation: $C_{48hrs} = 0.101 \cdot FR_{app} \cdot [M] \cdot 2 + C_0$

Third, the bioavailable concentration is the free Cd concentration estimated with the speciation software Visual MINTEQ and k_u is calculated as in the second simulation. Thus, the Cd concentrations in tissues are given by the following equation:

$$C_{48hrs} = 0.101 \cdot FR_{app} \cdot [M^{2+}] \cdot 2 + C_0$$

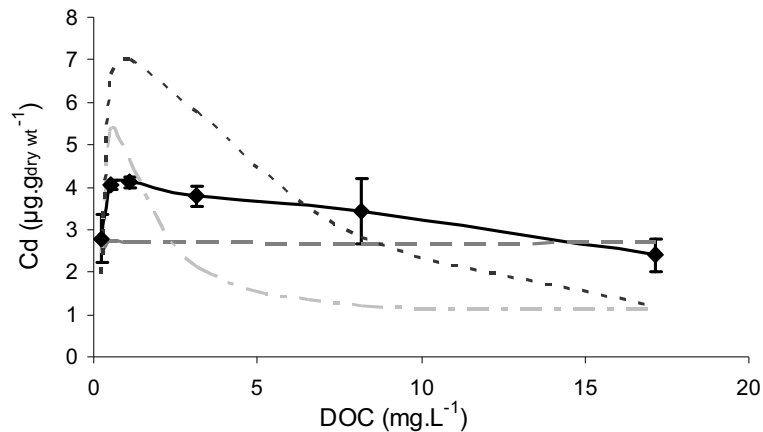


Figure 5: Measured and predicted Cd accumulated in mussel tissue after 48hrs of exposure.
 -◆- measured; ---- modeled with [Cd] total; - - - - modeled with [Cd²⁺] and measured FR (filtration rate); modeled with [Cd] total and measured FR.

The best overall fit between measured and modelled values is obtained when the FR variations are taken into account (the first simulation compared to the second one). Indeed FR accounts for the shoulder of the curve at approximately $1 \text{ mgDOC}\cdot\text{L}^{-1}$. Considering that the fraction of the Cd which is free is included in the bioavailable fraction (which is itself part of the total dissolved Cd) [10, 40], at low DOC concentrations (from 0 to $5.5 \text{ mgDOC}\cdot\text{L}^{-1}$), the amount of accumulated Cd could be explained by both the evolution of FR and the modification of cadmium speciation. Even this well-fitted model seriously under-predicts Cd accumulation in mussel tissues for DOC concentrations higher than $6.4 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$. One hypothesis to explain this phenomenon is the modification of the membrane's permeability in the presence of DOM. Indeed, several studies report the influence on the organism's physiology of DOM adsorption on the biological membrane [41, 42]. Membrane permeability has been shown to increase with the adsorption of humic substances on biological surfaces. The modification of membrane surface charge is supposed to be at the root of this increased permeability [43]. As

suggested by George and Coombs [12], the complexed form of Cd would reach a point of equilibrium with the ligands of the cell membrane more quickly (because of the more negative charge of the membrane), therefore facilitating entry into the cell. Permeability differences may thus explain the poor correlation for the values corresponding to high DOC concentrations. The mechanisms involved here have been identified but not quantified. It is therefore not possible to integrate them into a predictive model. In order to precisely model the action of organic matter, some additional experiments that are beyond the scope of this study would be required. The quality of organic matter should also be assessed. Indeed Aldrich humic acid is poorly representative of natural aquatic DOC.

CONCLUSIONS AND IMPLICATION FOR BIOMONITORING

The bioaccumulation of dissolved Cd by zebra mussels was strongly influenced by water chemistry characteristics such as calcium, zinc and DOC concentrations. The decrease of the Cd uptake rate caused by the increase in Zn and Ca concentrations was well described by a competitive model. Experiments with DOC highlighted the modification of the physiological activity over the range of DOC tested, as observed through the filtration rate measurements. The simulations of Cd body burden performed using this data allowed us to highlight the influence of the filtration rate and of the metal speciation. However, another mechanism (probably the membrane permeability modification) may act on Cd bioaccumulation in highly loaded organic media, although it was not clearly identified in the present study.

In order to predict dissolved metal bioaccumulation in aquatic systems, it is important to consider both water composition and physiologic activity when using toxico-kinetic model. The establishment of a unifying model explicitly integrating water chemistry would greatly improve *in-situ* bioaccumulation modelling. Different Cd bioaccumulation kinetics are to be expected for mussels in sites varying in geochemical backgrounds but also differently prone to zinc contamination. For example, when we estimate a' at two sites on the Orge river (France), Villeconin and Athis-Mons, we obtain 0.015 and 0.013 respectively, considering that the calcium concentrations are 91 and 80 mg.L⁻¹ and the dissolved zinc concentrations 3 and 9 µg.L⁻¹[44]. Thus, assuming a similar physiological activity of zebra mussels at both sites, the only reason why dissolved cadmium is accumulated 13% faster in mussels at Villeconin than at Athis-Mons appears to be this slight difference in water chemistry.

Bivalves accumulate metals from both the water and the particulate pathway [27]. Therefore, in order to obtain a comprehensive model, it is fundamental to complete these data by studying the influence of water chemistry and food characteristics on dietborne uptake.

Acknowledgement - The authors wish to thank S. Vallin and E. Uher for their support in sample analysis. This work is part of the Piren-Seine research program and was financially supported by Office National de l'Eau et des Milieux Aquatiques. A. Bourgeault acknowledges a PhD grant from the Ile-de-France Regional Council (R2DS program).

REFERENCES

1. Playle RC, Dixon DG and Burnison K. 1993. Copper and cadmium binding to fish gills: Modification by dissolved organic carbon and synthetic ligands. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 50: 2667-2677.
2. Ryan AC, Tomasso JR and Klaine SJ. 2009. Influence of pH, hardness, dissolved organic carbon concentration, and dissolved organic matter source on the acute toxicity of copper to *Daphnia magna* in soft waters: Implications for the biotic ligand model. *Environmental Toxicology and Chemistry* 28: 1663-1670.
3. Ferreira D, Ciffroy P, Tusseau-Vuillemin MH, Garnier C and Garnier JM. 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.
4. Tan QG and Wang WX. 2008. The influences of ambient and body calcium on cadmium and zinc accumulation in *Daphnia magna*. *Environmental Toxicology and Chemistry* 27: 1605-1613.
5. Qiu JW, Xie ZC and Wang WX. 2005. Effects of calcium on the uptake and elimination of cadmium and zinc in asiatic clams. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 48: 278-287.
6. Croteau MN and Luoma SN. 2007. Characterizing dissolved Cu and Cd uptake in terms of the biotic ligand and biodynamics using enriched stable isotopes. *Environmental Science and Technology* 41: 3140-3145.
7. Pellet B, Geffard O, Lacour C, Kermaol T, Gourlay-Francé C and Tusseau-Vuillemin M-H. 2009. A model predicting waterborne Cd bioaccumulation in *Gammarus pulex*: the effects of dissolved organic ligands, calcium and temperature. *Environmental Toxicology and Chemistry* 28: 2434-2442.
8. Hemelraad J, Kleinveld HA and De Roos AM. 1987. Cadmium kinetics in freshwater clams. III. Effects of zinc on uptake and distribution of cadmium in *Anodonta cygnea*. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 16: 95-101.
9. Spehar RL, Leonard EN and Defoe DL. 1978. Chronic effects of cadmium and zinc mixture on flagfish, *Jordanella floridae*. *Trans. Am. Fish. Soc.* 107: 354-360.
10. Voets J, Bervoets L and 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.
11. Lores EM, Snyder RA and Pennock JR. 1999. The effect of humic acid on uptake/adsorption of copper by a marine bacterium and two marine ciliates. *Chemosphere* 38: 293-310.
12. George SG and Coombs TL. 1977. The effects of chelating agents on the uptake and accumulation of cadmium by *Mytilus edulis*. *Marine Biology* 39: 261-268.
13. Pempkowiak J, Kozuch J and Southon T. 1994. The influence of structural features of marine humic substances on the accumulation rates of cadmium by a blue mussel *Mytilus edulis*. *Environment International* 20: 391-395.

14. Roditi HA, Fisher NS and Sañudo-Wilhelmy SA. 2000. Uptake of dissolved organic carbon and trace elements by zebra mussels. *Nature* 407: 78-80.
15. Di Toro DM, Allen HE, Bergman HL, Meyer JS, Paquin PR and Santore RC. 2001. Biotic ligand model of the acute toxicity of metals. 1. Technical basis. *Environmental Toxicology and Chemistry* 20: 2383-2396.
16. Luoma SN and Rainbow PS. 2005. Why Is Metal Bioaccumulation So Variable? Biodynamics as a Unifying Concept. *Environmental Science and Technology* 39: 1921-1931.
17. Roditi HA, Fisher NS and Sañudo-Wilhelmy SA. 2000. Field testing a metal bioaccumulation model for zebra mussels. *Environmental Science and Technology* 34: 2817-2825.
18. Baines SB and S.Fisher N. 2008. Modeling the effect of temperature on bioaccumulation of metals by a marine bioindicator organism, *Mytilus edulis*. *Environmental Science and Technology* 42: 3277-3282.
19. Sigg L, Behra P and Stumm W, Chimie des milieux aquatiques. Chimie des eaux naturelles et des interfaces dans l'environnement. 3 ed. 2006, Paris, France: Dunod. 564.
20. Bervoets L, Voets J, Covaci A, Chu S, Qadah D, Smolders R, Schepens P and Blust R. 2005. Use of transplanted zebra mussels (*Dreissena polymorpha*) to assess the bioavailability of microcontaminants in flemish surface waters. *Environmental Science and Technology* 39: 1492-1505.
21. Kraak MHS, Toussaint M, Lavy D and Davids C. 1994. Short-term effects of metals on the filtration rate of the zebra mussel *Dreissena polymorpha*. *Environmental Pollution* 84: 139-143.
22. Meybeck M, De Marsily G and Fustec E, La Seine en son bassin. Fonctionnement écologique d'un système fluvial anthropisé, ed. Elsevier. 1998, Paris: UMR Sisyphe CNRS/université Paris-VI. 749.
23. Admiraal W, Blanck H, Buckert-De Jong M, Guasch H, Ivorra N, Lehmann V, Nyström BAH, Paulsson M and Sabater S. 1999. Short-term toxicity of zinc to microbenthic algae and bacteria in a metal polluted stream. *Water Research* 33: 1989-1996.
24. Smolders R, Bervoets L and Blust R. 2002. Transplanted zebra mussels (*Dreissena polymorpha*) as active biomonitors in an effluent-dominated river. *Environmental Toxicology and Chemistry* 21: 1889-1896.
25. Reeders HH, Bij De Vaate A and Slim FJ. 1989. The filtration rate of *Dreissena polymorpha* (Bivalvia) in three Dutch lakes with reference to biological water quality management. *Freshwater Biology* 22: 133-141.
26. Coughlan J. 1969. The estimation of filtering rate from the clearance of suspensions. *Marine Biology* 2: 356-358.
27. Roditi HA and Fisher NS. 1999. Rates and routes of trace element uptake in zebra mussels. *Limnology and Oceanography* 44: 1730-1749.
28. Amiard JC, Amiard-Triquet C, Berthet B and Metayer C. 1987. Comparative study of the patterns of bioaccumulation of essential (Cu, Zn) and non-essential (Cd, Pb)

- trace metals in various estuarine and coastal organisms. *J. Exp. Mar. Ecol.* 106: 73-89.
29. Rainbow PS. 2002. Trace metal concentrations in aquatic invertebrates: why and so what? *Environmental Pollution* 120: 497-507.
 30. Buchwalter DB and Luoma SN. 2005. Differences in dissolved cadmium and zinc uptake among stream insects: Mechanistic explanations. *Environmental Science and Technology* 39: 498-504.
 31. Marie V, Gonzalez P, Baudrimont M, Bourdineaud JP and Boudou A. 2006. Metallothionein response to cadmium and zinc exposures compared in two freshwater bivalves, *Dreissena polymorpha* and *Corbicula fluminea*. *BioMetals* 19: 399-407.
 32. Markich SJ and Jeffree RA. 1994. Absorption of divalent trace metals as analogues of calcium by Australian freshwater bivalves: An explanation of how water hardness reduces metal toxicity. *Aquatic Toxicology* 29: 257-290.
 33. Campbell PGC, Errécalde O, Fortin C, Hiriart-Baer VP and Vigneault B. 2002. Metal bioavailability to phytoplankton - Applicability of the biotic ligand model. *Comparative Biochemistry and Physiology - C Toxicology and Pharmacology* 133: 189-206.
 34. Campbell PGC, *Interaction between trace metals and aquatic metals and aquatic organisms: A critique of the free-ion activity model.*, in *Metal Speciation and Bioavailability in Aquatic Systems*, A. Tessier and D.R. Turner, Editors. 1995, John Wiley and Sons: Chichester. p. 45-102.
 35. Xue HB, Stumm W and Sigg L. 1988. The binding of heavy metals to algal surfaces. *Water Research* 22: 917-926.
 36. Wang WX, Fisher NS and Luoma SN. 1996. Kinetic determinations of trace element bioaccumulation in the mussel *Mytilus edulis*. *Marine Ecology Progress Series* 140: 91-113.
 37. Niyogi S, Kent R and Wood CM. 2008. Effects of water chemistry variables on gill binding and acute toxicity of cadmium in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): A biotic ligand model (BLM) approach. *Comparative Biochemistry and Physiology - C Toxicology and Pharmacology* 148: 305-314.
 38. Playle RC, Dixon DG and Burnison K. 1993. Copper and cadmium binding to fish gills: Estimates of metal-gill stability constants and modelling of metal accumulation. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 50: 2678-2687.
 39. Vercauteren K and Blust R. 1996. Bioavailability of dissolved zinc to the common mussel *Mytilus edulis* in complexing environments. *Marine Ecology Progress Series* 137: 123-132.
 40. Ferreira D, Tousset N, Ridame C and Tusseau-Vuillemin MH. 2008. More than inorganic copper is bioavailable to aquatic mosses at environmentally relevant concentrations. *Environmental Toxicology and Chemistry* 27: 2108-2116.
 41. Vigneault B, Percot A, Lafleur M and Campbell PGC. 2000. Permeability changes in model and phytoplankton membranes in the presence of aquatic humic substances. *Environ Sci Technol* 34: 3907-3913.

42. Slaveykova VI, Wilkinson KJ, Ceresa A and Pretsch E. 2003. Role of fulvic acid on lead bioaccumulation by *Chlorella kesslerii*. *Environ Sci Technol* 37: 1114-1121.
43. Myers VB, Iverson RL and Harriss RC. 1975. The effect of salinity and dissolved organic matter on surface charge characteristics of some euryhaline phytoplankton. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 17: 59-68.
44. Bourgeault A, Gurlay-Francé C, Vincent-Hubert F, Palais F, Geffard A, Biagianti-Risbourg S, Pain-Devin S and Tusseau-Vuillemin M-H. 2010 (In press). Lessons from a transplantation of zebra mussels into a small urban river: An integrated ecotoxicological assessment *Environmental Toxicology*.

Article 2

Lessons from a transplantation of zebra mussels into a small urban river: an integrated ecotoxicological assessment

Environmental Toxicology

25(5): 468-478

(Received 2 October 2009; Revised 11 January 2010; Accepted 16 February 2010)

Bourgeault A.^{1,2}, Gourlay-Francé C.^{1,2*}, Vincent-Hubert F.^{1,2}, Palais F.³, Geffard A.³,
Biagianti-Risbourg S.³, Pain-Devin S.⁴ and Tusseau-Vuillemin M.-H.^{1,2}

¹ Cemagref, UR HBAN, Parc de Tourvoie - BP 44, F-92163 Antony, France.

² FIRE FR-3020, 4 place Jussieu, F-75005 Paris, France.

³ Université de Reims Champagne Ardenne, EA 2069 URVVC, Laboratoire d'Eco-Toxicologie, Moulin de la Housse, BP 1039, F-51687 Reims Cedex 2, France.

⁴ Laboratoire des Interactions Ecotoxicologie Biodiversité Ecosystèmes (LIEBE), Université Paul Verlaine, Metz - CNRS UMR 7146, Campus Bridoux, Avenue du général Delestraint, F-57070 Metz, France.

Abstract – It is often difficult to evaluate the level of contamination in small urban rivers because pollution is mainly diffuse, with low levels of numerous substances. The use of a coupled approach using both chemical and biological measurements may provide an integrated evaluation of the impact of micro-pollution on the river. Zebra mussels were transplanted along a metal and organic pollution gradient in spring 2008. For two months, mussels and water samples were collected from two sites every two weeks and analysed for metal and PAH content as well as water physico-chemical parameters. Diffusive gradients in thin film (DGT) were also used to assess levels of labile metals. Exposure of mussels to contaminants and potential impact were evaluated using physiological indices and various biomarkers including condition index (CI), defence mechanisms (glutathione-S-transferase: GST), digestive enzymes (amylase and cellulase) and genotoxicity (micronucleus test: MN and comet assay: CA). For most contaminants, the water contamination was significantly higher downstream. Bioaccumulation in zebra mussels was related to water contamination in the framework of the biodynamic model, which allowed us to take into account the biological dilution that was caused by the growth of soft tissue downstream. Thus, metal influxes were on average two times higher downstream than upstream in particular for Zn, Cr, Cu and Cd. Significant differences in condition index were observed (final CI was 0.42 ± 0.03 downstream and 0.31 ± 0.03 upstream) reflecting a better food availability downstream. Moreover a significant decrease of GST activity and digestive enzymes activity in the crystalline style was observed downstream. Interpreting this decrease requires considering not only micro-pollution but also the trophic status related to the water's physico-chemistry. The MN test and the CA on gill cells highlighted genotoxicity in mussels transplanted downstream compared to upstream.

Keywords: active biomonitoring, zebra mussel, biomarker, multidisciplinary study

INTRODUCTION

Small urban rivers collect runoff waters that are contaminated with numerous substances reflecting domestic wastes, atmospheric deposits from industrial activities, fuel combustion, transportation, etc...(Thévenot et al., 2007). This results in a mixture of persistent or emergent organic contaminants and trace metals embedded in a usually organic-rich matrix, which is sustained by diffuse and point-source nutrient and organic inputs. Few studies have described the impact of these types of discharges. The biological impact of this kind of contamination is hardly ever evaluated, the most drastic alterations being often caused by the loss of habitats (Rogers et al., 2002). A variety of biomarkers have been proposed (Vasseur and Cossu-Leguille, 2003), that can be measured in organisms as indicators of an early response to chemical contamination. However, numerous other biotic and abiotic factors also modulate these responses and sometimes mask the real link with chemical contamination.

One challenge for ecotoxicologists is to identify the biological response which can actually be attributed to chemical contamination (Depledge, 2009). A way to overcome this difficulty may be to associate several complementary biomarkers that would be more or less specific to different types of substances and occurring at different levels of biological organization.

Caging experiments provide an interesting insight into the potential ecotoxicological impact of such multiple urban contaminations. The comparative advantage of this bioactive monitoring over the sampling of native organisms is that it limits biological variability, since the organisms are collected from the same population. Moreover, this technique can be used to compare sites even if they are devoid of native organisms. Organisms like zebra mussels are known to be useful bioindicators of fresh water quality and are widely used as such (Bervoets et al., 2005; Binelli et al., 2006; Marvin et al., 2000; Minier et al., 2006; Roditi et al., 2000). Indeed, this bivalve concentrates contaminants through its filtration activity and integrates the pollutants' fluctuations.

In order to better assess the biological impact of the multi-contamination of a small urban river, transplanted zebra mussels were exposed for 2 months in the Orge river (France). Water contamination and bioaccumulation in mussel tissues (metals and PAHs) were determined and different biomarkers were chosen in order to take into account both general physiological responses (condition index, digestive enzymes) and more specific ones (GST, genotoxicity tests). Digestive enzymes are of special interest because of their relative sensitivity to chemical contaminants, especially in invertebrates (Dedourge-Geffard et al., 2009; Milam and Farris, 1998), and are a key component in the energy supply necessary for the maintenance, growth and reproduction of organisms. Lagadic et al. (1994) described digestive carbohydrases of invertebrates as potent biomarkers of pollution. The Glutathione-S-transferase (GST) is a family of detoxifying enzymes involved in the Phase II conjugation of foreign compounds. It is directly involved in organisms' defence against micro-pollutants and is widely used as biomarker in environmental studies. Among cytogenetic techniques, the alkaline comet assay enables the detection of various types of reversible DNA damage in non-dividing cells, whereas the micronucleus test is used for the detection of irreversible chromosome damage induced by chemical or physical agents. These complementary genotoxicity tests have already been applied to zebra mussels for environmental monitoring (Binelli et al., 2007; Klobucar et al., 2003).

MATERIALS AND METHODS

Study area and mussels collection

Zebra mussels were collected in the Meuse-Marne canal (France) in March 2008. Mussels were manually removed from rocks using a scalpel, selected by length (20-22mm) and quickly brought back to the laboratory. They were pooled into 16 cages that each contained 20 organisms and were placed in water from the canal site until deployment the following day.

The organisms were transplanted within the cages to two sites in the Orge river basin (France): one at the outlet of the basin (Athis-Mons, downstream site) and the other in its upper part (Villeconin, upstream site). This 936 km² basin is part of the Seine river basin and is highly urbanised in its downstream part, whereas the upstream part remains rather rural (Billen et al., 2007). Co-workers from the Piren Seine research program (Teil et al., 2009) recently reported a multiple contamination (PAHs, PBDE, alkylphenols and phthalates) in the Athis-Mons area, and attributed it to urban runoff.

The condition index (CI) and chemical body burden (metal and PAHs) of mussels were determined on both sites after 0, 15, 29, 42 and 58 days of exposure on 20 mussels (same cage), whereas genotoxicity and biochemical tests were performed three times on 40 mussels after 0, 29 and 58 days of exposure. Mussels were brought back to the laboratory within a few hours and immediately dissected.

Water chemical analyses

Samples collection

Water was collected on both sites at days 0, 15, 29, 42 and 58 and distributed into 1L pre-combusted glass bottles for the determination of dissolved and particulate organic carbon (DOC and POC), chlorophyll, pheopigment, total suspended solid (TSS) and major ions (Na⁺, K⁺, Mg²⁺, Ca²⁺, Cl⁻, NO₂⁻, NO₃⁻, SO₄²⁻, HCO₃⁻), and into 50 mL polypropylene tubes for metal analysis. 20 mL of raw water were filtered on site through a 0.45 µm PES syringe filter for dissolved metal analysis. Filtrates and raw water samples were then acidified with 1% (v/v) HNO₃ Suprapur (Merck) before being processed. Samples were brought back to the laboratory in cooled containers. Conductivity and pH were regularly measured and the temperature was continuously monitored.

Diffusive gradient in thin films (DGT) were simultaneously deployed on both sites in order to assess labile metal contamination (Davison and Zhang, 1994). Restricted diffusive gels, 0.8mm-thick (DGT research, Landcaster, UK) were used, covered with a 0.45 µm PES filter and a 0.4 µm PC filter as described by Tusseau-Vuillemin *et al.* (2007). Six DGTs were deployed at each site on day 0. Three DGTs were retrieved on day 15 while the other three DGTs were retrieved on day 29. The same deployment and retrieval procedure was reproduced with six other DGTs from day 29 to day 58.

Chemical analyses

Ion concentrations in raw water were measured by chromatography (Dionex DX-120), except hydrogenocarbonate concentration, which was measured by a colorimetric method (NF EN ISO 9963-1). Raw water samples were filtered using pre-combusted weighed GF/F filters in order to assess the TSS concentration. The obtained filtrate was analysed with a TOC-analyzer (Bioritech 1010) to determine the DOC concentration. Chlorophyll *a* and pheopigment concentrations were determined colorimetrically after filtration through a 0.8 µm cellulose ester filter and extraction in acetone.

Total, dissolved and labile concentrations of Cd, Co, Cr, Cu, Mn, Ni and Zn were measured. Raw water samples were mineralized using DigiPREP for the analysis of total metal concentration. The samples' volume was reduced to 1-2 mL through evaporation (8h, consign temperature 100°C), after which 2mL HNO₃ (65% suprapur, Merck) and 8 mL HCl (30% suprapur, Merck) were added (2h, consign temperature 85°C). The samples were then heated to reach a volume of 500µL. 500µL HNO₃ were added to this extract and concentrated to obtain a final volume of 500µL (so as to remove chloride and minimize interference). After cooling, 1 mL HNO₃ was added and the extract was filled out to 50 mL with Milli-Q water. Dissolved metals were directly analysed in acidified filtered water samples.

After retrieval of DGT, the resins were eluted in 1 mL 1M nitric acid, in which the analysis was directly performed. The integrated labile concentrations and the associated standard deviations were calculated using the method described by Tusseau-Vuillemin *et al.* (2007) in order to take into account both the temporal variations and the sampling variability.

Internal standards (¹⁰³Rh, ¹¹⁵In and ¹⁸⁵Re) were added to samples prior to metal analysis with an Inductively Coupled Plasma-Mass Spectrophotometer (ICP-MS ThermoFisher Scientific). The accuracy and the precision of the measuring device were regularly controlled with certified reference natural water samples (NIST 1640).

Biochemical measurement

Condition index

The soft body parts of 5 mussels were removed from the shells and the byssus were taken off. Tissues were then frozen at -80 °C and lyophilized. Soft tissues (both fresh and dried) and shells were weighed. The average growth rate g (in d^{-1}) was calculated as the slope of the five average tissue dry weights versus time, normalized to the initial average tissue dry weight. The condition index was calculated as the ratio between the wet weight of soft tissues and the total weight of the mussel (including the shell).

Metal body burden

Metal body burden was measured on 5 replicates each consisting of dry soft tissue from one mussel placed in a preweighed polypropylene tube and digested in acid. Dried tissues were individually digested at room temperature with HNO₃ (65% supra pur Merck) and H₂O₂ (30% supra pur Merck) following Pellet *et al.* (2009). Briefly, 50µL/mg_{dw} of HNO₃ were added on day 1 and 20µL/mg_{dw} H₂O₂ on day 2. Digests were then filled out with milliQ-water (430 µL/mg_{dw}) on day 7. A reference material (Mussel Tissue ERM-CE 278) was used to validate the digestion method. Samples were analysed by Inductively Coupled Plasma-Atomic Emission Spectrometer (ICP-AES) (Varian Vista MPX). The device was recalibrated every 20 samples and a reference water (SPS WW1) was used. Metal concentration in tissue was expressed in µg of metal per g of dry weight tissue ($\mu g \cdot g_{dw}^{-1}$).

PAHs body burden

PAHs analyses were performed on 15 freeze-dried mussels that had been pooled and reduced to a powder. PAH standards were obtained from Dr. Ehrenstorfer Laboratories,

suprapur acetone and dichloromethane from Merck and heptane (picograde) from Promochem. The PAHs were microwave-extracted (Mars Xpress, CEM) with 20 mL acetone/heptane (v/v) (50/50) spiked with deuterated PAHs as internal standards. Following the microwave extraction, the sample was filtered through a 0.7µm glass fibre filter (GF/F Whatmann). The filtrate was then evaporated down to a final volume of 500 µL. The extract was purified using a silica gel column and eluted with 10 mL heptane/dichloromethane (v/v) (80/20). The volume was finally reduced to 100µL by a gentle nitrogen gas stream. The extract was analysed by gas chromatography-mass spectrometry (Thermo Trace GC Ultra-DSQII) in the selected ion-monitoring mode for the 16 PAHs listed as priority contaminants by the World Health Organisation. Results were expressed in µg of PAH per g of dry weight tissue ($\mu\text{g}\cdot\text{g}_{\text{dw}}^{-1}$). This extraction and analysis protocol was validated using a certified reference material Mussel Homogenate (IAEA-432). Since naphthalene and acenaphthylene had a low recovery rate, they were discarded from the results.

Digestive enzymes

Dissected crystalline styles (CSs) and digestive glands (DGs) were pooled (respectively into groups of 10 and into groups of 2) to constitute 4 pools of CS and 5 pools of DG. Each pool was ground by hand in a glass mortar-and-pestle and homogenized in ice-old phosphate buffer (0.01 M, pH 6.5). After centrifugation at 4°C and 15000 g for 30 minutes, the supernatants were collected and stored at -80°C until digestive amylase and carboxymethylcellulase (cellulase) activities were assayed.

Amylolytic and cellulolytic activities were measured in CS and DG extracts with the 3,5-dinitrosalicylic (DNS) acid method (Bernfeld, 1955) described in Palais *et al.* (Accepted). Briefly, amylolytic activities were assayed at pH 7.2 and 25°C in 1% soluble starch (0.2 M phosphate buffer, 6 mM NaCl), while cellulolytic activities were assayed at pH 5.2 and 50°C in 2% carboxymethylcellulose (0.2 M acetate buffer, 6 mM NaCl). Maltose was used as reference sugar for the calculation of enzyme activities. Specific activities of amylase and cellulase were expressed in µg of maltose released per minute and per mg of protein ($\mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$). The soluble protein content in the digestive extracts was determined thanks to the method described by Bradford (1976) using bovine serum albumin (0.25 to 1 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) as a standard. Data relative to the CS extracts' enzyme activities at day 0 is unfortunately not available.

GST

The DGs of 7 to 12 mussels were dissected and homogenised in a Tris buffer (Tris 10mM, pH 7.5, 0.1mM phenylmethylsulfonyl fluoride [PMSF], 1mM dithiothréitol [DTT]) in a 1/10 w/v ratio, using a glass mortar-and-pestle. The homogenates were then centrifuged for 10 min at 10000 g. All procedures were carried out at 4°C. The supernatants were frozen at - 80°C until the determination of total protein concentrations and Glutathion-S-Transferase (GST) activities. GST activities were measured by spectrophotometry at 340 nm, after conjugation of the acceptor substrate 1-chloro-2,4-dinitrobenzene (CDNB, 1mM) with reduced glutathione (GSH, 1mM) in a 0.1M pH 6.5 phosphate buffer according

to Habig *et al.* (1974). Activities were expressed as nanomols of conjugate produced per min and per milligram of proteins ($\text{nmol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg proteins}^{-1}$). Protein concentrations were determined as outlined above for digestive enzymes.

DNA damage and micronucleus

Haemolymph was gently aspirated from the mussels' posterior adductor muscle with a hypodermic syringe (Bolognesi *et al.*, 1999). The final cell concentration was about 10^7 cells. mL^{-1} . Gills were removed and cells isolated by enzymatic digestion with dispase ($0.8 \text{ U}\cdot\text{mL}^{-1}$, Roche) in PBS (phosphate buffered saline). The cellular suspension was kept on ice. The procedure took place under reduced light to prevent UV-induced DNA damage. Cell viability was assessed using the Trypan blue dye exclusion test. The comet assay was performed only on cell populations that displayed a viability of 90% or more. The alkaline comet assay was performed as described by Vincent-Hubert *et al.* (2008) according to the method developed by Singh *et al.* (1988). Positive controls consisted of $200 \mu\text{M H}_2\text{O}_2$ *in vitro* treated cells to check the effectiveness of electrophoresis conditions. The percentage of DNA in the tail was recorded as the most informative DNA damage parameter. Observations were made on a fluorescence microscope. 100 randomly chosen nuclei per mussel were examined, using an image analysis system (Komet 5.5, Andor Technology). 10 mussels per site were analyzed independently.

The micronucleus (MN) test was basically performed according to Bolognesi *et al.* (1999) and modified as follows: gill and haemolymph cells fixed in Carnoy's solution were stained with DAPI ($1 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$). One thousand cells per mussel, with preserved cytoplasm, were identified on a fluorescence microscope using the criteria proposed by Kirsch-Volders *et al.* (2000) to calculate the frequency of MN (MN/1000). As regards gill cells, 10 mussels were analyzed independently, while in the case of haemocytes, haemolymph cells from 5 mussels were pooled together.

The results were expressed as induction factors calculated by normalizing the percentage of tail DNA and the frequency of MN to their value at day 0.

Statistical analysis

The Shapiro-Wilk test was used to verify the normality of the variance of the comet, MN and GST data. Significant differences were evaluated using the z-test (metal water contamination and body burden), the Student's t-test (GST, digestive enzymes and MN) or the non-parametric Wilcoxon test (comet data).

RESULTS

Chemical responses

General characterization

The parameters that characterise the trophic status of the river (namely TSS, DOC, POC and chlorophyll) were significantly higher downstream than upstream (details in the Supporting Information, Figure S1). For example, chlorophyll concentrations were four times higher, indicating an organic enrichment attributable to urban pressure (Billen *et*

al., 2007; Tusseau-Vuillemin, 2001). The temperature increased by about 10°C at both sites during the 2-month exposure, the temperatures being 18°C and 14°C (up- and downstream respectively) at the end of the experiment.

Table 1: Total, dissolved and labile metal concentrations (in $\mu\text{g.L}^{-1}$) at both sites: upstream and downstream. Values are presented as mean during exposure \pm SD, $n=5$ for total and dissolved concentration. The labile metal concentration was determined by the means of a set of 9 DGTs. The standard deviation was estimated from the linear regression of labile metal accumulated in Chelex resins over time. Limit of quantification (LQ) of dissolved Cd is $0.01 \mu\text{g.L}^{-1}$.

	Upstream			Downstream		
	Total	Dissolved	Labile	Total	Dissolved	Labile
Zn	8.07 \pm 5.94	3.03 \pm 2.96	0.88 \pm 0.10	26.41 \pm 9.15	9.31 \pm 2.81	2.82 \pm 0.20
Cr	0.31 \pm 0.14	0.22 \pm 0.09	0.04 \pm 0.01	1.95 \pm 0.49	0.32 \pm 0.07	0.09 \pm 0.02
Co	0.38 \pm 0.02	0.21 \pm 0.02	0.05 \pm 0.00	0.77 \pm 0.10	0.32 \pm 0.05	0.06 \pm 0.00
Mn	73.43 \pm 10.28	75.27 \pm 19.45	26.36 \pm 2.66	72.41 \pm 15.08	42.25 \pm 5.27	12.47 \pm 0.88
Cu	1.82 \pm 0.26	0.22 \pm 0.04	0.06 \pm 0.01	6.79 \pm 1.73	1.85 \pm 0.31	0.42 \pm 0.05
Cd	0.015 \pm 0.005	<LQ	0.001 \pm 0.000	0.066 \pm 0.027	0.010 \pm 0.003	0.002 \pm 0.000
Ni	2.76 \pm 0.13	1.25 \pm 0.06	0.17 \pm 0.02	4.45 \pm 0.80	1.95 \pm 0.51	0.46 \pm 0.04

Metals in water

Time-averaged concentrations of total and dissolved metal and time-integrated labile metal concentrations are reported in Table 1, standard deviation accounting for temporal variability. Downstream concentrations were generally significantly higher than upstream ones, reflecting the urban pressure on the river. Only dissolved Cd could not be quantified upstream (LQ=10 ng.L⁻¹). However, the use of DGT over two weeks allowed us to quantify labile Cd at this site (1.1 ng.L⁻¹) since the labile Cd LQ was 0.75 ng.L⁻¹ with the actual deployment conditions. In most cases, labile metal accounted only for 14 to 35 % of total dissolved metal, which might be a consequence of the presence of organic ligands, whatever their origin (rural or urban runoff, or autochthonous primary production).

Metals and PAHs in organisms

Average reference ($n=5$) and transplanted ($n=20$, at both sites) mussel metal body burdens are represented in Figure 1A. No significant difference could be pointed out between those average values, the standard deviations being rather high. Let us notice that it reflects inter-organism variability and not a simple analytical variability (see Table 2 for the detailed metal body burden over time). PAH concentrations measured in mussel tissues are presented in Table 2. Levels of PAHs in mussel tissues collected at the reference site were low (the sum of the 14 PAH concentrations was 1197 ng.g_{dw}⁻¹) and increased in transplanted mussels at both sites. Most PAH concentrations were significantly higher downstream than upstream. The average value of the sum of the 14 PAH concentrations was significantly different from one site to the other (1322 \pm 160 and 1728 \pm 189 ng.g_{dw}⁻¹ in mussel tissues from the upstream and downstream sites respectively).

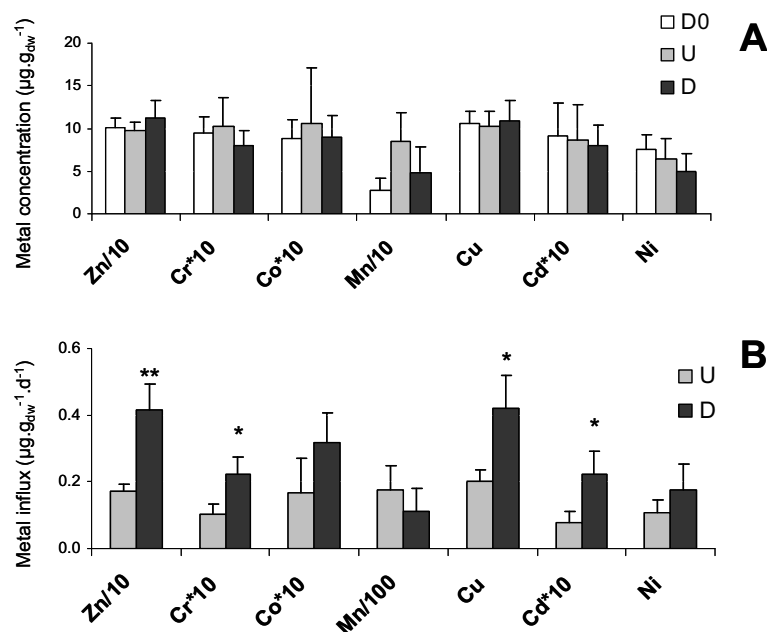


Figure 1: A: Metal concentration in mussels (in $\mu\text{g.g}$ dry weight $^{-1}$) at both sites: upstream (U) and downstream (D). Average values during exposure and standard deviation ($n=20$). D0 is the metal body burden of the mussels at the beginning of the transplantation. No significant evolution was observed during the exposure at U and D. B: metal influx in mussels (in $\mu\text{g.gdw}^{-1}.\text{d}^{-1}$). Average values and standard deviation ($n=20$). Significantly different values between the two sites are indicated with asterisks (z-test, $p < 0.05^*$, $p < 0.01^{**}$).

Physiological status

Survival and growth of the mussels

Almost all mussels were alive after the 2-month exposure (mortality rate: less than 1%). The dry weight of mussel tissue remained constant at the upstream site (growth rate: $-0.001 \pm 0.001 \text{ d}^{-1}$, $n=5$) while it increased steadily at the downstream site (Table 2) (growth rate: $0.017 \text{ d}^{-1} \pm 0.001$). Similarly, the mussel condition index increased significantly downstream whereas it decreased slightly upstream (final CI 0.42 ± 0.03 and 0.31 ± 0.03 respectively). This difference reflects an improvement of the physiological status, which can probably be attributed to a higher quality or quantity of food.

Digestive enzymes

Amylolytic and cellulolytic activities measured in the CS displayed similar patterns of response (Figure 2), both activities being always 20 to 30% lower downstream than upstream. Besides, the data showed no effect of the length of exposure on CS enzyme activities. Regarding DG, amylolytic and cellulolytic activities showed different patterns of response (Table 2). After 29 days of transplantation, amylase activity decreased markedly at both sites compared to the initial one (-49.7% and -35.2% , respectively). After 58 days of transplantation, amylase activity measured upstream returned to the initial value, while the one measured downstream remained significantly low (-44.2% ,

compared to day 0). By contrast, cellulolytic activities in the DG displayed only slight variations during the whole period of exposure.

Exposure biomarkers

GST

The activity of GST was about 1100 nmol.min⁻¹.mg proteins⁻¹ in digestive glands of control zebra mussels. The exposure at the upstream site did not affect GST activity whereas it caused a progressive and marked reduction at the downstream site (Figure 2).

DNA damage and micronucleus

After 58 days of transplantation, a significant increase of DNA strand breaks was observed at both sites and for both cell types, while no significant variation was noticed after 29 days (Figure 2, Table 2). A site variation was observed only in gill cells while no significant variation was noticed in haemocytes. The induction of DNA damage was higher in gill cells (from 1.1 to 2.8) than in haemocytes (from 0.72 to 2.1), indicating that gills are more sensitive to genotoxines.

Before transplantation, the frequency of MN, considered as the basal level, was higher in haemocytes (4‰) than in gill cells (2.6‰). After 29 and 58 days of transplantation, the MN frequency was increased in haemocytes at both sites and in gill cells at the downstream site only. Both DNA and chromosomal damage in mussel gill cells was significantly higher downstream than upstream after 58 days of transplantation.

Table 2: Evolution of biological responses at both sites during the exposure. Values are mean \pm standard deviation except for genotoxicity responses which are expressed as mean \pm standard error.

		Upstream					Downstream			
		0	15	29	42	58	15	29	42	58
Dry weight of mussel tissue (mg)		40.1 \pm 14.4	38.7 \pm 17.5	37.0 \pm 13.0	40.0 \pm 16.6	35.1 \pm 12.3	45.0 \pm 14.7	57.7 \pm 18.7	71.7 \pm 23.5	78.3 \pm 26.0
Condition Index		0.36 \pm 0.03	0.29 \pm 0.04	0.33 \pm 0.02	0.32 \pm 0.05	0.31 \pm 0.03	0.37 \pm 0.03	0.37 \pm 0.03	0.41 \pm 0.03	0.42 \pm 0.03
Metal concentration in mussel tissue ($\mu\text{g}\cdot\text{g}_{\text{dw}}^{-1}$)	Cr	1.0 \pm 0.2	1.1 \pm 0.4	1.2 \pm 0.4	0.8 \pm 0.2	1.1 \pm 0.3	0.8 \pm 0.1	0.8 \pm 0.2	0.9 \pm 0.1	0.7 \pm 0.1
	Mn	27.9 \pm 13.1	72.3 \pm 37.1	116.6 \pm 37.8	87.5 \pm 24.2	63.2 \pm 10.1	40.1 \pm 19.8	53.6 \pm 24.6	72.3 \pm 43.1	27.9 \pm 6.2
	Co	0.9 \pm 0.2	1.0 \pm 0.5	1.3 \pm 0.3	0.9 \pm 0.1	1.0 \pm 0.3	0.9 \pm 0.4	1.0 \pm 0.3	0.8 \pm 0.1	0.8 \pm 0.3
	Ni	7.5 \pm 1.8	5.7 \pm 1.6	8.4 \pm 2.6	4.6 \pm 0.8	6.6 \pm 1.5	6.5 \pm 1.9	5.0 \pm 1.1	5.6 \pm 2.2	2.6 \pm 0.6
	Cu	10.6 \pm 1.4	9.9 \pm 1.0	10.8 \pm 1.9	9.7 \pm 1.1	10.8 \pm 2.0	12.2 \pm 1.9	12.5 \pm 2.7	10.1 \pm 2.0	8.5 \pm 1.4
	Zn	100.8 \pm 11.3	96.0 \pm 8.0	102.9 \pm 7.9	89.8 \pm 6.2	101.1 \pm 15.9	125.3 \pm 9.9	113.8 \pm 10.8	123.2 \pm 22.1	84.8 \pm 11.9
	Cd	0.9 \pm 0.4	1.0 \pm 0.4	1.0 \pm 0.3	0.6 \pm 0.1	0.8 \pm 0.3	1.0 \pm 0.3	0.8 \pm 0.1	0.7 \pm 0.3	0.6 \pm 0.1
PAH concentration in mussel tissue ($\mu\text{g}\cdot\text{g}_{\text{dw}}^{-1}$)	Anthracene	32	34	36	43		48	39	34	27
	Pyrene	95	95	73	132		417	303	257	249
	Chrysene	38	43	37	27		175	149	123	142
	Benzo(a)pyrene	18	21	30	82		64	35	35	40
	Benzo(ghi)perylene	18	17	29	82		57	29	26	23
	Σ 14 PAH	1197	1165	1122	1679		2336	1694	1497	1387
GST ($\text{nmol}\cdot\text{mg}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$)		1144 \pm 315		987 \pm 413		1163 \pm 361		820 \pm 287		507 \pm 213
Digestive enzymes ($\mu\text{g}\cdot\text{mg}^{-1}\cdot\text{min}^{-1}$)	Digestive gland	Amylase	39.7 \pm 8.3		20.0 \pm 3.0	32.6 \pm 13.5		25.7 \pm 5.3		22.1 \pm 8.1
		Cellulase	11.0 \pm 1.4		11.5 \pm 0.6	10.8 \pm 0.3		11.5 \pm 1.0		9.4 \pm 0.6
	Crystalline style	Amylase			372.4 \pm 6.5	429.9 \pm 24.6		291.0 \pm 45.6		300.6 \pm 43.0
		Cellulase			124.2 \pm 8.3	106.6 \pm 17.9		86.4 \pm 6.2		80.4 \pm 12.3
Genotoxicity	Haemocytes	Tail DNA (%)	13.52 \pm 1.04		9.86 \pm 0.87	22.85 \pm 1.11		12.35 \pm 1.11		20.51 \pm 1.12
		Micronuclei (‰)	4.0		6.5 \pm 0.1	7.3 \pm 0.3		8.5 \pm 0.2		5.9 \pm 0.5
	Gill cells	Tail DNA (%)	10.0 \pm 0.6		11.4 \pm 0.4	16.5 \pm 0.5		13.2 \pm 0.4		25.5 \pm 0.6
		Micronuclei (‰)	2.5		2.6 \pm 0.6	3.8 \pm 0.5		5.9 \pm 0.5		6.9 \pm 0.5

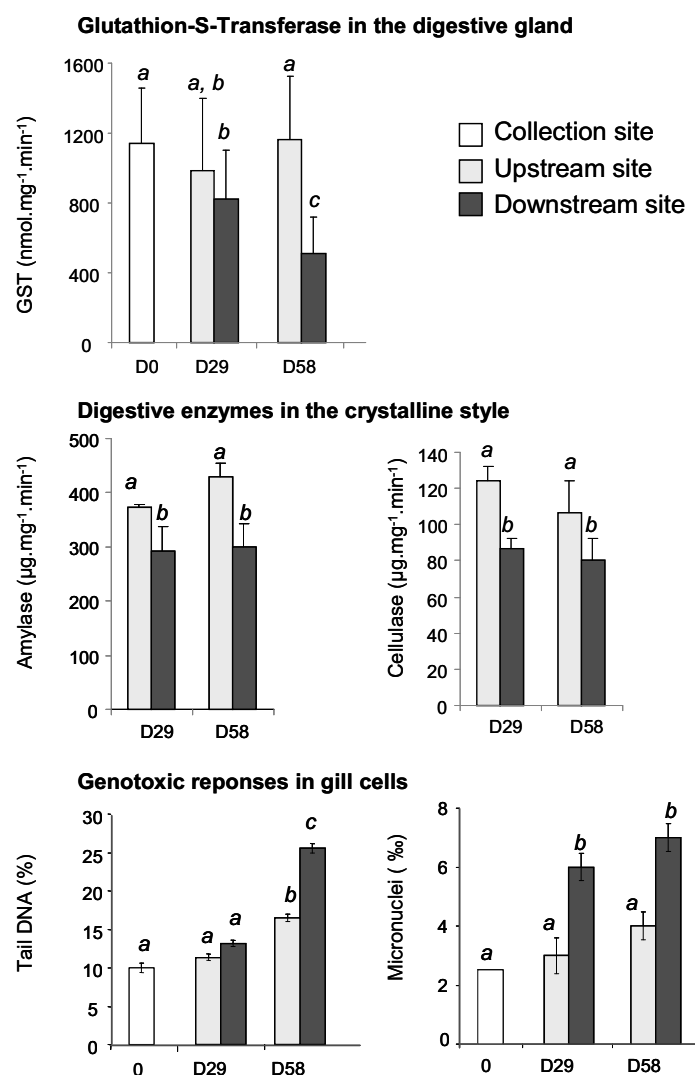


Figure 2: Biological responses measured in mussels before (D0) and after 29 days (D29) and 58 days (D58) at both sites. Different letters upon bars indicate that significant differences were observed (GST: mean \pm SD, T-test, $p < 0.05$; digestive enzymes: mean \pm SD, T-test, $p < 0.05$; DNA damage: mean Tail DNA (%) \pm SE, Wilcoxon test, $p < 0.05$; Micronuclei: mean value \pm SE, T-test $p < 0.05$).

DISCUSSION

The purpose of the study was to monitor various chemical and biological responses so as to remove the confounding factors that hinder the interpretation of the consequences of urban multi-contamination on mussels. We will now discuss two major characteristics of the upstream-downstream gradient we have studied: the trophic status (availability of food) and the micro-contamination.

The trophic gradient: a confounding factor?

The metal body burdens data is in apparent contradiction with the water metal concentrations, which indicate a significant downstream contamination. However,

downstream mussels grew significantly – or at least increased their dry tissue weight – during the exposure (Table 2). The resulting biodilution is likely to mask an increased contamination caused by the chemical exposure. Analysing metal influxes rather than metal concentrations in organisms could help unraveling this link between water and mussels contamination. Under the reasonable hypothesis that mussels are at steady state after two months of exposure in the river (Bervoets et al., 2005), we might infer that any influx of metal is balanced by a corresponding efflux, related to either excretion or biodilution (growth). Following Luoma and Rainbow's (2005) biodynamic model, we may write:

$$I = (k_e + g) \cdot C_m$$

where I is the influx of metal ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$), from the environment towards the mussel, whatever its origin (usually water and dietborne uptakes), C_m is the metal concentration in the mussel ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$), k_e is the excretion rate constant (d^{-1}) and g the growth rate of the animal (d^{-1}).

k_e values from literature (SI, Table S2) and the measured g and C_m were used to calculate metal influxes in transplanted mussels (Figure 1B). Indeed, Figure 1B shows that metal influxes were higher downstream than upstream (except for Mn), the difference being significant for Cr, Cu, Zn and Cd. The mussels accumulated more metals in the most contaminated site, and the bioaccumulation was counterbalanced by the biological dilution caused by soft tissue growth.

The same approach was applied to benzo[*a*]pyrene (BaP), for which a k_e value of 0.18 d^{-1} was available (Fisher et al., 1993), but not to other PAHs since k_e values were not available in the literature. The BaP concentrations in mussel tissues were $44 \pm 33 \text{ ng}\cdot\text{g}_{\text{dw}}^{-1}$ and $43 \pm 14 \text{ ng}\cdot\text{g}_{\text{dw}}^{-1}$, corresponding to $8 \pm 6 \text{ ng}\cdot\text{g}_{\text{dw}}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ and $9 \pm 3 \text{ ng}\cdot\text{g}_{\text{dw}}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ influxes respectively upstream and downstream. In this case, body burdens and influxes were similar at both sites, notably because the value of the excretion constant (k_e) is much higher than those of the growth rate constants. Hence, even at steady state, BaP body burdens cannot reflect the water contamination.

The differences we observed in enzyme activities may also be related to disparities in food availability and food quantity/quality between the two sites, the digestive system of bivalves showing a great adaptability to variations in their food regime (Fernandez-Reiriz et al., 2004; Huvet et al., 2003; Ibarrola et al., 1999; Johnson et al., 1996). It is also interesting to note that CS amylase and cellulase activities were negatively correlated to chlorophyll levels at both sites. Johnson *et al.* (1996) explain that such a negative correlation between chlorophyll level and amylase activity is possible as long as the nutritional requirements of organisms are met. The higher CS enzyme activities we measured at the upstream site may thus have resulted from a greater investment of the mussels in enzyme production so that their energy requirements could be met despite lower food levels.

Toxic gradient: a real footprint?

The lower levels of CS enzyme activities we measured downstream may also be related to the higher levels of micro-pollutants to which mussels were exposed there. Several authors have reported depletions in enzyme activities within the digestive system of bivalves that were exposed *in vitro* or *in situ* to chemical toxicants, especially heavy metals (Chen et al., 2002; Essedaoui et al., 2001; Milam and Farris, 1998; Mizrahi and Achituv, 1989). Contrary to what we pointed out in the case of CS, no significant difference between both sites could be observed for DG enzymes. Such a contrast between both organs may be attributed to a higher availability of enzymes for interactions with pollutants in extracellular spaces (such as style sac and stomach lumen) than in intracellular ones (in this case the digestive cells of a digestive gland).

The GST activity was expected to reflect the exposure to chemical contaminants present in the environment. Most studies report a raised GST activity in response to environmental or laboratory exposure to contaminants (Antognelli et al., 2006; Camargo and Martinez, 2006; Richardson et al., 2008). On the contrary, in this study, a significant decrease was observed for mussels transplanted to the most contaminated site. Similar results had previously been obtained for various model organisms (Ahmad et al., 2006; Looise et al., 1996). The GST inhibition could be caused by the interference of chemicals with either the active GST sites, the mechanisms of GST gene expression regulation (Frasco and Guilhermino, 2002), or glutathione during conjugation (Osman et al., 2007; Roméo et al., 2006). In our study, more investigation would be necessary to clearly distinguish between these hypotheses. However, the decreased GST activity downstream supports the idea that the defence capabilities of GST are reduced, favouring the occurrence of potentially toxic effects.

Results from the comet assay were in keeping with the MN test, as it is often the case in field studies (Klobucar et al., 2003; Villela et al., 2007). The induction rate of MN in the gills (i.e. from 1.2 to 2.8) is similar to the rate observed in marine or zebra mussels living in contaminated sites (Barsiene et al., 2006; Bolognesi et al., 2004) or exposed to toxic compounds (Mersch et al., 1996). Usually performed on haemocytes, the comet assay was applied to gill cells in this study. This new application in field monitoring shows that the induction of DNA strand breaks and the rate of chromosomal damage are higher in gill cells than in haemocytes. The greater sensitivity of gills to genotoxines may be the result of several processes, namely the exposure level to contaminants and/or the ability to repair DNA. As the main entry point of pollutants from the water, gills are constantly more exposed to dissolved contaminants than haemocytes and are therefore more susceptible to chromosomal damage, as previously observed for freshwater and marine fish (Hayashi et al., 1998; Michel et al., 1995).

After 2 months of transplantation, downstream mussels exhibited a high level of DNA strand breaks in gill cells. This could result from an increasing oxidative stress caused by a constant exposure to dissolved contaminants, rather than a transient chemical stress. This hypothesis, based on the marked decrease of GST activity in the digestive gland, is

also reinforced by a stronger PAH and metal contamination of mussels transplanted to the downstream site. Calculated metal influxes were particularly higher for Cr, Cd, Zn and Cu; these metals are either transition metals (Cu) or metals with an oxidative potential via various mechanisms (Cd, Cr). An increased accumulation of these metals could lead to an overproduction of intracellular reactive oxygen species (ROS), which ultimately induce lipid peroxidation of the cellular membranes and oxidation of DNA (Charissou et al., 2004; Emmanouil et al., 2008; Valavanidis et al., 2006).

Multivariate analysis

The multivariate analysis (principal component analysis) of biological measurements, influx of metals and trophic parameters illustrates the results above (Figure 3). Axis 1 represents an upstream/downstream gradient whereas axis 2 represents a temporal evolution. The metals influxes (Zn, Cr, Co, Cu, Cd and Ni), biological measurements (chromosomal and DNA damage in gills, CI) and trophic parameters (DOC, TSS and chlorophyll) are very close to 1 on axis 1, which shows that these parameters are strongly correlated and associated with the downstream site. On the contrary, higher GST, Mn influx and enzyme activities in CS are associated with the upstream site. The parameters that refer to genotoxicity in haemocytes are closer to axis 2, which illustrates that they are mainly related to a temporal evolution.

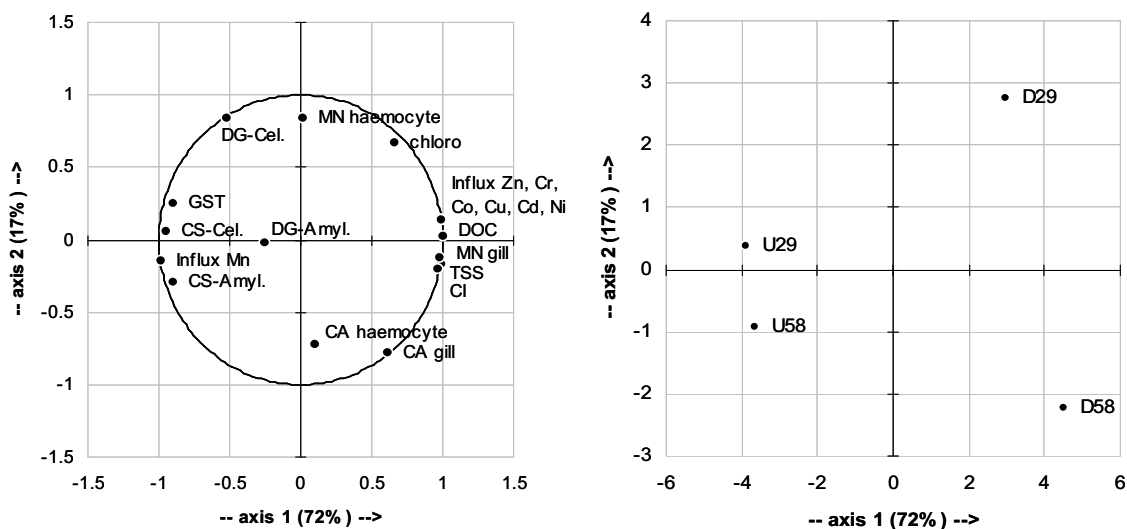


Figure 3: Principal component analysis (PCA) based on biological measurements (Condition Index: CI, GST, cellulase: Cel. and amylase: Amyl. activities, comet assay: CA and micronucleus: MN activities), metal influxes and trophic parameters (TSS, DOC, chlorophyll) at the upstream (U) and downstream (D) sites, on days 29 and 58.

Conclusions

The aim of this study was to determine whether a transplantation experiment conducted in a pluridisciplinary spirit could help characterise the ecotoxicological consequences of the chemical make-up of a small urban river. Our answer is that the interpretation of a battery of biomarkers is not straightforward, due to a number of confounding factors that

are probably very common to these types of multi-impacted aquatic environments. The trophic gradient, observed with chemical analyses, was clearly highlighted by the condition index, demonstrating that the downstream site provided better food availability. The lower digestive enzyme activities measured at the downstream site could be linked to this trophic gradient or to the effect of contaminants. The results of MN tests and comet assays and the decrease of GST activity constitute converging arguments for an additional toxicity gradient.

The complementarity of all these biomarkers, which are representative of different biological levels and are not uniformly sensitive to pollutions, as well as their potential usefulness to evaluate a complex ecotoxicological impact, are clearly evidenced by this integrated study.

Acknowledgements - The authors wish to thank E. Uher and A. Arini for their support in field work and sample analysis and J. Guieu for his help for the English revision. This work is part of the Piren-Seine research program. A. Bourgeault acknowledges a PhD grant from the Ile-de-France Regional Council (R2DS program). F. Palais acknowledges a PhD grant from the Champagne-Ardennes Regional Council (AQUAL program).

SUPPORTING INFORMATION

Table S1: Global physico-chemistry parameters (nd: not detected), n=5 for all parameters except for pH and DOC where n=3, POC where n=2 and the temperature which was continuously monitored.

		Upstream			Downstream		
		min	mean	Max	min	mean	max
T°	°C	7.7	10.9	14.0	6.5	12.2	20.2
Ph		7.7	7.8	7.8	7.6	7.6	7.7
Conductivity	$\mu\text{S.cm}^{-1}$	398.0	521.3	618.0	568.0	612.7	690.0
Chlorophylle		2.4	5.1	8.9	9.8	20.7	31.7
Pheopigment	$\mu\text{g.L}^{-1}$	1.1	3.7	5.2	3.2	9.6	24.1
TSS	} mg.L^{-1}	2.5	6.2	8.3	18.8	26.6	36.2
DOC		4.2	4.6	5.1	7.3	7.5	7.7
POC		0.8	0.8	0.8	3.0	3.5	4.1
HCO ₃ ⁻		222.7	256.2	274.5	112.9	208.0	244.0
Na ⁺		5.9	11.7	15.2	11.6	19.5	28.4
K ⁺		0.8	2.1	3.0	2.2	3.8	5.2
Mg ²⁺		1.6	4.6	6.5	4.1	7.6	12.6
Ca ²⁺		41.6	90.8	120.0	53.0	79.6	115.0
Cl ⁻		20.5	24.4	28.3	17.3	31.7	38.2
NO ₂ ⁻		nd	-	Nd	nd	-	nd
NO ₃ ⁻	19.5	24.2	29.0	7.5	16.5	23.3	
SO ₄ ²⁻	21.4	23.5	26.5	32.9	58.9	68.7	

Table S2: Efflux of metal values (ke) (d⁻¹) used for the calculation of influxes in mussels.

Metal	k _e (d ⁻¹)	Auteurs	Organism
Cr	0.011	(Roditi and Fisher, 1999)	<i>D. polymorpha</i>
Mn	0.211	(Latouche and Mix, 1982)	<i>M. edulis</i>
Co	0.018	(Wang et al., 1996)	<i>M. edulis</i>
Ni	0.019	(Zaroogian and Johnson, 1984)	<i>M. edulis</i>
Cu	0.022	(Mersch et al., 1993)	<i>D. polymorpha</i>
Zn	0.02	(Wang et al., 1996)	<i>M. edulis</i>
Cd	0.011	(Roditi and Fisher, 1999)	<i>D. polymorpha</i>

REFERENCES

- Ahmad I, Maria V, Oliveira M, Pacheco M, Santos M. 2006. Oxidative stress and genotoxic effects in gill and kidney of *Anguilla anguilla* L. exposed to chromium with or without pre-exposure to β -naphthoflavone. *Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* 608(1):16-28.
- Antognelli C, Baldracchin F, Piazzoli A, Frosini R, Talesa V, Giovannini E. 2006. Activity changes of glyoxalase system enzymes and glutathione-S-transferase in the bivalve mollusc *Scapharca inaequivalvis* exposed to the organophosphate chlorpyrifos. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 86:72-77.
- Barsiene J, Syvokiene J, Bjornstad A. 2006. Induction of micronuclei and other nuclear abnormalities in mussels exposed to bisphenol A, diallyl phthalate and tetrabromodiphenyl ether-47. *Aquatic Toxicology* 78:S105-S108.
- Bernfeld P. 1955. Amylase, α and β . In: Colowick SP, Kaplan NO, editors. *Methods in Enzymology*. New York: Academic press. p 149-158.
- Bervoets L, Voets J, Covaci A, Chu S, Qadah D, Smolders R, Schepens P, Blust R. 2005. Use of transplanted zebra mussels (*Dreissena polymorpha*) to assess the bioavailability of microcontaminants in Flemish surface waters. *Environmental Science and Technology* 39(6):1492-1505.
- Billen G, Garnier J, Mouchel JM, Silvestre M. 2007. The Seine system: Introduction to a multidisciplinary approach of the functioning of a regional river system. *Science of the Total Environment* 375(1-3):1-12.
- Binelli A, Ricciardi F, Riva C, Provini A. 2006. Integrated use of biomarkers and bioaccumulation data in Zebra mussel (*Dreissena polymorpha*) for site-specific quality assessment. *Biomarkers* 11(5):428-448.
- Binelli A, Riva C, Provini A. 2007. Biomarkers in Zebra mussel for monitoring and quality assessment of Lake Maggiore (Italy). *Biomarkers* 12(4):349-368.
- Bolognesi C, Buschini A, Branchi E, Carboni P, Furlini M, Martino A, Monteverde M, Poli P, Rossi C. 2004. Comet and micronucleus assays in zebra mussel cells for genotoxicity assessment of surface drinking water treated with three different disinfectants. *Science of the Total Environment* 333(1-3):127-136.
- Bolognesi C, Landini E, Roggieri P, Fabbri R, Viarengo A. 1999. Genotoxicity biomarkers in the assessment of heavy metal effects in mussels: Experimental studies. *Environmental and Molecular Mutagenesis* 33(4):287-292.
- Bradford M. 1976. A rapid and sensitive method for quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 72:248-254.
- Camargo MMP, Martinez CBR. 2006. Biochemical and physiological biomarkers in *Prochilodus lineatus* submitted to in situ tests in an urban stream in southern Brazil. *Environmental Toxicology and Pharmacology* 21:61-69.
- Charissou AM, Cossu-Leguille C, Vasseur P. 2004. Relationship between two oxidative stress biomarkers, malondialdehyde and 8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine, in the freshwater bivalve *Unio tumidus*. *Science of the Total Environment* 322(1-3):109-122.

- Chen Z, Mayer LM, Weston DP, Bock MJ, Jumars PA. 2002. Inhibition of digestive enzyme activities by copper in the guts of various marine benthic invertebrates. *Environmental Toxicology and Chemistry* 21(6):1243-1248.
- Davison W, Zhang H. 1994. In situ speciation measurements of trace components in natural waters using thin-film gels. *Nature* 367(6463):546-548.
- Dedourge-Geffard O, Palais F, Biagianti-Risbourg S, Geffard O, Geffard A. 2009. Effects of metals on feeding rate and digestive enzymes in *Gammarus fossarum*: An in situ experiment. *Chemosphere* 77(11):1569-1576.
- Depledge MH. 2009. Novel approaches and technologies in pollution assessment and monitoring: A UK perspective. *Ocean and Coastal Management* 52(7):336-341.
- Emmanouil C, Green RM, Willey FR, Chipman JK. 2008. Oxidative damage in gill of *Mytilus edulis* from Merseyside, UK, and reversibility after depuration. *Environmental Pollution* 151(3):663-668.
- Essedaoui A, Kerambrun P, Alliot E, Sif J. 2001. Impact de la pollution métallique sur l'activité des hydrolases au niveau de la glande digestive du mollusque *Mytilus galloprovincialis* de la région de Jorf-Lasfar (Maroc). *Marine Life* 11(1-2):21-31.
- Fernandez-Reiriz MJ, Labarta U, Navarro JM. 2004. Feeding and digestive response of *Argopecten purpuratus* to short-term variation in food quality and quantity. *Aquaculture* 237(1-4):347-364.
- Fisher SW, Gossiaux DC, Bruner KA, Landrum PF. 1993. Investigations of the toxicokinetics of hydrophobic contaminants in the zebra mussel (*Dreissena polymorpha*). In: Nalepa TF, Schloesser DW, editors. *Zebra Mussels: Biology, Impacts and Controls*. Boca Raton: Lewis. p 465-490.
- Frasco MF, Guilhermino L. 2002. Effects of dimethoate and beta-naphthoflavone on selected biomarkers of *Poecilia reticulata*. *Fish Physiology and Biochemistry* 26:149-156.
- Habig W, Pabst M, Jakoby W. 1974. Glutathione S transferases. The first enzymatic step in mercapturic acid formation. *Journal of Biological Chemistry* 249(22):7130-7139.
- Hayashi M, Ueda T, Uyeno K, Wada K, Kinoshita N, Saotome K, Tanaka N, Takai A, Sasaki YF, Asano N and others. 1998. Development of genotoxicity assay systems that use aquatic organisms. *Mutation Research - Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* 399(2):125-133.
- Huvet A, Daniel J-Y, Quéré C, Dubois S, Prudence M, Van Wormhoudt A, Sellos D, Samain J-F, Moal J. 2003. Tissue expression of two [alpha]-amylase genes in the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. Effects of two different food rations. *Aquaculture* 228(1-4):321-333.
- Ibarrola I, Navarro E, Iglesias JIP, Urrutia MB. 1999. Time-course of digestive-enzyme acclimation in the cockle *Cerastoderma edule*. *Marine Biology* 135(1):47-56.
- Johnson MA, Paulet YM, Donval A, Le Pennec M. 1996. Histology, histochemistry and enzyme biochemistry in the digestive system of the endosymbiont-bearing bivalve *Loripes lucinalis* (Lamarck). *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 197(1):15-38.

- Kirsch-Volders M, Sofuni T, Aardema M, Albertini S, Eastmond D, Fenech M, Ishidate Jr M, Lorge E, Norppa H, SurrallÃ©s J and others. 2000. Report from the vitro micronucleus assay working group. *Environmental and Molecular Mutagenesis* 35(3):167-172.
- Klobucar GOIV, Pavlica M, Erben R, Papes D. 2003. Application of the micronucleus and comet assays to mussel *Dreissena polymorpha* haemocytes for genotoxicity monitoring of freshwater environments. *Aquatic Toxicology* 64(1):15-23.
- Lagadic L, Caquet T, Ramade F. 1994. The role of biomarkers in environmental assessment. (5) Invertebrate populations and communities. *Ecotoxicology* 3(3):193-208.
- Latouche YD, Mix MC. 1982. The effects of depuration, size and sex on trace metal levels in bay mussels. *Marine Pollution Bulletin* 13(1):27-29.
- Looise BAS, Holwerdu DA, Foekemu EM. 1996. Induction of Glutathione-S-transferase in the Freshwater Bivalve *Sphaerium corneum* as a Biomarker for Short-Term Toxicity Tests? *Comparative Biochemistry and Physiology* 113C:103-107.
- Luoma SN, Rainbow PS. 2005. Why Is Metal Bioaccumulation So Variable? *Biodynamics as a Unifying Concept. Environmental Science & Technology* 39(7):1921-1931.
- Marvin C, Allan L, Bryant D, McCarry B. 2000. Use of the zebra mussel (*Dreissena polymorpha*) as a bioindicator for aromatic hydrocarbons in Hamilton Harbour. *Water Quality Research Journal of Canada* 35(1):59-72.
- Mersch J, Beauvais MN, Nagel P. 1996. Induction of micronuclei in haemocytes and gill cells of zebra mussels, *Dreissena polymorpha*, exposed to clastogens. *Mutation Research - Genetic Toxicology* 371(1-2):47-55.
- 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(8):1475-1485.
- Michel XR, Beasse C, Narbonne JF. 1995. In vivo metabolism of benzo(a)pyrene in the mussel *Mytilus galloprovincialis*. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 28(2):215-222.
- Milam CD, Farris JL. 1998. Risk identification associated with iron-dominated mine discharges and their effect upon freshwater bivalves. *Environmental Toxicology and Chemistry* 17(8):1611-1619.
- Minier C, Abarnou A, Jaouen-Madoulet A, Le Guellec AM, Tutundjian R, Bocquene G, Leboulenger F. 2006. A pollution-monitoring pilot study involving contaminant and biomarker measurements in the Seine Estuary, France, using zebra mussels (*Dreissena polymorpha*). *Environmental Toxicology and Chemistry* 25(1):112-119.
- Mizrahi L, Achituv Y. 1989. Effect of heavy metals ions on enzyme activity in the mediterranean mussel, *Donax trunculus*. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 42(6):854-859.
- Osman AM, van den Heuvel H, van Noort PCM. 2007. Differential responses of biomarkers in tissues of a freshwater mussel, *Dreissena polymorpha*, to the exposure of sediment extracts with different levels of contamination. *Journal of Applied Toxicology* 27:51-59.

- Palais F, Jubeaux G, Dedourge-Geffard O, Biagianti-Risbourg S, Geffard A. Accepted. Amylolytic and cellulolytic activities in the crystalline style and the digestive diverticulae of the freshwater bivalve *Dreissena polymorpha* (Pallas, 1771). Molluscan research.
- Pellet B, Geffard O, Lacour C, Kermoal T, Gourlay-Francé C, Tusseau-Vuillemin M-H. 2009. A model predicting waterborne Cd bioaccumulation in *Gammarus pulex*: the effects of dissolved organic ligands, calcium and temperature. Environmental Toxicology Chemistry 28(11):2434-2442.
- Richardson BJ, Maka E, De Luca-Abbotta SB, Martina M, McClellana K, Lama PKS. 2008. Antioxidant responses to polycyclic aromatic hydrocarbons and organochlorine pesticides in green-lipped mussels (*Perna viridis*): Do mussels "integrate" biomarker responses? Marine Pollution Bulletin 57(6-12):503-514.
- Roditi HA, Fisher NS. 1999. Rates and routes of trace element uptake in zebra mussels. Limnology and Oceanography 44(7):1730-1749.
- Roditi HA, Fisher NS, Sañudo-Wilhelmy SA. 2000. Field testing a metal bioaccumulation model for zebra mussels. Environmental Science and Technology 34(13):2817-2825.
- Rogers C, Brabander D, Barbour M, Hemond H. 2002. Use of physical, chemical, and biological indices to assess impacts of contaminants and physical habitat alteration in urban streams. Environmental Toxicology and Chemistry 21(6):1156-1167.
- Roméo M, Gharbi-Bouraoui S, Gnassia-Barelli M, Dellali M, Aïssa P. 2006. Responses of *Hexaplex (Murex) trunculus* to selected pollutants. Science of the Total Environment 359:135-144.
- Singh NP, McCoy MT, Tice RR, Schneider EL. 1988. A Simple Technique for Quantitation of Low-Levels of DNA Damage in Individual Cells. Experimental Cell Research 175(1):184-191.
- Teil M-J, Alliot F, Blanchard M, Bourges C, Dargnat C, Desportes A, Gasperi J, Labadie P, Lorgeoux C, Moilleron R and others. 2009. Contamination de l'Orge et de la Seine par des micropolluants organiques : PBDE, phtalates, alkylphénols et HAP sous différentes conditions hydrologiques. Rapport d'activité 2008 du programme Piren-Seine. 24p. http://www.sisyphes.upmc.fr/piren/webfm_send/767.
- Thévenot DR, Moilleron R, Lestel L, Gromaire MC, Rocher V, Cambier P, Bonté P, Colin JL, 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(1-3):180-203.
- Tusseau-Vuillemin MH. 2001. Do food processing industries contribute to the eutrophication of aquatic systems? Ecotoxicology and Environmental Safety 50(2):143-152.
- Tusseau-Vuillemin MH, Gourlay C, Lorgeoux C, Mouchel JM, Buzier R, Gilbin R, Seidel JL, Elbaz-Poulichet F. 2007. Dissolved and bioavailable contaminants in the Seine river basin. Science of the Total Environment 375(1-3):244-256.
- Valavanidis A, Vlahogianni T, Dassenakis M, Scoullou M. 2006. Molecular biomarkers of oxidative stress in aquatic organisms in relation to toxic environmental pollutants. Ecotoxicology and Environmental Safety 64(2):178-189.

- Vasseur P, Cossu-Leguille C. 2003. Biomarkers and community indices as complementary tools for environmental safety. *Environment International* 28(8):711-717.
- Villela IV, de Oliveira IM, Silveira JC, Dias JF, Henriques JAP, da Silva J. 2007. Assessment of environmental stress by the micronucleus and comet assays on *Limnoperna fortunei* exposed to Guaiba hydrographic region samples (Brazil) under laboratory conditions. *Mutation Research-Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* 628(2):76-86.
- Vincent-Hubert F, Fiat L, Arini A, Gourlay C, Tusseau-Vuillemin MH. 2008. Application of the micronucleus and comet assay to zebra mussel for genotoxicity monitoring of freshwater in urban areas: Experimental studies with cadmium. SETAC Europe 18th Annual Meeting, Varsow, Poland.
- Wang WX, Fisher NS, Luoma SN. 1996. Kinetic determinations of trace element bioaccumulation in the mussel *Mytilus edulis*. *Marine Ecology Progress Series* 140(1-3):91-113.
- Zaroogian GE, Johnson M. 1984. Nickel uptake and loss in the bivalves *Crassostrea virginica* and *Mytilus edulis*. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 13(4):411-418.

Article 3

Time-integrated metal partitioning using sediment trap and DGT samplers versus discrete metal partitioning: Comparison of spatial and temporal variability in an urban river

Soumission en cours pour Journal of Environmental Monitoring

Priadi C. ¹, Bourgeault A. ^{2,3}, Ayrault S. ¹, Gourlay-Francé C. ^{2,3}, Tusseau-Vuillemin M.-H. ⁴,
Bonté P. ¹ and Mouchel J. M. ⁵

¹ Laboratoire des Sciences du Climat et de l'Environnement, UMR CNRS, avenue de la Terrasse, F-91198 Gif-sur-Yvette, France.

² Cemagref, UR HBAN, Parc de Tourvoie - BP 44, F-92163 Antony, France.

³ FIRE FR-3020, 4 place Jussieu, F-75005 Paris, France.

⁴ IFREMER, Technopolis 40, 155 rue Jean-Jacques Rousseau, F-92138 Issy-Les-Moulineaux, France.

⁵ UPMC, 4 place Jussieu, F-75005 Paris, France.

Abstract – Metal solid-solution partitioning (K_d) calculated from discrete grab sampling has often been used in environmental monitoring. This article will discuss the use of time-integrated metal partitioning calculated from suspended particulate matter (SPM) collected in sediment trap and labile metals measured by the Diffusive Gel in Thin Films (DGT) method collected once a month during one year at the Seine River, upstream and downstream of the Greater Paris Region. Since values are time-integrated, dramatic fluctuations were smoothed out and significant medium-term trends were enhanced. As a result, time-integrated K_d was able to better illustrate urbanization impact between sites compared to discrete K_d . The impact of significant seasonal phenomenon such as the winter flood, the dry flow and redox cycles was also, to a certain extent, visible in time-integrated K_d values at upstream site. The use of time-integrated metal partitioning may be useful for medium to long-term metal study in parallel with bio-accumulation studies considering that the latter is also a time-integrated process.

Keywords: suspended particulate matter (SPM), ICP-MS, pollution, water column

TOPIC INTRODUCTION

In freshwater systems, metals are found as various forms ranging from cationic, inorganic, organometallic, sorbed on oxides and clay surfaces, metal alloys or incorporated in crystalline structures (Hochella et White, 1990; Luoma et Rainbow, 2008b; Stumm et Morgan, 1981). Defining all the metal forms (i.e. its speciation) in the water column is currently analytically limited because it involves various forms in multiple pools. Yet, there is a need of investigation of metal repartition in such unstable system, and not just isolating specific phases, to illustrate and predict the environmental fate and effects of metal contaminants (Lofts et Tipping, 2000; Unsworth et al., 2006; Vignati et al., 2009). Metals repartition in various phases is therefore operationally defined to simplify metal speciation study in the aquatic environment. One approach is to divide the water column into two phases, the first being the dissolved fraction, as the fraction passing through the 0.45 (or 0.22) μm filter threshold and the solid fraction that is retained on the filter (Eaton et al., 2005; Luoma et Rainbow, 2008b; Ödman et al., 2006). Metal repartition is often defined as the ratio between metal concentrations in these defined "solid" and "dissolved" phases, known as K_d .

With relatively simple measurements, K_d may indicate a useful general view of metal condition in the water column (Neal et al., 1997; O'Connor et Connolly, 1980). K_d illustrates the ability of the suspended particulate matter (SPM) to bind trace metals (Luoma et Rainbow, 2008a). Therefore, it is considered to be an important parameter that indicates metal transport properties and sediment storage (Lofts et Tipping, 2000). K_d values may also indicate relative spatial and temporal evolution of metal contamination in the river system fluctuating with water chemistry, metal input and output fluxes (Bibby et Webster-Brown, 2005; Lu et Allen, 2001). K_d is usually derived from discrete spot measurements. It is a parameter that may vary easily with even a

slight fluctuation of dissolved fraction (Shafer et al., 2004) for which concentrations may oscillate 2-3 folds in urbanized water at the same location and is prone to analytical contamination (Luoma et Rainbow, 2008a). Hence, K_d is often discussed to have limited predictive capability (Lofts et Tipping, 2000). Alternatively, K_d values can be empirically calculated as a function of water chemistry variables, using metal speciation models such as WHAM, SCAMP or MINTEQ (Koelmans et Radovanovic, 1998; Ng et al., 1996), although significant uncertainties were identified (Lofts et Tipping, 2000).

Consequently, there is a need to explore other possibilities of in-field metal repartition evaluation that depends less on rapidly fluctuating parameters but still responsive to medium and long-term water chemistry evolution and seasonal and spatial evolution.

Discrete sampling-related problems may be solved by calculating K_d using dissolved and particulate metal concentrations from time-weighted averaged samples. When deployment time is selected correctly, time-averaging samplers are able to measure changes of heavy-metal concentrations related to various parameters (Dunn et al., 2007; Tessier, 2003). In the water column, time-integrated solid fraction may be sampled by sediment trap (Gasperi et al., 2008; P. Ciffroy et 1999; Tessier et Bonté, 2002) but the sampling of time-integrated dissolved fraction for metal analysis is currently impossible in practice. A possible approach is by using in-situ passive samplers. The Diffusion Gradient in Thin Films (DGT) technique was initially developed by Davison and Zhang (1994) to quantitatively measure time-weighted average concentrations of labile metals in water. Tusseau-Vuillemin et al. (2004) and Buzier et al. (2006) then further developed the use of restrictive pore gels in DGTs, measuring labile metals composed of inorganic metals plus a fraction of easily exchangeable organic complexes that correlated with metal toxicity in *Daphnia magna*. With the combination of sediment traps and DGTs, it would then be possible to examine medium-term metal repartition.

To which extent is metal partitioning obtained from time-averaged samples comparable and representative for spatial and temporal variations as opposed to those calculated from discrete samples? This paper aims to take a closer look on metal partitioning calculated from time-averaged and discrete samples and to evaluate their comparability in the need of robust and representative environmental monitoring parameters. It will also discuss how far these metal partitioning methods allow the study of urbanization impacts on metal behaviour in the water column.

METHODOLOGY

Study site

For this work, samples are collected along the Seine River, France. The Seine River is located in a sedimentary basin in the north of France (Fig. 1), flowing through the Greater Paris Region. It drains an area of 64700 km² with an average density of 215 people/km², an ideal example of an urbanized basin as it hosts 25% of French

agriculture, 30% of French industry and 23% of French population (Thévenot et al., 2007). Previous studies have showed the significant metal pressure on the river (Meybeck et al., 2007a; Priadi et al., 2009; Thévenot et al., 2007; Tusseau-Vuillemin et al., 2007). This watershed is representative of a multi-metal contamination in an urban watershed.

The sampling scheme aims to distinguish the impacts of two sources of anthropogenic influence to the Seine River. The first source is the area of Greater Paris, including the most urbanized area in the region with more than 3700 habitants/km². Second, is the wastewater treatment plant WWTP Seine-Aval treating around 1.7 million m³ per day (SIAAP, 2007). The first sampling site is located at Marnay-sur-Seine, situated in far upstream of the Seine River (Figure 1). It was chosen to represent a site non-affected by the Greater Paris region, where the Seine is a 6 Strahler order river. The second site is the Seine at Bougival, situated 40 km downstream of Paris (Strahler order 7). It was chosen to represent the impact of Paris without the influence of the WWTP Seine-Aval. Another 40 km further downstream, Triel-sur-Seine was selected to represent the impact of Paris along with the Seine-Aval after the confluent of the Seine River with the Oise River, making it a Strahler order 8. Sampling was performed from October 2008 to October 2009. Unless mentioned otherwise, samples are collected around the 20th of each month.

Physico-chemical parameters

pH was measured with either pH meter WTW 330i from VWR or Waterproof pHtestr 20 from Eutech instruments. Temperature was continuously monitored with Hobo temperature sensor. Conductivity was measured in the laboratory within 6 hours from field sampling with an Orion conductivity cell from Thermo. Daily discharge values were obtained at www.hydro.eaufrance.fr. Water was collected in plastic bottle for chlorophyll, pheopigment and ion analysis. Analytical procedures are describes elsewhere (Bourgeault et al, 2010). Water was collected into 1L pre-combusted glass bottles for dissolved organic carbon (DOC), TSS and and particulate organic carbon (POC) analysis as described in Bourgeault et al, (2010). The absorbance at 254 nm (A₂₅₄) of the GF-F filtrate was measured and the specific ultra-violet absorbance (SUVA) was calculated as $SUVA = A_{254}/DOC$ in cm⁻¹. G⁻¹.L. According to Traina et al (1990), SUVA can be considered as an indicator of the aromaticity of dissolved organic matter (DOM).

Metal sampling and analysis

Materials and sample handling were done in a systematic clean method. All bottles and containers were soaked in 2 N HNO₃ during at least 3 days. Afterwards they were rinsed thoroughly 3 times with de-ionised water. In the field, all bottles, buckets and containers were rinsed 3 times with river water. Sampling was done from riverbank where a PVC bucket collected water around 3 m from riverbank.

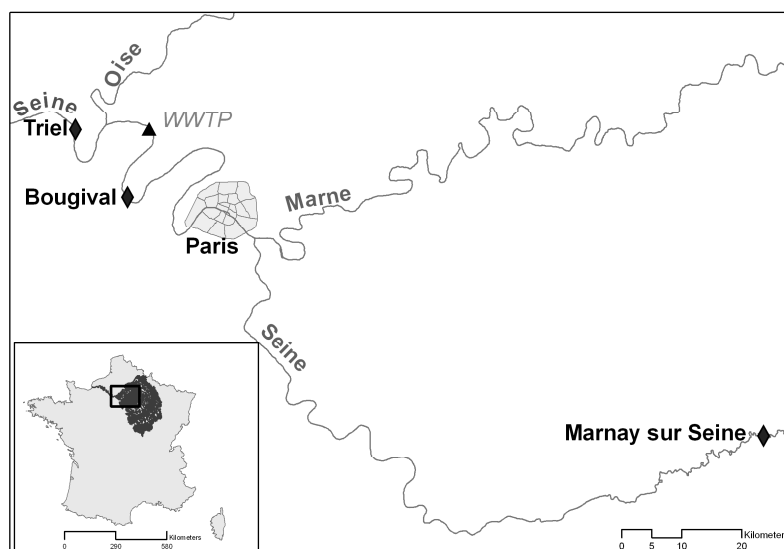


Figure 1: Sampling sites marked with diamonds; from upstream to downstream: Marnay sur Seine, Bougival and Triel. Black triangle indicates Seine-Aval waste water treatment plant (WWTP) at Achères.

Dissolved fraction sampling

The dissolved 0.45 μm fraction was obtained by filtering on-field with disposable Millex-LH Millipore syringe filters and 20 mL disposable syringe, acidified with pure 200 μl HNO_3 65% (Merck Suprapur) to avoid precipitation. Sterile disposable 50 ml polyethylene tubes, previously tested for clean handling, were used. All samples are transported and kept in 4°C in the dark before analysed.

Labile fraction sampling

Six diffusive gradient in thin films (DGT) in each site were deployed once a month in order to assess time-weighted average labile metal contamination. This deployment duration was previously validated by Bourgeault et al (2010). Method of assembling DGT is explained thoroughly in Tusseau-Villemin et al (2007). Restricted diffusive gels of 0.8 mm thickness were used, covered with a 0.45 μm polyethersulfone (PES) filter and a 0.4 polycarbonate filter. After retrieval, DGTs were brought back to the laboratory and chelex resins were eluted in 1M nitric acid in which the analysis was performed. Labile concentrations were calculated according to the method explained in Bourgeault et al (2010).

Suspended Particulate Matter (SPM) sampling

For discrete SPM sampling, water was collected in 2 L polyethylene bottles, kept in the dark at 4°C and filtered in the laboratory in maximum 1 month after sample collection. Filtering was done on a 0.45 μm Millipore MF-Millipore cellulose ester filters mounted on the Millipore filtration system diameter 47 mm. When possible, filtration was done on one filter, but in extreme cases where turbidity was high, filtration was done on two filters. Filters were weighted before and after filtration after drying filters at 40°C and stabilizing weight for several hours/days in a desiccated jar. Volume of water filtered was calculated

by weighting the flask before and after filtration. The two values were used to obtain the concentration of SPM.

Sediment trap was also installed in each site. It consisted of a 2 L polyethylene terephthalate (PET) water bottle hung from at least 1 m from the river bank at mid-depth. Two holes of a diameter of around 4 cm were carved on two sides on the upper side of the bottle with the two holes posed creating a parallel axe to the river flow. This method was previously successfully used by Tessier and Bonté (2002) to collect the Seine SPM. SPM from sediment trap was emptied in a polyethylene bottle on field along with uplying water. They were transported and stored in the dark at 4°C before analysis. Storage duration ranged from 2 days to one month. Samples were then centrifuged in the laboratory at 2800 g for 20 mn for several cycles until all the water is centrifuged and all the SPM are recovered. The SPM was then freeze-dried for at least 48h and homogenized with agate mortar.

SPM was totally digested during 3-4 weeks using various acids on different temperatures. All discrete SPM recovered on filters and 0.1 g of time-integrated SPM from sediment trap was digested in Teflon vessels under laminar flow hood using a heating block (Digiprep, SCP Science). The first attack uses 10 mL aqua regia (HNO₃ 65%: HCl 30%, 3:1) for 3 days at room temperature. Excess nitrogen dioxide were evaporated at 90°C and underlying liquid was separated ensuring the least quantity of HCl remaining in the vessels through rinsing 3 times with 10 mL 0.5 N HNO₃. Digestion continued with 10 mL of a HF 48.9% : HNO₃ 65% mixture (1:1) to attack siliceous minerals during 24h at room temperature. Sample was evaporated near to dryness at 100°C to eliminate hexafluorosilicic acid. The solid residue was then attacked with 12 mL of a HNO₃ 65%: HClO₄ 69-72% (1:1) mixture heated at 120°C during 5 days. Final solutions were evaporated near to dryness. Then, 1 mL of 65% HNO₃ was added to the remaining solution that was then evaporated near dryness. This step was repeated three times. The solutions were then brought into a 50 mL 0.5 N HNO₃ solution. For each digestion, 0.1 g of a certified lake sediment reference material was also digested (SL1, International Atomic Energy Agency IAEA).

This method was adapted for the Seine River carbonated SPM, and allows total SPM digestion. The 3 day aqua regia step allowed dissolution of the abundant amount of carbonates in samples. Afterwards, underlying liquid was separated to avoid re-precipitation of the Ca and Mg fluorides in HF solution. All solutions were ultrapure reagents to assure minimum contamination (HNO₃ and HCl Normatom grade, VWR France, and HF and HClO₄ "for trace metal analyses", Baker, from Sodipro France).

Trace metal analysis

Major and trace metal concentration including Ag, Al, As, Ca, Cd, Cr, Co, Cu, Fe, K, Mg, Mn, Ni, Se, Ti, Pb, V, and Zn were determined in dissolved fraction and in digested SPM fraction using Inductively Coupled Plasma Quadrupolar Mass Spectrometry (ICP-QMS)

(XIICCT-Series, ThermoElectron, France). ICP-QMS spectrometer was calibrated using standard solutions and checked for with certified river water (SRM 1640, National Institute for Science and Technology, Gaithersburg, USA) routinely during analysis. Instrumental drifts and plasma fluctuations were corrected using internal standards (Re, Rh, and In (SPEX, SCP Science, France)) for all the metals studied, and Ge for major elements including Ca, Al, and Mg. To minimise isobaric interferences, analysis with the Collision Cell Technology (CCT) introducing a supplementary gas mixture of H₂ (7%) and He (93%) was applied for Fe, Mn, and Cd, Cr, Co, Cu, Mn, Ni, Pb, Zn determination.

Overall, sampling representativity and analytical accuracy was satisfactory. Ten dissolved fractions collected at one time in one site showed a standard deviation of 2% or less for Co, Mn, Ni, Pb and Zn, 5% for Cu and 9% for Cr and Cd. Variation of labile metals recovered by DGT depended on time and metals. Standard deviation (SD) of the 6 DGT is displayed as supporting information. Values obtained for the reference sediment SL1 (12 replicates) were compared to certified values and recovery was 90-99% for all analyzed elements except 116% for Cd with a standard deviation of 10% or less for all elements except Mn with SD at 18% and Cd with SD at 24%.

Kd calculation

Results and interpretation of solid-solution partitioning was limited to 8 elements, Cd, Cr, Co, Cu, Mn, Ni, Pb and Zn, for which the ability for DGTs to estimate a one-month labile concentration has been validated (Bourgeault et al, 2010). "Discrete" Kd (10³ L/g) were calculated as the concentration ratio between metals in SPM (>0.45 µm) to discrete dissolved metals (<0.45 µm) both collected by discrete sampling (Eq.1).

$$\text{"Discrete" } Kd^m = [Me]_{SolidMeas}^m / [Me]_{DissMeas}^m \quad (\text{Eq. 1})$$

where $[Me]_{SolidMeas}^m$ is the concentration of metals retained by the 0.45 µm filter and $[Me]_{DissMeas}^m$ is the concentration of metals which passed through the 0.45 µm filter on month m.

"Integrated" Kd (10³ L/g) were calculated as the concentration ratio between metal in SPM collected in sediment trap to labile metal (DGT) both integrating one month of sampling. (Eq.2)

$$\text{"int egrated" } Kd = [Me]_{trap}^m / [Me]_{Labile}^m \quad (\text{Eq. 2})$$

where $[Me]_{trap}^m$ is the concentration of settleable sediment collected in the sediment trap deployed on month m-1 and collected on month m and $[Me]_{Labile}^m$ is the concentration of labile metals measured with DGTs deployed on month m-1 and collected on month m.

Most studies display logarithmic Kd values but for this study, basic Kd was chosen to better observe the fluctuations in metal repartition.

Labile – Inert – Solid Partitioning

Average metal proportion in the three different pools of the water column: labile metals measured by DGT, inert metals as the difference between labile and dissolved metals, and solid metals; were estimated. Due to different measurement method for each pool (discrete vs integrating), discrete measurements of dissolved and solid metals were adjusted to be comparable to time-integrated labile metals. For one given period, relative proportions were calculated as the following:

During month m , discrete dissolved metal concentrations were averaged between measurements taken on month m and the month before ($m-1$) (Eq.3):

$$[Me]_{DisInt}^m = \frac{[Me]_{DissMeas}^{m-1} + [Me]_{DissMeas}^m}{2} \text{ when } \frac{[Me]_{DissMeas}^{m-1} + [Me]_{DissMeas}^m}{2} \geq [Me]_{labile}^m \quad (\text{Eq.3})$$

Inert metal concentration was calculated as the difference between the averaged dissolved metal concentration obtained by Eq.3 and the labile metal concentration (Eq.4).

$$[Me]_{inert}^m = [Me]_{dissolved}^m - [Me]_{labile}^m \quad (\text{Eq.4})$$

When dissolved concentrations were lower than quantification limit (QL) and average dissolved concentration calculated from Eq.3 became lower than labile concentration, dissolved metals were considered to be composed of only labile metals. Labile concentration on month m was therefore used to replace dissolved metal concentration (Eq. 5).

$$[Me]_{DisInt}^m = [Me]_{labile}^m \text{ when } \left([Me]_{DissMeas}^{m-1} + [Me]_{DissMeas}^m \right) / 2 < [Me]_{labile}^m \quad (\text{Eq. 5})$$

Solid metal concentration was calculated from averaged discrete particulate metals from month m and $m-1$ (Eq.6), similar to the averaging of dissolved metals. Afterwards, proportions of labile (Eq.8), inert (Eq.9) and solid phases (Eq.10) were calculated through the ratio of each phase with the total metals (Eq.7).

$$[Me]_{SolidInt}^m = \left([Me]_{solid}^{m-1} + [Me]_{solid}^m \right) / 2 \quad (\text{Eq. 6})$$

$$[Me]_{Total}^m = [Me]_{DisInt}^m + [Me]_{SolidInt}^m \quad (\text{Eq. 7})$$

$$\%Me_{Labile}^m = \frac{[Me]_{Labile}^m}{[Me]_{Total}^m} \quad (\text{Eq. 8})$$

$$\%Me_{Inert}^m = \frac{[Me]_{DisInt}^m - [Me]_{Labile}^m}{[Me]_{Total}^m} \quad (\text{Eq. 9})$$

$$\%Me_{SolidInt}^m = \frac{[Me]_{SolidInt}^m}{[Me]_{Total}^m} \quad (\text{Eq. 10})$$

Where

$[Me]_{DissMeas}^m$ = concentration of discrete dissolved metal on month m ($\mu\text{g.L}^{-1}$)

$[Me]_{PartMeas}^m$ = concentration of discrete particulate metal on month m ($\mu\text{g.g}^{-1}$) normalized by SPM concentration ($\mu\text{g.L}^{-1}$)

- $[Me]_{Labile}$ = concentration of labile metal measured with DGT deployed on month m-1 and collected on month m ($\mu\text{g.L}^{-1}$)
- $[Me]_{SolidInt}^m$ = concentration of averaged normalized discrete solid metals from month m-1 and m ($\mu\text{g.L}^{-1}$)
- $[Me]_{DissInt}^m$ = concentration of averaged discrete dissolved metals from month m-1 and m ($\mu\text{g.L}^{-1}$)

RESULTS

Most data population did not follow a normal distribution (Shapiro-Wilk test $W=0.05$). Consequently, median values were used and comparison between samples was performed using Mann-Whitney ranked test ($p = 0.01$).

River Chemistry

Most water quality parameters measured throughout the campaign displayed a Marnay - Bougival - Triel gradient indicating evident evolution in water chemistry (Table 1). pH decreased downstream with medians being 8.20 ± 0.04 , 7.91 ± 0.04 and 7.73 ± 0.04 at Marnay, Bougival and Triel, respectively. Downstream sites had significantly higher values of DOC and POC and higher photosynthetic activities indicated by higher chlorophyll concentration. Major ions showed two different trends; Ca and NH_4^+ concentrations remained constant at the 3 sites, while the others increased downstream. From upstream to downstream, median of magnesium and potassium ion concentration doubled, while chloride and sulfate multiplied by 2.5.

Median metal concentrations in different pools in the water column showed an evident upstream-downstream increasing trend from Marnay to Bougival and Triel, although in general, Bougival displays higher metal content than Triel for all except for Co and Mn (Table 2). The dilution effect of the confluence between the Seine and the Oise River (25 km downstream Bougival and 15 km upstream Triel-sur-Seine) may be the cause of the decrease of metal concentration in Triel.

Dissolved metal concentrations compared with other urban rivers (Luoma et Rainbow, 2008a) showed that the Seine River dissolved concentrations (Table 2) are higher but are still in the same order of magnitude. Data found during this campaign were also comparable to other dissolved metal concentration earlier reported in the Seine River (Elbaz-Poulichet et al. 2006). Labile metal concentrations of Co, Cu, Mn and Ni were within the range of those measured by (Tousseau-Vuillemin et al., 2007) in the Seine River basin. Concentration of metals in SPM collected by discrete sampling were much more variable than those measured in SPM collected with the sediment trap on a monthly basis. Median values between the two sets were comparable. When metal concentration in SPM was normalized by background values obtained from numerous sites in the Seine River basin (Thévenot et al., 2009), SPM collected downstream at Bougival and Triel

showed an average enrichment of 2-3 times for Ni, Cr and Co, 7-8 times for Pb, Cu and Zn, and 15-18 times for Cd.

Table 1: Summary of measured physico-chemical parameters indicating minimum-maximum values with 1st quartile – median – 3rd quartile in parenthesis; Q: discharge; DOC: dissolved organic carbon; SPM: suspended particulate matter; POC: particulate organic carbon (n=13)

	Marnay	Bougival	Triel
Q (m3/s)	25 - 89 (37 - 50 - 54)	92 - 324 (116 - 184 - 215)	198 - 550 (225 - 340 - 384)
pH	8.06 - 8.32 (8.14 - 8.18 - 8.28)	7.20 - 8.24 (7.76 - 7.91 - 8.09)	7.10 - 8.01 (7.58 - 7.73 - 7.85)
Alkalinity (mg/L)	152 - 287 (218 - 238 - 262)	182 - 281 (224 - 244 - 259)	189 - 281 (236 - 253 - 264)
Conductivity (µS/cm)	268 - 526 (387 - 479 - 499)	449 - 611 (490 - 527 - 570)	506 - 668 (588 - 619 - 655)
Temperature (°C)	5.6 - 23 (7 - 13.1 - 17.1)	4.5 - 22.8 (8.5 - 15.2 - 19.9)	4.9 - 22 (8.9 - 14.4 - 19.2)
Chlorophyll (µg/L)	0.5 - 3.5 (0.7 - 1.0 - 1.7)	0.4 - 15.1 (2.7 - 3.7 - 8.1)	0.3 - 16.4 (2.1 - 2.5 - 7.9)
Dissolved fraction			
DOC (mg/L)	1.62 - 2.68 (1.83 - 2.05 - 2.38)	2.56 - 4.34 (2.77 - 2.94 - 3.25)	3.42 - 5.45 (3.72 - 3.87 - 3.97)
Ca ²⁺ (mg/L)	58 - 105 (72 - 88 - 93)	73 - 100 (80 - 95 - 98)	77 - 109 (89 - 99 - 102)
Mg ²⁺ (mg/L)	0.54 - 8.93 (3.28 - 3.97 - 4.66)	0.64 - 10.3 (3.45 - 6.4 - 7.03)	0.68 - 8.63 (5.79 - 7.34 - 8.12)
K ⁺ (mg/L)	1.55 - 6.26 (1.93 - 2.06 - 3.28)	0.42 - 4.61 (2.49 - 3.36 - 4.19)	1.54 - 9.18 (3.79 - 4.32 - 5.55)
Na ⁺ (mg/L)	3 - 20 (6 - 8 - 9)	6.7 - 17.7 (12.6 - 14.9 - 16.1)	10.4 - 27.5 (15.3 - 19.5 - 22.2)
Cl ⁻ (mg/L)	11 - 27 (13 - 14 - 20)	17.4 - 34.2 (23.9 - 26.6 - 30.1)	19.9 - 41.9 (34 - 37 - 41.2)
NH ₄ ⁺ (mg/L)	0.3 - 1.4 (0.4 - 0.6 - 1)	0.09 - 2.92 (0.17 - 0.41 - 0.74)	0.23 - 4.28 (0.38 - 0.51 - 1.39)
NO ₃ ⁻ (mg/L)	7.8 - 26 (11.3 - 18 - 24.9)	13.2 - 26.7 (15.1 - 21.3 - 25)	20.2 - 35.2 (27.9 - 28.5 - 31.3)
SO ₄ ²⁻ (mg/L)	13.7 - 22.4 (14.3 - 17.3 - 18.8)	24.4 - 44.6 (31.1 - 36.1 - 38.4)	28 - 51.5 (43.6 - 46.4 - 49.5)
Particulate fraction			
SPM (mg/L)	3.1 - 96.9 (4.0 - 8.5 - 13.1)	3.4 - 20.3 (7.7 - 8.9 - 16.2)	3.1 - 82.4 (6.7 - 9.5 - 11.3)
POC (mg/L)	0.05 - 1.9 (0.42 - 0.56 - 0.9)	0.38 - 3.92 (0.69 - 0.88 - 1.03)	0.04 - 2.47 (0.72 - 0.89 - 1.08)
Ca (%)	13.9 - 44.2 (17.0 - 17.8 - 18.7)	7.2 - 15.5 (11.6 - 12.1 - 12.7)	4.0 - 30.8 (9.1 - 9.7 - 10.1)
Fe (%)	0.65 - 2.87 (1.53 - 1.84 - 2.20)	1.42 - 3.26 (2.35 - 2.62 - 2.91)	0.29 - 5.17 (2.40 - 2.78 - 3.09)
Al (%)	0.4 - 4.77 (2.22 - 3.10 - 3.41)	1.19 - 5.30 (2.69 - 4.06 - 4.55)	0.25 - 8.47 (3.02 - 3.80 - 3.94)
Mg (mg/kg)	158 - 12227 (2661 - 3382 - 3970)	3515 - 19076 (4429 - 5766 - 8270)	1397 - 8815 (4965 - 5462 - 7656)
K (mg/kg)	183 - 9478 (5288 - 7306 - 8088)	2726 - 11946 (7317 - 8883 - 10320)	1446 - 17945 (7944 - 9052 - 9885)

Labile – Inert – Solid Partitioning

Partitioning of each metal in the defined phases varied according to metals and sites (Fig.2). The approach described in Eq. 2-10 consisted in averaging discrete concentrations for the dissolved and solid phases causing the total median values of the three phases displayed in Fig. 2 to be occasionally less or more than 100%. This is mainly true for Cd, Mn and Zn that displayed high variation of discrete concentration to which this averaging method may constitute incertitude of total partitioning of around 5-10%. Nevertheless, performance of averaged median values was relatively satisfactory because Co, Cr, Cu, Ni and Pb showed total averages close to 100%.

Despite the complete digestion method of solid metals, proportion of dissolved metals in these samples was relatively high compared to literature data. Our data showed that for most metals, median proportion of dissolved metal in the water column exceeded more than 50%. Nguyen et al (Nguyen et al., 2005) found Zn, Co, Cd and Pb in a contaminated lake highly associated to the solid phase (for about 70% of the total metal load). Previous metal partitioning values on the Seine River accounted for higher solid fraction (70 to 90%) mostly due to relatively high approximation of SPM concentration (Meybeck et al., 2007b). Nevertheless, our dissolved and particulate metal data were in agreement with other Seine references (Chiffolleau et al., 1994; Elbaz-Poulichet et al.,

2006)), indicating that the Kd calculated was fairly accurate despite of differences with other water bodies.

Table 2 Summary of metal concentration at the three studied sites in four measured phases indicating minimum-maximum values with 1st quartile – median – 3rd quartile in parenthesis (n=13)

			Marnay	Bougival	Triel
Cd	Grab	<0.45µm (µg.L-1)	<LQ	0 - 0.015 (0 - 0 - 0.013)	0 - 0.019 (0.012 - 0.013 - 0.014)
		>0.45µm (µg.g-1)	0 - 4.42 (0.43 - 0.54 - 1.05)	0.77 - 20.53 (1.69 - 2.47 - 4.05)	0.44 - 2.29 (0.88 - 1.41 - 2.06)
	time integrated	Labile DGT (µg.L ⁻¹)	0 - 0.002 (0.001 - 0.001 - 0.001)	0 - 0.007 (0.002 - 0.003 - 0.005)	0 - 0.005 (0.003 - 0.004 - 0.005)
		sed.trap (µg.g-1)	0.269 - 0.444 (0.294 - 0.309 - 0.332)	1.53 - 8.07 (1.73 - 2.65 - 3.57)	0.35 - 3.03 (0.85 - 1.23 - 1.86)
Cr	Grab	<0.45µm (µg.L-1)	0 - 1.086 (<LQ)	0 - 1.041 (0 - 0 - 0.508)	0 - 1.235 (0 - 0.212 - 0.324)
		>0.45µm (µg.g-1)	7.7 - 101.7 (41.9 - 53.6 - 64.8)	46.3 - 102.4 (73 - 84.2 - 88.9)	35.9 - 121.9 (58.1 - 69.1 - 88.1)
	time integrated	Labile DGT (µg.L-1)	0 - 0.035 (0.018 - 0.02 - 0.025)	0 - 0.093 (0.024 - 0.028 - 0.035)	0 - 0.086 (0.025 - 0.031 - 0.037)
		sed.trap (µg.g-1)	42.1 - 54.2 (50 - 50.5 - 51.4)	69.2 - 109.3 (71.3 - 85.4 - 96.4)	56.4 - 86.7 (65 - 73.5 - 80.9)
Co	Grab	<0.45µm (µg.L-1)	0.04 - 0.18 (0.09 - 0.12 - 0.16)	0.13 - 0.25 (0.17 - 0.21 - 0.23)	0.2 - 0.39 (0.26 - 0.3 - 0.32)
		>0.45µm (µg.g-1)	2.48 - 9.17 (6.49 - 7.59 - 8.52)	6.42 - 38.4 (10.75 - 11.51 - 12.7)	5.9 - 25.2 (10.9 - 14 - 17.5)
	time integrated	Labile DGT (µg.L-1)	0 - 0.022 (0.006 - 0.012 - 0.019)	0 - 0.051 (0.016 - 0.023 - 0.042)	0 - 0.078 (0.029 - 0.038 - 0.057)
		sed.trap (µg.g-1)	5.76 - 7.13 (6.44 - 6.68 - 6.87)	8.25 - 11.81 (9.1 - 9.79 - 11.2)	7.69 - 13.04 (9 - 10.33 - 11.76)
Cu	Grab	<0.45µm (µg.L-1)	0.27 - 0.67 (0.35 - 0.37 - 0.46)	0.77 - 1.76 (1.02 - 1.12 - 1.27)	0.8 - 1.56 (1.07 - 1.22 - 1.45)
		>0.45µm (µg.g-1)	5.7 - 95.5 (18.7 - 19.4 - 28)	44.7 - 169.3 (67.9 - 103.9 - 147)	21.1 - 130.3 (56.2 - 72.2 - 93.6)
	time integrated	Labile DGT (µg.L-1)	0 - 0.104 (0.062 - 0.074 - 0.085)	0 - 0.481 (0.172 - 0.253 - 0.298)	0 - 0.388 (0.21 - 0.251 - 0.307)
		sed.trap (µg.g-1)	13.5 - 18.1 (15.3 - 16.1 - 17.2)	78.8 - 185.3 (90.2 - 121.7 - 150.1)	53.4 - 96.8 (56 - 81.8 - 88.9)
Mn	Grab	<0.45µm (µg.L-1)	1.44 - 3.19 (1.81 - 2.43 - 2.6)	3.07 - 17.39 (7.01 - 8.3 - 10.75)	4.37 - 27.63 (11.62 - 15.38 - 17.67)
		>0.45µm (µg.g-1)	130 - 910 (394 - 444 - 761)	514 - 1762 (817 - 1035 - 1186)	484 - 2314 (1097 - 1428 - 1911)
	time integrated	Labile DGT (µg.L-1)	0 - 3.21 (0.41 - 1.13 - 2.24)	0 - 8.38 (2.27 - 3.72 - 7.18)	0 - 10.23 (4.45 - 4.71 - 9.65)
		sed.trap (µg.g-1)	268 - 527 (317 - 431 - 452)	281 - 1825 (492 - 637 - 653)	414 - 966 (502 - 594 - 872)
Ni	Grab	<0.45µm (µg.L-1)	0.48 - 1.93 (0.8 - 1.45 - 1.59)	0.94 - 2.25 (1.48 - 1.76 - 1.98)	1.49 - 2.74 (1.96 - 2.17 - 2.36)
		>0.45µm (µg.g-1)	9.1 - 83.5 (20.5 - 25.4 - 32)	20.9 - 40.5 (26.3 - 32.1 - 36)	0 - 59.5 (21.5 - 30.1 - 39.5)
	time integrated	Labile DGT (µg.L-1)	0 - 0.212 (0.135 - 0.173 - 0.202)	0 - 0.47 (0.228 - 0.322 - 0.419)	0 - 0.796 (0.443 - 0.543 - 0.578)
		sed.trap (µg.g-1)	20.5 - 26.2 (20.6 - 21.3 - 21.6)	26.2 - 40.2 (28.4 - 31.3 - 37.4)	21.2 - 30.7 (25.2 - 27.7 - 29.3)
Pb	Grab	<0.45µm (µg.L-1)	0 - 0.071 (<LQ)	0.79 - 0.255 (0.152 - 0.195 - 0.23)	0 - 0.327 (0.145 - 0.162 - 0.204)
		>0.45µm (µg.g-1)	1 - 69 (29 - 36 - 47)	71 - 307 (118 - 139 - 161)	34 - 145 (82 - 109 - 115)
	time integrated	Labile DGT (µg.L-1)	0 - 0.031 (0.004 - 0.007 - 0.011)	0 - 0.161 (0.024 - 0.032 - 0.058)	0 - 0.039 (0.018 - 0.019 - 0.023)
		sed.trap (µg.g-1)	18.7 - 23.5 (19.7 - 20.2 - 21.7)	80 - 245.2 (93.3 - 123 - 155.2)	50.7 - 98.5 (58.7 - 81.8 - 84.1)
Zn	Grab	<0.45µm (µg.L-1)	0 - 9.768 (0 - 2.257 - 2.611)	3.28 - 24.11 (4.39 - 6.22 - 7.35)	3.47 - 14.6 (4.53 - 6.72 - 9)
		>0.45µm (µg.g-1)	45 - 713 (134 - 185 - 395)	336 - 671 (383 - 480 - 567)	43 - 1402 (256 - 351 - 434)
	time integrated	Labile DGT (µg.L-1)	0 - 1.488 (0.159 - 0.444 - 0.756)	0 - 3.13 (1.51 - 1.83 - 2.47)	0 - 3.74 (1.55 - 2.68 - 3.06)
		sed.trap (µg.g-1)	106 - 149 (110 - 120 - 126)	307 - 694 (406 - 506 - 544)	225 - 415 (249 - 342 - 395)

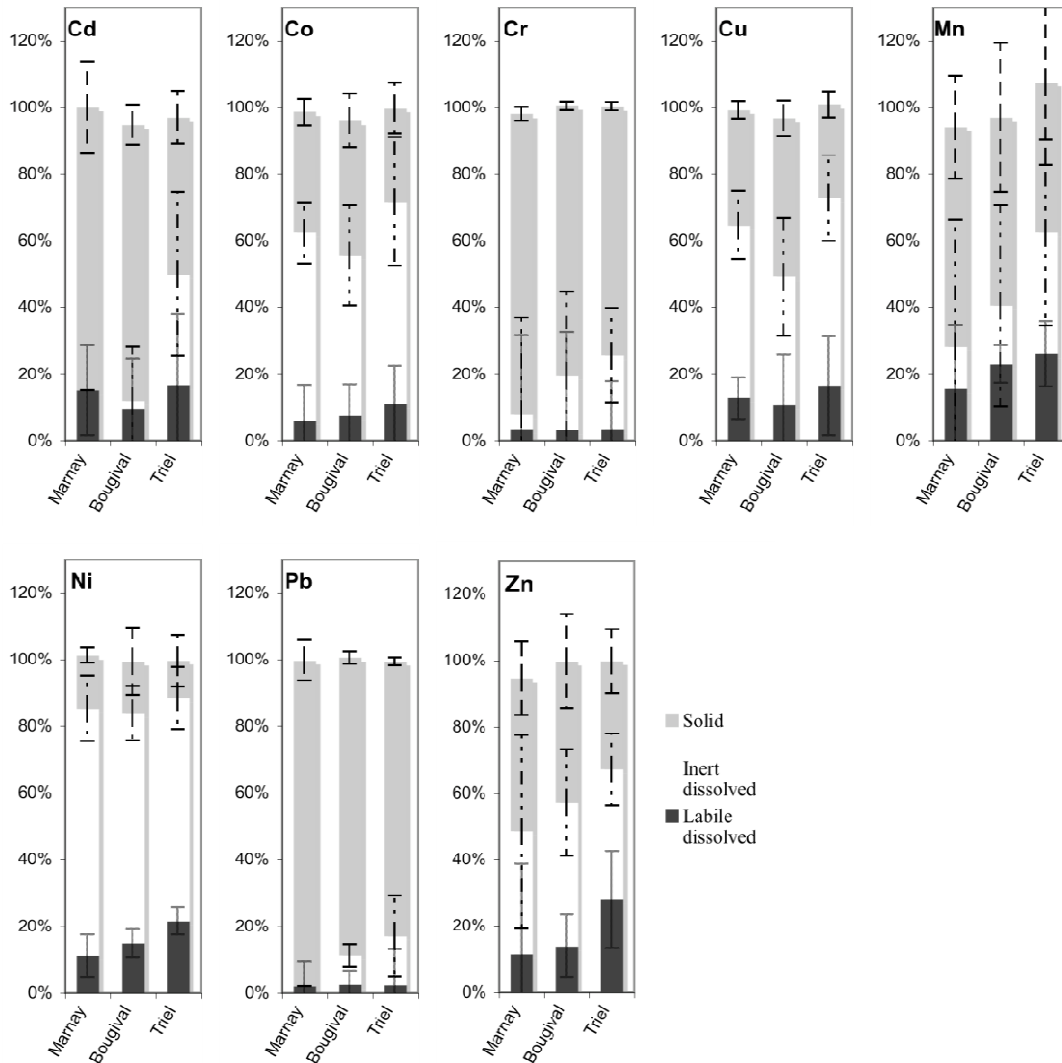


Figure 2: Bar charts represent average proportion of metal in each pool relative to the total of metal in the three defined pools. Individual labile dissolved metals were measured by DGT. Discrete inert dissolved metals were calculated from the average of dissolved metals for two months between the deployment and the collection of DGT subtracted by the labile metal pool. When labile metals were larger than the average dissolved metals, the dissolved metal pool was represented by concentration in the labile pool. Individual solid metals were calculated from the average of dissolved metals for two months between the deployment and the collection of DGT ($n=12$).

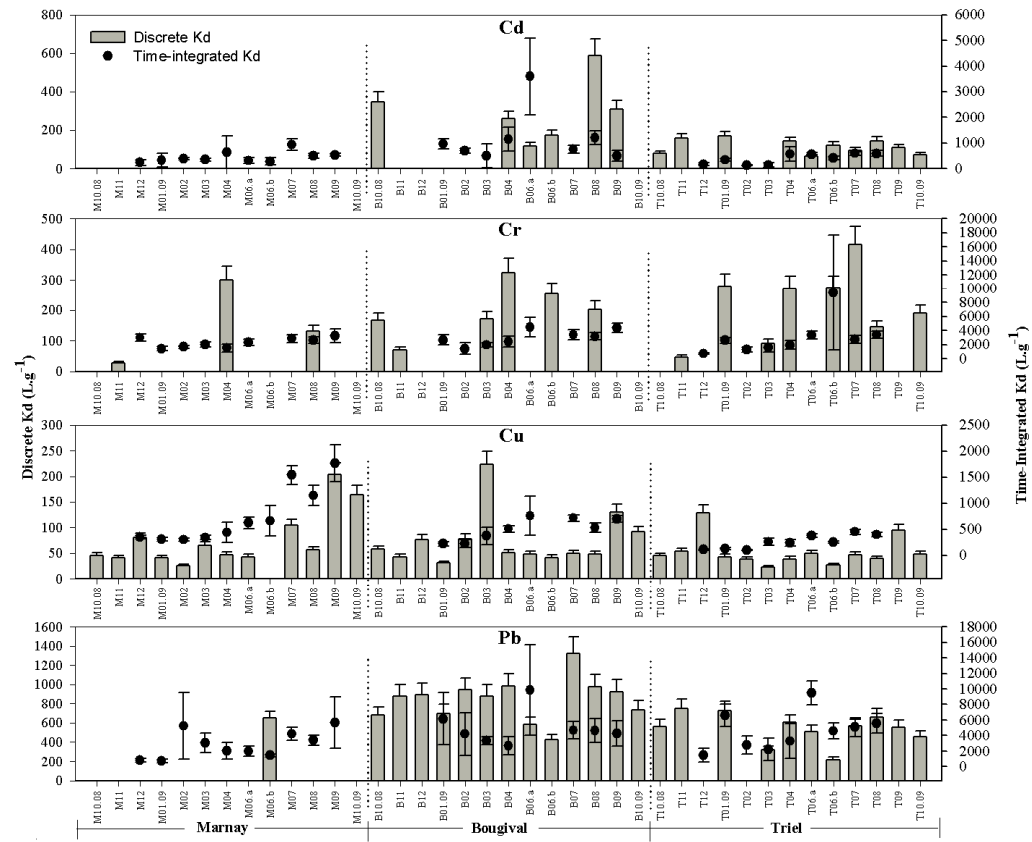
K_D

Average K_d values for a given metal were ranked by their preference to the solid phase, indicated with a high discrete K_d where $Pb > Cr > Mn \sim Cd > Zn > Cu \sim Co > Ni$ (Table 3). When time-integrated K_d is compared, a similar order is observed for most of the metals, except for Co and Cu that went up the rank: $Pb > Cr > Cd > Co > Cu > Zn > Mn > Ni$.

Table 3 Summary of metal partitioning at the three studied sites (in L.g-1), "discrete Kd" is the ratio between concentration of a given metal in the solid fraction to the dissolved fraction (water collected by discrete sampling and filtered at 0.45 μm) and "time-integrated Kd" is the ratio between concentration of a given metal in the settleable suspended particles collected by a sediment trap to the labile fraction measured with the Diffusive Gradient Thin (DGT) films. Indicated values correspond to minimum-maximum values with 1st quartile – median – 3rd quartile in parenthesis (n=13 for "discrete Kd" and n=10 for "Time-integrated Kd). QL: quantification limit.

		Marnay	Bougival	Triel
Cd	"Discrete" Kd	<QL	118 - 590 (196 - 284 - 339)	64 - 169 (83 - 116 - 145)
	"Time-integrated" Kd	236 - 936 (316 - 364 - 522)	497 - 3591 (647 - 859 - 1160)	131 - 595 (168 - 414 - 567)
Cr	"Discrete" Kd	28 - 301 (80 - 132 - 216)	70 - 325 (167 - 186 - 240)	47 - 415 (131 - 230 - 276)
	"Time-integrated" Kd	1422 - 3256 (1687 - 2334 - 2868)	1425 - 4461 (2292 - 2914 - 3628)	712 - 9420 (1565 - 2586 - 3326)
Co	"Discrete" Kd	26 - 204 (43 - 52 - 87)	31 - 224 (48 - 51 - 78)	23 - 129 (39 - 45 - 50)
	"Time-integrated" Kd	302 - 1766 (345 - 532 - 1028)	222 - 760 (336 - 519 - 703)	99 - 452 (132 - 252 - 376)
Cu	"Discrete" Kd	16 - 269 (41 - 52 - 103)	52 - 166 (58 - 102 - 115)	21 - 103 (42 - 52 - 85)
	"Time-integrated" Kd	153 - 277 (174 - 202 - 241)	349 - 831 (473 - 513 - 567)	223 - 469 (242 - 258 - 300)
Mn	"Discrete" Kd	79 - 553 (163 - 189 - 345)	49 - 337 (62 - 133 - 189)	37 - 505 (61 - 93 - 114)
	"Time-integrated" Kd	132 - 1665 (158 - 331 - 973)	74 - 887 (97 - 164 - 249)	49 - 208 (60 - 96 - 128)
Ni	"Discrete" Kd	6 - 73 (13 - 18 - 42)	11 - 43 (13 - 19 - 22)	0 - 30 (11 - 14 - 20)
	"Time-integrated" Kd	97 - 221 (110 - 121 - 147)	75 - 218 (87 - 113 - 128)	41 - 66 (48 - 51 - 55)
Pb	"Discrete" Kd	654 - 654 (654 - 654 - 654)	424 - 1325 (701 - 881 - 945)	217 - 749 (483 - 563 - 634)
	"Time-integrated" Kd	718 - 5644 (1577 - 2543 - 4023)	2698 - 9863 (3992 - 4459 - 5044)	1494 - 9509 (2803 - 4593 - 5593)
Zn	"Discrete" Kd	19 - 577 (53 - 100 - 171)	17 - 165 (46 - 94 - 109)	5 - 360 (29 - 50 - 71)
	"Time-integrated" Kd	100 - 1064 (143 - 158 - 413)	205 - 872 (250 - 291 - 536)	60 - 172 (119 - 144 - 156)

Kd for each month in three sites was also individually compared in order to evaluate spatial evolution (Figure 3). Cd, Cr and Pb were excluded from the comparison because many dissolved concentration values at Marnay were lower than the quantification limit (QL). Discrete Kd at Bougival was found to be significantly higher than at Triel ($p = 0.011$). Nevertheless, no difference was found between discrete metal repartition at Marnay when compared to Bougival and Triel ($p > 0.05$) because Kd variation at Marnay was very high. When the same test was applied to time-integrated Kd, values at Bougival were also found to be significantly higher than at Triel ($p < 0.0001$). Moreover, Kd at Marnay was also found to be significantly higher than Kd at Triel ($p < 0.0002$), which was not observed for discrete Kd values. As time-integrated Kd had lower detection limits, Kd for Cd, Cr and Pb were better defined for Marnay. When this statistical comparison was performed on all elements without excluding Cd, Cr and Pb, similar conclusion was obtained.



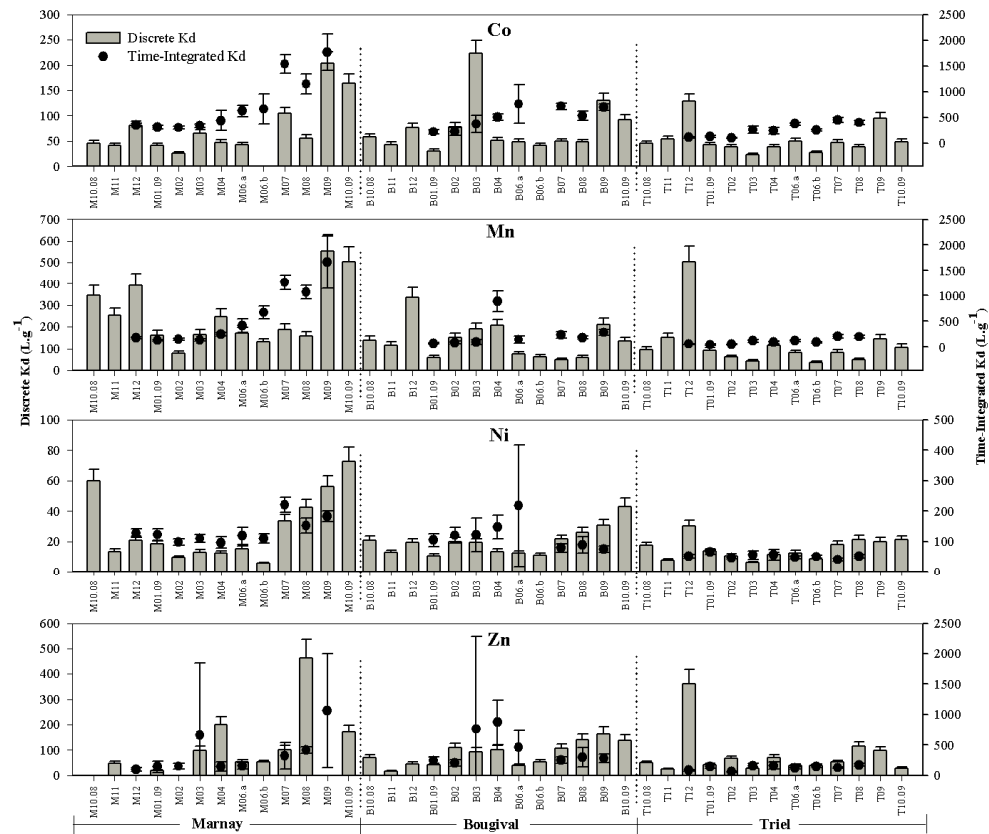


Figure 3: "Discrete" Kd (concentration ratio of metals in SPM ($>0.45 \mu\text{m}$) to dissolved metals ($<0.45 \mu\text{m}$) both collected by discrete sampling) (L/g) are presented as bars, indicating "discrete" Kd from Marnay, Bougival and Triel from left to right from October 2008 to October 2009. "Time - Integrated" Kd (concentration ratio of metals in SPM collected in sediment trap to labile metals measured by DGT) (L/g) are presented as dotted line indicating "time-integrated" Kd from Marnay, Bougival and Triel for each month during sampling from December 2008 – September 2009 (Indicated month corresponding to collection time with deployment time the month before).

Individual Kd values were also compared in order to identify temporal variation during the one-year campaign (Figure 3). In general, temporal variations were higher at Marnay than at Bougival and Triel, except for a few extreme events where Kd values increase dramatically at the two downstream sites. Indeed, there was a high variation of discrete Kd values for five elements, Co, Cu, Mn, Ni and Zn at Marnay that was less visible at Triel: at Marnay, relative standard deviations for discrete Kd were 69%, 84% and 73% for Co, Cu and Ni, respectively whereas at Triel, RSD for discrete Kd were 54%, 44% and 51% and for Co, Cu and Ni, respectively. These higher variations of discrete Kd values at Marnay compared to Triel were also observed for time-integrated Kd. RSD for time-integrated Kd at Marnay were 102%, 23%, 29% for Co, Cu, and Ni, respectively and at Triel, RSD for time-integrated Kd at Triel were 51%, 29%, 12% for Co, Cu, and Ni, respectively. In addition to Co, Cu and Ni, Mn and Zn average values of time-integrated Kd decreased at Triel compared to those at Marnay. This evolution was not observed on average values of discrete Kd for Mn and Zn. Cr, Cd and Pb were not compared because most of their discrete Kd at Marnay was lower than QL.

Observing the different trends on temporal variation of Kd, it was possible to divide the metals in two groups. The first group consisted of Co, Mn, Ni, and Zn with a significantly higher discrete and time-integrated Kd at Marnay than at Triel notably for the summer months going from July to October. The second group included Cd, Cr, Cu and Pb. Due to discrete Kd at Marnay below quantification limits for these metals, observations are made on time-integrated Kd. These metals have relatively comparable Kd values between Marnay and Triel both in low and high flows, with higher Kd at Bougival during certain periods. The only period where Cd displayed discrete Kd at Marnay higher than at Triel was on the month of October 2008. Discrete Kd of Cr multiplied up to six to ten folds in one site between two different periods. Values increased from 27 ± 3.9 , 70 ± 9.9 , and 47 ± 6.7 at Marnay, Bougival and Triel, respectively on the month of November 2008 to 301 ± 42.8 , 325 ± 46.3 and 272 ± 38.8 on April 2009, an increase of 11, 5 and 6 times at Marnay, Bougival and Triel, respectively.

DISCUSSION

Discrete vs time-integrated Kd

The comparison between discrete and time-integrated metal partitioning originates from the need of an environmental indicator representative of the medium and long-term trend in the milieu. As frequency of discrete sampling for metal monitoring is often limited by labor factors, this study was aimed at considering time-integrated metal partitioning as an option. Difficulties faced in measuring Kd for Cd, Pb and Cr due to low dissolved concentrations was overcome by using DGT that concentrates labile metals over a period of time. Passive and time-integrated samplers also hold great potential in the cross-validation of biological accumulation under field condition (Vignati et al., 2009), Bourgeault et al, submitted) . Nevertheless, the disadvantages of the DGT method must

also be kept in mind, including the relatively high deviation using the DGT method that causes integrative K_d values to have large uncertainty levels.

The authors are aware that the two K_d values do not represent the same partitioning, mostly because dissolved metals do not coincide with labile metals. Some inert dissolved metal complexes are not sampled by DGT. Consequently, time-integrated K_d calculated using labile metals measured by DGT would result in higher values K_d than discrete K_d , and the difference is amplified for metals with a low lability in water. This would be the reason why Cu, Zn and Co ranked differently between discrete and time-integrated K_d .

In order to further investigate whether time-integrated K_d could be representative as an environmental indicator, partitioning evolution between sites and along the year was investigated. Statistical tests showed that time-integrated metal partitioning is more effective in differentiating spatial evolution. As physico-chemical parameters between the three sites are significantly different, metal partitioning at the three sites are also expected to vary. Differences in K_d values between Marnay and Triel were not significant when evaluated with discrete values whereas it was considered different when comparing time-integrated values. Regarding temporal variation, Co, Mn and Ni had significantly higher discrete and time-integrated K_d at Marnay than at Triel notably for the summer months going from July to October. On the other hand, Cr and Cu showed relatively stable discrete and time-integrated K_d values between Marnay and Triel both in low and high flows, with possible higher K_d at Bougival during certain periods. This similarity of temporal variation between discrete and time-integrated K_d means that to a certain extent, one month time-integrated K_d is capable of illustrating temporal variation of metal repartition in the water column.

The biggest challenge in performing environmental monitoring is the representativity of samples in respect with spatial and temporal evolution. Collected samples are expected to represent the water column without being over or under-magnified by extreme events or sudden variations. The difference observed when comparing discrete and time-integrated K_d in this study suggest that although time-averaged K_d gives averaged and consequently "buffered" values, it actually enhances sustainable and medium to long-term variation in a given site. Due to the nature of DGT in integrating labile metals, it finally enhances variation between the different sites because it also includes the difference of labile fraction between sites. Although discrete K_d captures instant variations that may be significantly different, variations are irregular depending on sampling period and thus general trend is hardly observable.

Urbanization impacts observed by Time-integrated K_d

Recent studies showed that metal speciation in the solid phase (Priadi et al. 2010) and furthermore metal accumulation in aquatic species (Bourgeault et al. submitted) were modified downstream of the urbanized Greater Paris Region. With this study, change in land use not only affects metal speciation but also partitioning between the solid and the dissolved phase of urban-enriched metals. Previously discussed results demonstrated

difference of temporal variation between upstream and downstream (smaller standard variation for the upstream Marnay data set compared to the Triel data set for Co, Cu and Ni) and higher discrete and time-integrated K_d at Marnay from July to October for Co, Mn, Ni, and Zn. It is possible that urbanization was likely to affect metal partitioning in the Seine River because time-integrated K_d differences between upstream and downstream of the Greater Paris Region were observed for enriched metals above and was not the case for Cr, a non-enriched metal in the Seine River despite the physico-chemical evolution on a given period from Marnay to Triel.

The behavior of metals enriched by anthropogenic activities downstream seems to be controlled by different parameters compared to metal behavior at upstream site. This is seen both through statistical differences between K_d at Marnay and Triel and the higher fluctuating K_d at Marnay compared to Triel. Spearman correlation test (significance level $p < 0.05$) were performed separately between Marnay representing the non-urban site, and Bougival and Triel, representing the anthropogenic sites to further investigate key factors affecting metal behavior in the water column. No significant direct correlation between K_d and the measured physico-chemical parameters was found. This would be due to differences in governing processes and response level between metal concentration in the solid and the dissolved fraction. While no significant correlation was either found between solid metals and physico-chemical parameters, dissolved metals appeared to be correlated to some water parameters. Higher temporal variation in Marnay compared to Triel would likely be due to dissolved metal concentration at Marnay being more correlated with flow-related parameters which can fluctuate significantly. Upstream, correlations of some dissolved metals with conductivity were relatively high (Cu $r^2 = 0.657$; Mn $r^2 = 0.699$; Ni $r^2 = 0.804$) while being negatively correlated with discharge (Cu $r^2 = -0.736$; Mn $r^2 = -0.813$; Zn $r^2 = -0.688$). Downstream, dissolved metal concentrations were less correlated with fluctuating flow-related parameters and were more correlated with redox-related parameters such as DOC (Co $r^2 = 0.655$; Cu $r^2 = 0.469$; Mn $r^2 = 0.507$; Ni $r^2 = 0.574$) and temperature (Cd $r^2 = 0.531$; Cu $r^2 = 0.523$; Mn $r^2 = 0.602$; Pb $r^2 = 0.724$) while displaying negative correlation with pH (Cd $r^2 = -0.608$; Co $r^2 = -0.552$; Cu $r^2 = -0.805$; Mn $r^2 = -0.697$; Pb $r^2 = -0.501$). Higher temporal fluctuations of K_d at Marnay compared to Triel may be explained by correlation of metal concentrations with these different water parameters. As discharge varies considerably compared to DOC, temperature and pH, metal concentration at Marnay would also vary in a higher extent than at Bougival and Triel. Downstream, dissolved metal concentrations seemed more affected with sorption process. Their concentrations are more correlated with DOC, temperature and pH than at Marnay. These three parameters are known to control adsorption and desorption reactions on surfaces. Temperature and pH are known to control point zero charge (PZC) of adsorption on many mineral surfaces (Dong et al., 2007; Li et al., 2009) and DOC is known to form complexes with available dissolved metals (Pernet-Coudrier et al., 2008). Adsorption to solid phase may likely be an important process controlling fluctuation of metal partitioning and mobility in the water column downstream.

CONCLUSION

Comparison of discrete and time-integrated metal partitioning in the water column of the Seine River demonstrated the capability of time-integrated K_d to represent spatial and temporal variation of metal variation trend. Although it is recognized that time-integrated K_d does not measure the exact same pool as discrete K_d , time-integrated K_d could be useful to study medium and long-term trend of metal partitioning in river systems related to urbanization, reducing the labor costs needed to obtain representative discrete metal sampling. Further investigation of time-integrated K_d should be performed on other watersheds to study the effectiveness of this method on other water systems.

Acknowledgements - The authors would like to thank Aurélie Germain, Cécile Mirandebret, Emmanuelle Uher and Stéphanie Pacini for sampling and analytical assistance, Eric Robin for XRF analytical assistance, Eric Douville and Louise Bordier for assistance in ICP-MS measurements, Caroline Gauthier and Christine Hatté for particulate carbon analysis, the Marnay botanical garden and SIAAP for giving access to sampling sites, Vincent Rocher and the SIAAP team and William Thomas and the SNS team for data. This project was financially supported by INSU (EC2CO) for the MEDISIS project and the French research program PIREN-Seine. Cindy Priadi recognizes the French foreign affairs ministry and CNRS and Adeline Bourgeault recognizes the Ile de France Region for scholarship. This is LSCE contribution number

SUPPORTING INFORMATION

Date	[SPM] (mg/L)	Flowrate (m ³ /s)	Conductivity (μS/cm)	dissolved oxygen (mg/L)	POC (mg/L)	DOC (mg/L)
Marnay						
22.10.08	4.0	59	395	nm	0.42	2.68
25.11.08	9.5	49	474	nm	0.61	1.83
16.12.08	33.4	73	495	nm	1.90	1.94
19.01.09	20.2	37	485	nm	1.20	1.62
24.02.09	19.4	89	nm	nm	0.88	1.95
24.03.09	10.8	50	509	nm	0.56	1.75
22.04.09	20.4	34	516	nm	0.90	2.57
09.06.09	7.0	27	490	nm	0.45	2.16
22.06.09	5.9	25	526	nm	0.05	2.05
22.07.09	11.4	54	402	nm	0.42	2.23
19.08.09	4.4	47	364	nm	0.29	1.73
24.09.09	5.7	52	268	nm	1.23	2.44
22.10.09	4.7	50	350	nm	0.34	2.38
Bougival						
22.10.08	10.9	187	446	9.5	0.88	2.94
25.11.08	11.1	221	490	10.5	0.94	2.79
16.12.08	44.1	295	501	12.2	1.06	3.51
19.01.09	21.2	215	557	12.8	3.92	2.77
24.02.09	15.7	324	nm	11.8	1.03	2.77
24.03.09	9.3	212	570	11.3	0.89	2.69
22.04.09	7.7	184	611	8.9	0.66	3.00
09.06.09	16.8	167	606	6.3	1.61	4.34
22.06.09	6.4	116	609	5.1	0.73	3.21
22.07.09	10.9	148	550	6.8	0.55	3.25
19.08.09	7.9	97	527	6.8	0.69	3.73
24.09.09	9.7	92	474	7.4	0.38	2.56
22.10.09	8.5	112	498	8.0	0.69	2.64
Triel						
22.10.08	7.8	334	538	7.5	0.04	4.16
25.11.08	4.1	391	506	9.1	0.72	3.87
16.12.08	14.1	495	513	12.5	0.93	4.14
19.01.09	14.3	383	612	12.1	2.47	3.97
24.02.09	21.9	550	nm	12.7	1.46	3.42
24.03.09	10.2	384	619	10.0	0.97	3.72
22.04.09	9.8	340	655	8.0	0.88	3.77
09.06.09	11.9	375	668	6.0	1.16	5.45
22.06.09	6.9	228	668	6.0	0.67	3.63
22.07.09	11.6	209	655	5.8	1.08	3.96
19.08.09	9.7	211	604	6.1	0.73	3.54
24.09.09	8.8	198	619	5.9	0.50	3.84
22.10.09	4.8	225	625	6.1	0.89	3.93

nm= non measured

<QL = lower than quantification limit

Date	Temperature (°C)	Chlorophyll (µg/L)	pH	Alcalinity (mg/L)	Sodium (mg/L)	Ammonium (mg/L)
Marnay						
22.10.08	11.20	0.50	8.14	226	20.3	0.6
25.11.08	6.50	0.70	8.28	287	7.9	<QL
16.12.08	5.60	nm	8.30	287	5.8	<QL
19.01.09	6.00	1.40	8.32	262	9.0	<QL
24.02.09	7.20	2.00	8.19	262	2.5	0.3
24.03.09	8.00	3.50	8.15	250	7.5	<QL
22.04.09	14.90	2.10	8.14	244	12.1	1.4
09.06.09	16.40	0.70	8.18	226	7.7	<QL
22.06.09	19.00	0.60	8.23	232	10.8	<QL
22.07.09	21.70	nm	8.06	195	6.2	<QL
19.08.09	23.00	1.24	8.30	171	5.7	<QL
24.09.09	16.40	1.02	8.07	153	9.0	<QL
22.10.09	nm	nm	8.13	nm	6.4	<QL
Bougival						
22.10.08	14.40	1.10	7.88	226	6.7	<QL
25.11.08	9.03	0.40	8.07	268	13.6	0.4
16.12.08	5.10	nm	8.24	281	9.9	0.1
19.01.09	4.50	9.50	7.76	256	16.9	<QL
24.02.09	7.00	3.30	8.11	268	8.6	0.1
24.03.09	10.40	6.60	8.09	250	12.6	<QL
22.04.09	16.00	3.70	7.91	250	14.5	0.8
09.06.09	19.80	2.10	7.20	238	16.1	2.9
22.06.09	20.70	3.20	7.71	232	16.3	0.5
22.07.09	22.80	11.36	7.77	220	14.9	<QL
19.08.09	20.30	15.05	7.93	182	16.1	<QL
24.09.09	19.50	5.64	7.71	207	17.7	<QL
22.10.09	nm	nm	8.10	nm	14.9	<QL
Triel						
22.10.08	13.90	0.90	7.59	250	13.6	0.3
25.11.08	8.90	0.30	7.83	281	16.1	1.3
16.12.08	5.20	nm	8.01	281	10.9	0.5
19.01.09	4.90	10.00	7.10	262	22.7	<QL
24.02.09	6.90	2.10	7.93	268	10.4	0.5
24.03.09	10.20	5.10	7.93	256	15.3	<QL
22.04.09	15.40	2.10	7.73	256	17.6	1.8
09.06.09	19.00	2.00	7.55	250	20.6	4.3
22.06.09	20.10	2.50	7.61	238	19.5	0.4
22.07.09	22.00	12.64	7.58	232	22.2	0.2
19.08.09	19.55	16.38	7.85	220	20.0	<QL
24.09.09	19.20	5.82	7.58	189	27.5	<QL
22.10.09	14.40	nm	7.81	nm	23.3	<QL

nm= non measured

<QL = lower than quantification limit

Date	Potassium (mg/L)	Magnesium (mg/L)	Calcium (mg/L)	Chloride (mg/L)	Nitrite (mg/L)	Nitrate (mg/L)	Sulfate (mg/L)
Marnay							
22.10.08	6.3	6.8	88.3	13.9	<QL	14.8	15.9
25.11.08	<QL	4.7	98.4	14.3	<QL	20.4	17.3
16.12.08	<QL	3.3	105.3	12.7	<QL	24.8	17.6
19.01.09	1.9	3.9	93.2	18.6	<QL	26.0	18.8
24.02.09	<QL	0.5	88.1	15.1	<QL	24.9	18.5
24.03.09	1.6	4.0	88.9	19.6	<QL	25.7	20.0
22.04.09	6.0	4.3	93.2	27.2	<QL	25.9	22.4
09.06.09	2.1	3.6	89.2	21.1	<QL	16.1	16.8
22.06.09	2.4	4.0	87.8	23.3	<QL	18.0	19.0
22.07.09	2.0	7.6	72.4	12.9	<QL	11.3	14.3
19.08.09	1.9	8.9	64.8	12.0	<QL	8.8	14.2
24.09.09	<QL	1.3	58.0	11.4	<QL	7.8	13.7
22.10.09	<QL	1.4	59.6	12.7	<QL	7.8	14.3
Bougival							
22.10.08	2.2	3.4	77.3	23.9	<QL	19.2	31.1
25.11.08	<QL	6.7	94.7	19.1	<QL	19.2	29.4
16.12.08	<QL	0.6	99.6	17.4	<QL	25.0	24.4
19.01.09	3.4	6.4	100.3	30.1	<QL	26.1	36.1
24.02.09	2.8	6.2	97.7	22.7	<QL	25.5	30.3
24.03.09	2.9	6.4	96.8	26.2	<QL	26.7	36.4
22.04.09	3.4	7.8	97.6	30.7	<QL	24.1	42.6
09.06.09	4.6	6.7	95.5	34.2	<QL	24.4	44.6
22.06.09	4.4	7.1	91.4	32.3	<QL	21.3	43.1
22.07.09	4.3	10.3	85.0	29.2	<QL	15.1	38.4
19.08.09	4.0	7.0	79.8	29.0	<QL	14.5	38.1
24.09.09	0.4	3.2	72.9	25.5	<QL	13.2	33.4
22.10.09	0.7	3.3	74.1	26.6	<QL	13.9	35.0
Triel							
22.10.08	3.9	5.4	77.5	34.7	1.2	27.9	43.9
25.11.08	<QL	7.9	98.7	<QL	26.4	20.2	<QL
16.12.08	<QL	0.7	98.6	19.9	<QL	28.5	28.0
19.01.09	4.3	7.3	102.4	41.3	0.8	28.2	44.7
24.02.09	3.2	7.0	108.8	25.7	0.8	28.3	35.4
24.03.09	3.7	7.3	101.8	31.9	<QL	35.2	42.8
22.04.09	4.0	8.1	101.8	35.5	0.9	31.9	46.8
09.06.09	5.7	7.9	101.4	41.9	<QL	33.7	51.5
22.06.09	5.3	8.6	95.5	38.3	<QL	29.5	49.8
22.07.09	6.0	8.6	94.1	41.1	<QL	31.3	50.2
19.08.09	5.4	8.6	89.1	35.6	<QL	22.1	46.1
24.09.09	1.5	5.8	84.6	40.3	2.2	28.7	47.8
22.10.09	9.2	5.5	86.3	41.6	3.2	25.3	49.4

nm= non measured

<QL = lower than quantification limit

Date	Cd			
	dissolved <0.45 μm ($\mu\text{g}/\text{L}^{-1}$)	solid >0.45 μm ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$)	labile (DGT) ($\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)	sediment trap ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$)
Marnay				
22.10.08	<QL	0.537	nm	nm
25.11.08	<QL	0.432	0.0007 \pm 0.0002	nm
16.12.08	<QL	0.493	0.0014 \pm 0.0006	0.336
19.01.09	<QL	0.677	0.0010 \pm 0.0007	0.311
24.02.09	<QL	0.433	0.0012 \pm 0.0001	0.444
24.03.09	<QL	1.046	0.0009 \pm 0.0001	0.294
22.04.09	<QL	2.303	0.0004 \pm 0.0004	0.269
09.06.09	<QL	nm	0.0009 \pm 0.0003	0.273
22.06.09	<QL	4.420	0.0011 \pm 0.0005	0.297
22.07.09	<QL	0.048	0.0004 \pm 0.0001	0.339
19.08.09	<QL	1.643	0.0006 \pm 0.0001	0.307
24.09.09	<QL	0.385	0.0006 \pm 0.0000	0.320
22.10.09	<QL	0.846	0.0017 \pm 0.0003	nm
Bougival				
22.10.08	0.0116	4.050	nm	nm
25.11.08	<QL	1.874	0.0041 \pm 0.0006	nm
16.12.08	<QL	0.770	0.0051 \pm 0.0009	nm
19.01.09	<QL	1.691	0.0021 \pm 0.0003	2.017
24.02.09	<QL	1.675	0.0022 \pm 0.0002	1.528
24.03.09	<QL	2.878	0.0031 \pm 0.0028	1.562
22.04.09	0.0152	3.931	0.0016 \pm 0.0006	1.790
09.06.09	0.0131	1.546	0.0022 \pm 0.0008	8.065
22.06.09	0.0101	2.632	0.0041 \pm 0.0028	nm
22.07.09	<QL	20.53	0.0054 \pm 0.0009	4.092
19.08.09	0.0136	8.043	0.0028 \pm 0.0005	3.401
24.09.09	0.0136	4.221	0.0066 \pm 0.0024	3.292
22.10.09	<QL	2.473	0.0066 \pm 0.0014	nm
Triel				
22.10.08	0.0151	1.188	nm	nm
25.11.08	0.0116	1.832	0.0022 \pm 0.0010	nm
16.12.08	<QL	2.152	0.0051 \pm 0.0017	0.853
19.01.09	0.0131	2.218	0.0036 \pm 0.0005	1.233
24.02.09	<QL	0.657	0.0027 \pm 0.0004	0.354
24.03.09	<QL	0.441	0.0050 \pm 0.0026	0.724
22.04.09	0.0136	1.950	0.0021 \pm 0.0009	1.175
09.06.09	0.0131	0.837	0.0032 \pm 0.0003	1.778
22.06.09	0.0187	2.287	0.0045 \pm 0.0005	1.865
22.07.09	0.0146	1.409	0.0051 \pm 0.0004	3.029
19.08.09	0.0141	2.055	0.0043 \pm 0.0006	2.546
24.09.09	0.0126	1.378	0.0050 \pm 0.0007	nm
22.10.09	0.0121	0.878	0.0050 \pm 0.0009	nm

nm= non measured

<QL = lower than quantification limit

Date	Cr			
	dissolved <0.45 μm ($\mu\text{g}/\text{L}^{-1}$)	solid >0.45 μm ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$)	labile (DGT) ($\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)	sediment trap ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$)
Marnay				
22.10.08	<QL	7.7	nm	nm
25.11.08	1.09	30.0	0.0184 \pm 0.0025	nm
16.12.08	<QL	68.7	0.0180 \pm 0.0021	53.7
19.01.09	<QL	41.9	0.0352 \pm 0.0062	50.1
24.02.09	<QL	14.9	0.0250 \pm 0.0020	42.1
24.03.09	<QL	57.2	0.0249 \pm 0.0038	50.0
22.04.09	0.22	64.8	0.0333 \pm 0.0110	50.8
09.06.09	<QL	50.2	0.0214 \pm 0.0033	49.9
22.06.09	<QL	64.8	<QL \pm 0.0000	50.2
22.07.09	<QL	46.0	0.0178 \pm 0.0027	51.2
19.08.09	0.41	53.6	0.0196 \pm 0.0026	51.4
24.09.09	<QL	65.3	0.0167 \pm 0.0041	54.2
22.10.09	nm	101.7	0.0196 \pm 0.0078	nm
Bougival				
22.10.08	0.54	88.9	nm	nm
25.11.08	1.04	73.0	0.0574 \pm 0.0248	nm
16.12.08	<QL	65.2	0.0926 \pm 0.0131	nm
19.01.09	<QL	46.3	0.0270 \pm 0.0060	71.8
24.02.09	<QL	84.2	0.0583 \pm 0.0304	83.0
24.03.09	0.60	102.0	0.0353 \pm 0.0033	69.2
22.04.09	0.28	90.6	0.0291 \pm 0.0081	70.0
09.06.09	<QL	75.5	0.0244 \pm 0.0065	108.9
22.06.09	0.25	77.5	0.0024 \pm 0.0035	nm
22.07.09	<QL	82.0	0.0323 \pm 0.0054	109.3
19.08.09	0.51	102.4	0.0277 \pm 0.0033	87.8
24.09.09	<QL	84.7	0.0211 \pm 0.0024	92.2
22.10.09	<QL	85.4	0.0246 \pm 0.0108	nm
Triel				
22.10.08	<QL	94.9	nm	nm
25.11.08	1.24	58.1	0.0314 \pm 0.0112	nm
16.12.08	<QL	121.9	0.0857 \pm 0.0081	61.0
19.01.09	0.23	65.6	0.0284 \pm 0.0035	73.5
24.02.09	<QL	46.6	0.0452 \pm 0.0111	56.4
24.03.09	0.39	35.9	0.0415 \pm 0.0144	65.0
22.04.09	0.32	88.3	0.0372 \pm 0.0101	71.7
09.06.09	<QL	69.1	0.0243 \pm 0.0031	80.9
22.06.09	0.21	58.1	0.0083 \pm 0.0069	78.3
22.07.09	0.21	88.1	0.0314 \pm 0.0047	86.0
19.08.09	0.51	74.2	0.0256 \pm 0.0026	86.7
24.09.09	<QL	77.3	0.0319 \pm 0.0165	nm
22.10.09	0.32	60.5	0.0252 \pm 0.0039	nm

nm= non measured

<QL = lower than quantification limit

Date	Co			
	dissolved <0.45 μm ($\mu\text{g/L}^{-1}$)	solid >0.45 μm ($\mu\text{g.g}^{-1}$)	labile (DGT) ($\mu\text{g.L}^{-1}$)	sediment trap ($\mu\text{g.g}^{-1}$)
Marnay				
22.10.08	0.16	7.39	nm	nm
25.11.08	0.18	7.61	0.0132 \pm 0.0013	nm
16.12.08	0.11	8.62	0.0203 \pm 0.0016	7.13
19.01.09	0.16	6.49	0.0218 \pm 0.0021	6.78
24.02.09	0.10	2.48	0.0191 \pm 0.0013	5.76
24.03.09	0.12	7.59	0.0193 \pm 0.0019	6.63
22.04.09	0.18	8.52	0.0145 \pm 0.0062	6.39
09.06.09	0.13	5.69	0.0099 \pm 0.0016	6.21
22.06.09	0.14	9.2	0.0107 \pm 0.0046	7.11
22.07.09	0.06	6.55	0.0044 \pm 0.0004	6.73
19.08.09	0.09	5.12	0.0057 \pm 0.0009	6.60
24.09.09	0.04	8.85	0.0039 \pm 0.0007	6.90
22.10.09	0.05	8.48	0.0120 \pm 0.0036	nm
Bougival				
22.10.08	0.22	12.70	nm	nm
25.11.08	0.25	10.75	0.0416 \pm 0.0088	nm
16.12.08	0.15	11.23	0.0509 \pm 0.0079	nm
19.01.09	0.21	6.42	0.0416 \pm 0.0079	9.25
24.02.09	0.17	13.29	0.0503 \pm 0.0154	11.37
24.03.09	0.17	38.40	0.0232 \pm 0.0100	8.64
22.04.09	0.25	12.63	0.0162 \pm 0.0019	8.25
09.06.09	0.24	11.51	0.0147 \pm 0.0071	11.14
22.06.09	0.22	12.59	0.0319 \pm 0.0057	nm
22.07.09	0.17	8.29	0.0164 \pm 0.0012	11.81
19.08.09	0.23	11.05	0.0181 \pm 0.0029	9.61
24.09.09	0.13	16.35	0.0143 \pm 0.0010	9.97
22.10.09	0.13	11.69	0.0309 \pm 0.0042	nm
Triel				
22.10.08	0.39	17.55	nm	nm
25.11.08	0.32	17.22	0.0347 \pm 0.0137	nm
16.12.08	0.20	25.22	0.0729 \pm 0.0080	8.10
19.01.09	0.32	13.85	0.0727 \pm 0.0118	9.63
24.02.09	0.21	8.07	0.0780 \pm 0.0062	7.69
24.03.09	0.26	5.95	0.0464 \pm 0.0113	12.09
22.04.09	0.33	12.82	0.0376 \pm 0.0091	9.00
09.06.09	0.31	15.37	0.0275 \pm 0.0020	10.33
22.06.09	0.30	7.98	0.0435 \pm 0.0031	10.96
22.07.09	0.38	17.99	0.0288 \pm 0.0026	13.04
19.08.09	0.28	10.92	0.0294 \pm 0.0027	11.76
24.09.09	0.21	20.30	0.0287 \pm 0.0053	nm
22.10.09	0.29	14.01	0.0567 \pm 0.0073	nm

nm= non measured

<QL = lower than quantification limit

Date	Cu			
	dissolved <0.45 μm ($\mu\text{g}/\text{L}^{-1}$)	solid >0.45 μm ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$)	labile (DGT) ($\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)	sediment trap ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$)
Marnay				
22.10.08	0.36	95.5	nm	nm
25.11.08	0.36	18.7	0.0615 \pm 0.0117	nm
16.12.08	0.34	18.8	0.0751 \pm 0.0075	18.1
19.01.09	0.37	25.0	0.0655 \pm 0.0063	17.5
24.02.09	0.35	5.7	0.0748 \pm 0.0077	13.5
24.03.09	0.38	19.4	0.0736 \pm 0.0059	16.4
22.04.09	0.57	21.8	0.0970 \pm 0.0096	14.9
09.06.09	0.60	14.0	0.0907 \pm 0.0197	15.7
22.06.09	0.67	69.2	0.0852 \pm 0.0086	15.2
22.07.09	0.46	18.8	0.0581 \pm 0.0098	16.1
19.08.09	0.42	18.2	0.1038 \pm 0.0123	16.0
24.09.09	0.27	28.0	0.0730 \pm 0.0055	17.5
22.10.09	0.29	34.5	0.0569 \pm 0.0443	nm
Bougival				
22.10.08	1.04	119.6	nm	nm
25.11.08	1.02	103.9	0.2663 \pm 0.0435	nm
16.12.08	0.89	45.9	0.2590 \pm 0.0469	nm
19.01.09	1.27	149.6	0.1716 \pm 0.0125	93.6
24.02.09	0.77	44.7	0.2181 \pm 0.0760	100.0
24.03.09	0.96	63.5	0.1408 \pm 0.0568	80.0
22.04.09	1.22	69.6	0.1649 \pm 0.0290	78.8
09.06.09	1.76	102.4	0.1867 \pm 0.0696	155.0
22.06.09	1.27	103.3	0.2981 \pm 0.0485	nm
22.07.09	1.12	116.1	0.3864 \pm 0.0328	185.3
19.08.09	1.42	154.1	0.2532 \pm 0.0481	143.4
24.09.09	1.28	146.6	0.4257 \pm 0.0726	148.4
22.10.09	1.02	169.3	0.4811 \pm 0.0683	nm
Triel				
22.10.08	1.38	72.2	nm	nm
25.11.08	1.22	79.0	0.1511 \pm 0.0640	nm
16.12.08	0.93	93.6	0.2511 \pm	56.0
19.01.09	1.52	130.3	0.1743 \pm 0.0139	81.8
24.02.09	0.80	24.7	0.2095 \pm 0.0158	54.1
24.03.09	1.03	21.1	0.2167 \pm 0.0545	53.4
22.04.09	1.21	56.2	0.2406 \pm 0.0707	58.2
09.06.09	1.39	58.7	0.2798 \pm 0.0229	83.9
22.06.09	1.56	54.1	0.3004 \pm 0.0216	91.1
22.07.09	1.56	66.5	0.3878 \pm 0.0299	88.9
19.08.09	1.45	84.3	0.3336 \pm 0.0373	96.8
24.09.09	1.12	95.5	0.3628 \pm 0.0444	nm
22.10.09	1.07	111.1	0.3074 \pm 0.0226	nm

nm= non measured

<QL = lower than quantification limit

Date	Mn			
	dissolved <0.45 μm ($\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)	solid >0.45 μm ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$)	labile (DGT) ($\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)	sediment trap ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$)
Marnay				
22.10.08	2.20	761	nm	nm
25.11.08	2.60	658	1.8876 \pm 0.1829	nm
16.12.08	1.51	593	2.3995 \pm 0.1779	441
19.01.09	2.73	444	3.2134 \pm 0.2852	425
24.02.09	1.64	130	2.2352 \pm 0.1809	334
24.03.09	2.55	417	2.2688 \pm 0.2095	311
22.04.09	3.19	793	1.1308 \pm 0.1065	282
09.06.09	2.45	422	0.6496 \pm 0.1857	268
22.06.09	3.01	394	0.7869 \pm 0.1181	527
22.07.09	1.82	343	0.3611 \pm 0.0277	456
19.08.09	2.43	379	0.4063 \pm 0.0335	436
24.09.09	1.44	798	0.2789 \pm 0.0755	464
22.10.09	1.81	910	1.1428 \pm 0.8756	nm
Bougival				
22.10.08	7.01	972	nm	nm
25.11.08	8.01	917	4.9943 \pm 1.1708	nm
16.12.08	3.07	1035	8.3243 \pm 1.0681	nm
19.01.09	8.68	514	7.1816 \pm 1.3119	532
24.02.09	6.97	1057	7.8177 \pm 2.2111	679
24.03.09	6.77	1282	3.7178 \pm 1.7581	372
22.04.09	7.40	1528	2.0570 \pm 0.3913	1825
09.06.09	10.75	817	1.9484 \pm 0.8829	281
22.06.09	17.39	1450	8.3785 \pm 1.2276	nm
22.07.09	13.46	665	2.6621 \pm 0.5720	633
19.08.09	13.13	797	3.4854 \pm 0.3507	642
24.09.09	8.30	1762	2.2697 \pm 0.3271	644
22.10.09	8.89	1186	6.5533 \pm 0.8238	nm
Triel				
22.10.08	17.67	1678	nm	nm
25.11.08	12.72	1911	3.4317 \pm 1.4363	nm
16.12.08	4.37	2209	9.8236 \pm 1.0832	594
19.01.09	13.18	1224	10.2302 \pm 1.7280	502
24.02.09	9.37	570	9.9251 \pm 0.7406	513
24.03.09	11.18	484	6.5585 \pm 1.4618	780
22.04.09	11.62	1329	4.5635 \pm 1.1724	437
09.06.09	17.59	1428	3.2379 \pm 0.2842	414
22.06.09	20.17	752	9.3822 \pm 0.6874	872
22.07.09	27.63	2314	4.6341 \pm 0.6337	966
19.08.09	22.06	1097	4.7103 \pm 0.3726	948
24.09.09	15.38	2208	4.4451 \pm 0.5543	nm
22.10.09	15.78	1667	9.6470 \pm 1.6696	nm

nm= non measured

<QL = lower than quantification limit

Date	Ni			
	dissolved <0.45 μm ($\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)	solid >0.45 μm ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$)	labile (DGT) ($\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)	sediment trap ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$)
Marnay				
22.10.08	1.39	83.5	nm	nm
25.11.08	1.77	23.7	0.1537 \pm 0.0155	nm
16.12.08	1.53	32.0	0.2049 \pm 0.0171	26.2
19.01.09	1.43	26.4	0.2021 \pm 0.0274	24.8
24.02.09	1.45	13.8	0.2088 \pm 0.0154	20.5
24.03.09	1.54	19.9	0.1949 \pm 0.0178	21.6
22.04.09	1.93	23.8	0.2120 \pm 0.0356	20.5
09.06.09	1.68	25.4	0.1730 \pm 0.0370	20.6
22.06.09	1.59	9.1	0.1959 \pm 0.0227	21.6
22.07.09	0.61	20.5	0.0954 \pm 0.0082	21.1
19.08.09	0.80	33.8	0.1350 \pm 0.0184	20.6
24.09.09	0.51	28.5	0.1164 \pm 0.0076	21.4
22.10.09	0.48	35.2	0.1662 \pm 0.0444	nm
Bougival				
22.10.08	1.76	36.7	nm	nm
25.11.08	2.15	27.3	0.3686 \pm 0.0287	nm
16.12.08	1.66	32.1	0.4456 \pm 0.0353	nm
19.01.09	1.95	20.9	0.2971 \pm 0.0523	31.2
24.02.09	1.79	36.0	0.3215 \pm 0.0582	38.8
24.03.09	1.76	33.9	0.2284 \pm 0.0982	27.8
22.04.09	2.25	30.3	0.1769 \pm 0.0411	26.2
09.06.09	2.12	26.3	0.1846 \pm 0.1641	40.2
22.06.09	1.98	27.3	0.3244 \pm 0.0534	nm
22.07.09	1.21	26.2	0.4699 \pm 0.0656	37.0
19.08.09	1.48	38.5	0.3210 \pm 0.0857	28.7
24.09.09	1.07	32.7	0.4194 \pm 0.0478	31.4
22.10.09	0.94	40.5	0.4583 \pm 0.0420	nm
Triel				
22.10.08	2.74	47.8	nm	nm
25.11.08	2.43	18.4	0.1716 \pm 0.1870	nm
16.12.08	1.96	59.5	0.5448 \pm 0.0412	28.0
19.01.09	2.21	30.2	0.4651 \pm 0.0440	30.5
24.02.09	2.04	21.5	0.4506 \pm 0.0308	21.2
24.03.09	2.11	12.9	0.4265 \pm 0.0927	23.6
22.04.09	2.59	30.1	0.4431 \pm 0.1258	25.2
09.06.09	2.34	29.3	0.5783 \pm 0.0451	27.7
22.06.09	2.36	20.6	0.5425 \pm 0.0446	27.2
22.07.09	2.17	39.5	0.7516 \pm 0.0564	30.7
19.08.09	1.79	38.5	0.5643 \pm 0.0534	29.3
24.09.09	1.49	30.0	0.6810 \pm 0.0707	nm
22.10.09	1.96	41.5	0.7961 \pm 0.0550	nm

nm= non measured

<QL = lower than quantification limit

Date	Zn			
	dissolved <0.45 μm ($\mu\text{g}/\text{L}^{-1}$)	solid >0.45 μm ($\mu\text{g}/\text{g}^{-1}$)	labile (DGT) ($\mu\text{g}/\text{L}^{-1}$)	sediment trap ($\mu\text{g}/\text{g}^{-1}$)
Marnay				
22.10.08	0.00	45	nm	nm
25.11.08	2.67	128	0.4443 \pm 0.0794	nm
16.12.08	0.00	171	1.4880 \pm 0.3041	149
19.01.09	9.77	188	0.9879 \pm 0.6036	141
24.02.09	0.00	71	0.8363 \pm 0.2054	126
24.03.09	3.94	395	0.1593 \pm 0.2726	106
22.04.09	2.26	451	0.7561 \pm 0.3556	108
09.06.09	2.61	140	0.6933 \pm 0.1770	109
22.06.09	2.53	134	0.0000 \pm 0.0000	125
22.07.09	1.82	185	0.3653 \pm 0.2242	117
19.08.09	1.24	713	0.2743 \pm 0.0185	113
24.09.09	0.00	219	0.1149 \pm 0.0942	122
22.10.09	2.43	417	0.5778 \pm 0.1292	nm
Bougival				
22.10.08	6.68	465	nm	nm
25.11.08	24.11	410	2.6357 \pm 0.3660	nm
16.12.08	7.35	336	3.1303 \pm 0.4687	nm
19.01.09	15.05	642	1.7871 \pm 0.3823	439
24.02.09	4.39	480	2.4681 \pm 0.5169	506
24.03.09	6.02	567	0.4016 \pm 0.7782	307
22.04.09	6.28	645	0.3518 \pm 0.1285	307
09.06.09	9.76	380	1.5101 \pm 0.8240	694
22.06.09	6.22	409	2.0656 \pm 0.3286	nm
22.07.09	3.55	383	2.4936 \pm 0.3778	629
19.08.09	4.77	671	1.6872 \pm 0.8048	505
24.09.09	3.28	542	1.8259 \pm 0.3294	515
22.10.09	3.65	508	2.3360 \pm 0.3841	nm
Triel				
22.10.08	7.08	351	nm	nm
25.11.08	14.58	363	1.4578 \pm 0.7045	nm
16.12.08	3.90	1402	3.5673 \pm 0.3334	299
19.01.09	14.60	608	2.7852 \pm 0.4558	408
24.02.09	3.47	232	3.7381 \pm 0.2701	226
24.03.09	4.72	135	1.4446 \pm 0.2907	225
22.04.09	6.15	434	1.5454 \pm 0.4717	249
09.06.09	7.88	302	2.8858 \pm 0.2618	342
22.06.09	9.45	43	2.6829 \pm 0.2066	387
22.07.09	6.72	350	3.0716 \pm 0.2291	395
19.08.09	4.53	522	2.4158 \pm 0.1857	415
24.09.09	4.10	399	2.3656 \pm 0.3861	nm
22.10.09	9.00	256	3.0642 \pm 0.3981	nm

nm= non measured

<QL = lower than quantification limit

Date	Pb			
	dissolved <0.45 μm ($\mu\text{g/L}^{-1}$)	solid >0.45 μm ($\mu\text{g.g}^{-1}$)	labile (DGT) ($\mu\text{g.L}^{-1}$)	sediment trap ($\mu\text{g.g}^{-1}$)
Marnay				
22.10.08	0.00	36	nm	nm
25.11.08	0.00	29	0.0022 \pm 0.0014	nm
16.12.08	0.00	29	0.0285 \pm 0.0080	23
19.01.09	0.00	42	0.0308 \pm 0.0099	22
24.02.09	0.00	11	0.0039 \pm 0.0030	20
24.03.09	0.00	33	0.0067 \pm 0.0025	20
22.04.09	0.00	46	0.0093 \pm 0.0045	19
09.06.09	0.00	<QL	0.0099 \pm 0.0028	19
22.06.09	0.07	47	0.0136 \pm 0.0011	20
22.07.09	0.00	25	0.0047 \pm 0.0008	20
19.08.09	0.00	67	0.0058 \pm 0.0009	20
24.09.09	0.00	66	0.0041 \pm 0.0022	23
22.10.09	0.00	69	0.0108 \pm 0.0016	nm
Bougival				
22.10.08	0.23	157	nm	nm
25.11.08	0.15	135	0.1612 \pm 0.0711	nm
16.12.08	0.08	71	0.1425 \pm 0.0648	nm
19.01.09	0.17	118	0.0171 \pm 0.0088	105
24.02.09	0.08	77	0.0227 \pm 0.0142	95
24.03.09	0.14	125	0.0239 \pm 0.0031	80
22.04.09	0.15	149	0.0323 \pm 0.0126	87
09.06.09	0.24	139	0.0249 \pm 0.0139	245
22.06.09	0.25	159	0.0868 \pm 0.0307	nm
22.07.09	0.23	307	0.0378 \pm 0.0080	177
19.08.09	0.25	245	0.0302 \pm 0.0088	141
24.09.09	0.19	181	0.0348 \pm 0.0121	148
22.10.09	0.22	161	0.0578 \pm 0.0313	nm
Triel				
22.10.08	0.20	115	nm	nm
25.11.08	0.15	112	0.0272 \pm 0.0219	nm
16.12.08	0.00	145	0.0393 \pm 0.0225	59
19.01.09	0.16	119	0.0124 \pm 0.0023	82
24.02.09	0.00	40	0.0197 \pm 0.0075	55
24.03.09	0.11	34	0.0225 \pm 0.0136	51
22.04.09	0.14	88	0.0194 \pm 0.0127	64
09.06.09	0.16	82	0.0088 \pm 0.0012	84
22.06.09	0.33	71	0.0180 \pm 0.0034	83
22.07.09	0.20	111	0.0176 \pm 0.0036	90
19.08.09	0.16	109	0.0176 \pm 0.0034	99
24.09.09	0.21	119	0.0339 \pm 0.0216	nm
22.10.09	0.24	109	0.0199 \pm 0.0051	nm

nm= non measured

<QL = lower than quantification limit

REFERENCES

- Bibby R.L. et 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(1-3):177-197.
- Chiffolleau J.-F., Cossa D., Auger D. et Truquet I. 1994. Trace metal distribution, partition and fluxes in the Seine estuary (France) in low discharge regime. *Marine Chemistry* 47(2):145-158.
- Dong D.-m., Zhao X.-m., Hua X.-y., Zhang J.-j. et Wu S.-m. 2007. Lead and Cadmium Adsorption onto Iron Oxides and Manganese Oxides in the Natural Surface Coatings Collected on Natural Substances in the Songhua River of China. *Chemical Research in Chinese Universities* 23(6):659-664.
- Dunn R.J.K., Teasdale P.R., Warnken J. et Arthur J.M. 2007. Evaluation of the in situ, time-integrated DGT technique by monitoring changes in heavy metal concentrations in estuarine waters. *Environmental Pollution* 148(1):213-220.
- Eaton A.D., Association A.P.H., Franson M.A.H. et Association A.W.W. 2005. Standard methods for the examination of water & wastewater. Andrew D. Eaton APHA, Mary Ann H. Franson, editor: American Public Health Association.
- Elbaz-Poulichet F., Seidel J.-L., Casiot C. et 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(1):278-287.
- Gasperi J., Garnaud S., Rocher V. et Moilleron R. 2008. Priority pollutants in wastewater and combined sewer overflow. *Science of The Total Environment* 407(1):263-272.
- Hochella M.F. et White A.F. 1990. MINERAL-WATER INTERFACE GEOCHEMISTRY - AN OVERVIEW. *Reviews in Mineralogy* 23:1-16.
- Koelmans A.A. et Radovanovic H. 1998. Prediction of trace metal distribution coefficients (K-D) for aerobic sediments. *Water Science and Technology* 37(6-7):71-78.
- Li Y., Wang X.L., Huang G.H., Zhang B.Y. et Guo S.H. 2009. Adsorption of Cu and Zn onto Mn/Fe Oxides and Organic Materials in the Extractable Fractions of River Surficial Sediments. *Soil and Sediment Contamination: An International Journal* 18(1):87 - 101.
- Lofts S. et Tipping E. 2000. Solid-solution metal partitioning in the Humber rivers: application of WHAM and SCAMP. *The Science of The Total Environment* 251-252:381-399.
- Lu Y. et Allen H.E. 2001. Partitioning of copper onto suspended particulate matter in river waters. *The Science of The Total Environment* 277(1-3):119-132.
- Luoma S.N. et Rainbow P.S. 2008a. Chapter 5 Concentrations and speciation of metals in natural waters. *Metal contamination in aquatic environment*. Cambridge: Cambridge University Press. p 573.
- Luoma S.N. et Rainbow P.S. 2008b. *Metal Contamination in Aquatic Environments*. Cambridge: Cambridge University Press. 573 p.

- Meybeck M., Lestel L., Bonte P., Moilleron R., Colin J.L., Rousselot O., Herve D., de Ponteves C., Grosbois C. et Thevenot D.R. 2007a. 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(1-3):204-231.
- Meybeck M., Lestel L., Bonté P., Moilleron R., Colin J.L., Rousselot O., Hervé D., de Ponteves C., Grosbois C. et Thévenot D.R. 2007b. 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(1-3):204-231.
- Neal C., Robson A.J., Jeffery H.A., Harrow M.L., Neal M., Smith C.J. et Jarvie H.P. 1997. Trace element inter-relationships for the Humber rivers. Inferences for hydrological and chemical controls. *Science of The Total Environment* 194:321-343.
- Ng B., Turner A., Tyler A.O., Falconer R.A. et Millward G.E. 1996. Modelling contaminant geochemistry in estuaries. *Water Research* 30(1):63-74.
- Nguyen H.L., Leermakers M., Osán J., Török S. et Baeyens W. 2005. Heavy metals in Lake Balaton: water column, suspended matter, sediment and biota. *Science of The Total Environment* 340(1-3):213-230.
- O'Connor D.J. et Connolly J.P. 1980. The effect of concentration of adsorbing solids on the partition coefficient. *Water Research* 14(10):1517-1523.
- Ödman F., Ruth T., Rodushkin I. et Pontér C. 2006. Validation of a field filtration technique for characterization of suspended particulate matter from freshwater. Part II. Minor, trace and ultra trace elements. *Applied Geochemistry* 21(12):2112-2134.
- P. Ciffroy D.V., V. Mataix, J. Taconnet, A. Estèbe, D. Thévenot, O. Bourguignon, Z. Idlafkih, M. Meybeck et 1999. Intercomparaison de méthodes d'échantillonnage des matières en suspension en milieu fluvial : application à la mesure de la concentration en micropolluants métalliques
Comparison of methods for sampling suspended matter in rivers: application to measurement of particulate metals *Hydroécol. Appl.* 11:71-102.
- Pernet-Coudrier B., Clouzot L., Varrault G., Tusseau-Vuillemin M.H., Verger A. et Mouchel J.M. 2008. Dissolved organic matter from treated effluent of a major wastewater treatment plant: Characterization and influence on copper toxicity. *Chemosphere* 73(4):593-599.
- Priadi C., Ayrault S., Robin E., Bonté P. et Morin G. 2009. Caractérisation de métaux particulaires par voie chimique et physique. Rapport Annuel. Paris: PIREN Seine. 17 p.
- Shafer M.M., Hoffmann S.R., Overdier J.T. et Armstrong D.E. 2004. Physical and kinetic speciation of copper and zinc in three geochemically contrasting marine estuaries. *Environmental Science & Technology* 38(14):3810-3819.
- Stumm W. et Morgan J.J. 1981. *Aquatic Chemistry*. Toronto: Wiley-Interscience. 780 p.
- Tessier L. 2003. Transport et Caractérisation des Matières en Suspension dans le bassin versant de la Seine: Identification de signatures naturelles et anthropiques [PhD Thesis]. Marne la Vallée: Ecole Nationale des Ponts et Chaussées. 245 p.

- Tessier L. et Bonté P. Suspended sediment transfer in Seine River watershed, France: a strategy using fingerprinting from trace elements; 2002 02/09/2002; Norwich. p 79-99.
- Thévenot D., Lestel L., Tusseau-Vuillemin M.-H., Gonzalez J.L. et Meybeck M. 2009. Les Metaux dans le bassin de la Seine. In: Piren-Seine, editor. Eau Seine Normandie. Paris.
- Thévenot D.R., Moilleron R., Lestel L., Gromaire M.-C., Rocher V., Cambier P., Bonté P., Colin J.-L., de Pontevès C. et 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(1-3):180-203.
- Tusseau-Vuillemin M.H., Gourlay C., Lorgeoux C., Mouchel J.M., Buzier R., Gilbin R., Seidel J.L. et Elbaz-Poulichet F. 2007. Dissolved and bioavailable contaminants in the Seine river basin. *Science of The Total Environment* 375(1-3):244-256.
- Unsworth E.R., Warnken K.W., Zhang H., Davison W., Black F., Buffle J., Cao J., Clevens R., Galceran J., Gunkel P. and others. 2006. Model predictions of metal speciation in freshwaters compared to measurements by in situ techniques. *Environmental Science & Technology* 40(6):1942-1949.
- Vignati D.A.L., Valsecchi S., Polesello S., Patrolecco L. et Dominik J. 2009. Pollutant partitioning for monitoring surface waters. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* 28(2):159-169.

Article 4

Assessment of particulate metal bioavailability to zebra mussels from field bioaccumulation modelling

En préparation pour le Journal Environmental Science and Technology

Bourgeault Adeline^{1,2}, Priadi Cindy³, Gourlay-Francé Catherine^{1,2*}, Ayrault Sophie³ and
Tusseau-Vuillemin Marie-Hélène⁴

¹ Cemagref, UR HBAN, Parc de Tourvoie - BP 44, F-92163 Antony, France.

² FIRE FR-3020, 4 place Jussieu, F-75005 Paris, France.

³ LSCE, avenue de la Terrasse 91198 Gif-sur-Yvette, France.

⁴ IFREMER Technopolis 40, 155 rue Jean-Jacques Rousseau, 92138 Issy-Les-Moulineaux, France.

Abstract – Through an 11-month exposure of transplanted zebra mussels and the use of a kinetic metal bioaccumulation model (the biodynamic model), the bioavailability of Cd, Cr, Cu, Ni and Zn in a river under anthropogenic pressure was investigated. We specifically focused on the trophic bioavailability, which depends on the biogeochemical properties of particles, on metals properties and on the physiology of organisms. In three sites along the Seine River, mussels were collected monthly. The monthly-averaged labile metal concentration in water was assessed using diffusive gradient in thin films (DGT) devices and average particulate contamination was determined in particles collected monthly in sediment trap and treated by a chemical sequential extraction. By comparing the measured metal bioaccumulation in mussels to the prediction of the bioaccumulation model, the speciation obtained by chemical extraction was found to be an unreliable predictor of particulate metal bioavailability, which showed that the Assimilation Efficiency (AE) parameter is needed to reflect biotic factors influencing particulate metal bioavailability. The biodynamic model applied with parameters from the literature was not able to capture the differences between sites. Calculation of AEs at each site and each date from accumulation data revealed that AEs were quite stable over time. Finally, AEs were optimized for a given metal and a given site over the first five months. Results indicated that Cr was not accumulated from food whereas AEs of Cd, Cu, Ni and Zn were respectively 1-26%, 2-27%, 3-14% and 0-5%. The biodynamic model applied with site-specific AE succeeded in predicting metal bioaccumulation. This approach improves the determination of the actual AE of a given site and proposes an original methodology for *in situ* AE measurement.

Keywords: bioaccumulation modelling, Seine River, active biomonitoring, particulate metals bioavailability, assimilation efficiency.

Briefs: Monitoring of the bioaccumulation in transplanted zebra mussels to assess the metal assimilation efficiency.

INTRODUCTION

Aquatic invertebrates and filter-feeding organisms in particular, are exposed to trace metals that are both dissolved in water and associated with suspended particles. For mussels the dietborne accumulation can be a predominant source of metals (1). The biodynamic model has often been employed to investigate quantitatively the metal bioaccumulation in aquatic organisms and to predict metal accumulation in aquatic invertebrates (1,2). This kinetic bioaccumulation model describes the metal concentration in tissue by the following equation (3):

$$\frac{dC_m}{dt} = k_u \cdot C_w + AE \cdot IR \cdot C_f - (k_e + g) \cdot C_m \quad (1)$$

where C_m is the metal concentration in the mussel ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$), t is the time of exposure (d), k_u is the uptake rate constant from the dissolved phase ($\text{L}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$), C_w is the bioavailable metal concentration in the dissolved phase ($\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$), AE is the assimilation efficiency from ingested particules, IR is the ingestion rate of the mussel ($\text{g}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$), C_f is the metal

concentration in the dietary phase ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$), k_e is the efflux rate constant (d^{-1}) and g the growth rate constant of the animal (d^{-1}). This model requires information on the metal contamination in water (dissolved and particulate) and the experimental determination of kinetic parameters. Among them, the assimilation efficiency (AE) is the first-order parameter that reflects the dietborne bioaccumulation. AE corresponds to the fraction of particulate metal actually retained in the tissue and is usually measured in the laboratory using the pulse-chase feeding method (3-5).

Over the past few years, several studies have reported laboratory-determined AEs for different food sources and organisms (4-6). However, there have been limitations to using these laboratory parameters for the prediction of the organisms contamination since actual field geochemical properties of particulate metals and physiological processes are not recreated in the laboratory (7-9). As an example, the different ways to label particles do not allow representing the natural metal speciation and prevent assessing the real AE. Indeed, freshly spiked metals are generally partitioned into the more easily exchangeable phase whereas fraction of the natural metals is usually distributed into more residual phases (9). Griscom et al. (8) showed that sediment aging affects the metal-sediment association and thus the metal bioavailability. Moreover AE may also be influenced by the organism behaviour and physiology such as the food selection according to the quality and the quantity of food (10,11) and the the gut passage time (4). Early studies showed that AEs of metals are closely related to carbon assimilation and gut passage time, but the relationships were metal and species-specific (4,7,9). Up to now, no generalization of geochemical and biological effects on AE have been established and several studies have cautioned against the extrapolation of laboratory-determined AE to field situations (12). The challenge is therefore to use a parameter AE in biodynamic model that is representative of the food actually ingested.

Several studies have questioned about the characterisation of particulate metals bioavailability (13,14). In order to understand the mechanisms that control the bioavailability, a variety of protocols that operationally defined the exchangeable metal fraction in suspended solids or sediment are generally studied (12,15) in conjunction with AE measurements. AE is thus considered as the bioavailable metal fraction despite the warning discussed above. The operationally exchangeable metal fraction can be characterized by different protocols such as the sequential extraction (16), the digestive gut-fluid extraction (17), the HCl extraction (13) or the Acid Volatile Sulfide AVS/ Simultaneously Extracted Metals SEM model (18). While the AVS-based approach is nowadays proposed as a regulatory tool to assess metal bioavailability in sediment (19), some exceptions were reported (8,20). The relationship between digestive gut-fluid or weak acid extractions and the fraction actually accumulated in organisms is also questionable (9,21,22). Generally, there is a positive correlation between assimilation of Cd, the Cd content in the digestive fluid extraction and its distribution in the exchangeable fraction, but no clear relationship are observed for other metals such as Zn or Cr (9,22). Most of the time, the exchangeable metal fraction (whatever evaluated by

acids or gut juice) is unrelated to AE, mainly because physiology and feeding way are not considered (23).

The objective of the present study was to assess the actual particulate metal bioavailability by focussing on two key parameters: the particulate metal concentration and the AE. We first investigated whether and to what extent the chemical sequential extraction can evaluate the particulate metal bioavailability by comparing the measured and the predicted metal concentration in mussels. Then, we tried to find out if AE can be deduced from biodynamic model associated with field monitoring data which incorporate biochemical and physiological effects.

MATERIALS AND METHODS

Study area and sampling

Three sites were studied along the Seine River (France): Marnay-sur-Seine (Site1), Bougival (Site 2) and Triel-sur-Seine (Site 3). Site 1 is located 200 km upstream of the city Paris while Sites 2 and 3 are situated respectively 40 km and 80 km downstream of Paris. Site 2 is thus subject to diffuse urban contamination (i.e. atmospheric fallout, combined sewer overflows) and Site 3 to both diffuse urban sources and wastewater discharge (domestic and industrial sewage).

Zebra mussels were sampled in October 2008 in a reference site in the Meuse-Marne canal (France) (48°45'33"N, 5°36'05"W) the day before the deployment. Mussels (20-22 mm in shell length) were distributed in cages (25 mussels per cage) and then transplanted on the three sites. One cage was sampled each month over an 11-month period and brought back to the laboratory in field water within a few hours.

At the same date than mussel sampling, water samples were collected monthly to monitor physicochemical parameters (i.e. dissolved and particulate organic carbon, chlorophyll, pheopigment, total suspended solids (TSS), major ions, temperature, conductivity and pH). The one-month integrative metal contamination was monitored using Diffuse Gradient in Thin film technique (DGT) (24) for dissolved labile metals and sediment traps for particulate metals. Sampling, sample treatment and results are reported elsewhere (25,26).

Filtration rate measurement

Once brought back to the laboratory, mussels were used for filtration rate measurements as described by Bourgeault et al. (27). For each site, filtration rate (FR) was measured in filtered field water spiked with 1.10^6 cells.mL⁻¹ of algae (*Selenastrum capricornutum*) corresponding to a TSS concentration of 20 mg.L⁻¹ (TSS concentrations measured during the whole campaign ranged from 4 to 45 mg.L⁻¹). Three replicates of 5 pooled mussels were placed on a nylon sieve in a 500 mL beaker. The medium was continuously

homogenized with a magnetic stirrer (300 rpm). The experiments were conducted in a thermostated room adjusted according to the site water temperature.

FR_{app} was corrected in order to take into account the actual TSS concentration in the field. This correction was based on the empirical relation found by Reeders and Bij de Vaate (28) as follows:

$$FR = FR_{app} \cdot e^{0.037 \cdot (TSS_{Field} - TSS_{Laboratory})} \quad (2)$$

Metal analysis

The soft tissues of mussels were removed from the shell and byssus threads cut off. Mussels soft tissues were freeze-dried and weighed (dry and fresh weight) in order to calculate the condition index (CI) (wet weight of soft tissues to total wet weight of the mussel (including the shell) ratio). Dried tissues of the mussels were then pooled and homogenized (MM 400 Retsch). Tissues (about 80mg) were digested in polypropylene tubes (Sarstedt) with a 2mL of HNO_3 (65% suprapur Merck) and 0.8 mL of H_2O_2 (30% suprapur Merck) (27). Internal standards (^{103}Rh , ^{115}In and ^{185}Re) were added to samples prior to metal analysis. Metals concentrations were determined with Inductively Coupled Plasma-Mass Spectrometer (ICP-MS ThermoFisher Scientific), checking the accuracy of the analytical procedure with a reference natural water samples (NIST 1640). The relative deviations were <15% for Cr, Ni, Cu and Cd and <27% for Zn ($n=5$). A reference mussel material (Mussel Tissue ERM-CE 278) was also used to validate the acidic digestion. The deviation from certified values was <10% for Cr, Cd, Cu and Zn except for one sample for Cr where the deviation reached 31% ($n=4$); Ni is not referred in this mussel material. Metal body burden was expressed in μg of metal per g of dry weight tissue ($\mu g \cdot g_{dry\ wt}^{-1}$). Since the samples were pooled, a 10% deviation was assumed for the metal analysis, based on Bervoets' results (29) (i.e. a representative sample with a RSD of lower than 10% is obtained with 15 pooled individuals) and based on the deviation obtained for the reference mussel material (<10%, $n=4$). Let us notice that the 10% RSD reflects biological and analytical variability.

After retrieval, DGTs were analyzed and one-month average labile concentrations were determined (30). TSS were subjected to BCR sequential extraction following a revised protocol (16). Metal fractions were divided in exchangeable (Exch), reducible (Red), oxidisable (Oxy) and residual (Res) fractions. Methods and data are reported elsewhere (26). Subsequently we will focus only on the exchangeable and the reducible fractions since the labile fractions liberated by the 2-step sequential extraction are expected to release broadly the same fraction than the dilute HCl extraction (31) which is supposed to extract a metallic fraction closed to the bioavailable one (13). Indeed, considering that the suspended particles collected in the sediment traps are predominantly composed by oxidised particles, the 3-step sequential extraction (i.e. sum of the fractions Exch+Red+Oxy) is more aggressive for Cd, Cr, Cu, Ni and Zn (31).

Four values of sequential extraction were missing and were then extrapolated, based on the fact that the percentage of metal in each fraction is constant during the 11-month exposure for a given site (26). Thus, a mean repartition percentage of metal in each

fraction was calculated on the basis of the measurements carried out on 7 samples realised per site, and was then applied on the total metal concentration extracted from TSS. Total metal extractions from TSS is described elsewhere (25).

Statistical analysis

All data were first tested for normality by the Shapiro-Wilkinson test. Trace metals body burdens and filtration rate differences were tested using Kruskal and Wallis analysis since data were not normally distributed and the pairwise comparison of samples were performed according to Dunn (32). The normally-distributed Condition Index were compared using analyses of variance (ANOVA) followed by the Tukey HSD test. A probability level of 0.05 was considered to be statistically significant.

BIOACCUMULATION MODELLING

In order to apply the biodynamic model to monthly data, the metal bioaccumulation was predicted from Equation 1 following the approach used by Guan and Wang (33). Therefore, under the hypothesis that parameters and variables C_w and C_f were constant between t_{i-1} and t_i (although variable between each month), the metal concentration in mussel tissues was described by the following equation (see details of the differential equation resolution reported in SI):

$$C_m(t_i) = C_m(t_{i-1}) \cdot e^{(k_e+g) \cdot (t_i-t_{i-1})} + C_{m_ss} \cdot (1 - e^{(k_e+g) \cdot (t_i-t_{i-1})}) \quad (3)$$

$$C_{m_ss} = \frac{k_u \cdot C_w + AE \cdot TSS \cdot FR \cdot C_f}{k_e + g} \quad (4)$$

where C_w is the dissolved metal concentration between t_{i-1} and t_i ($\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) and C_f is the metal concentration of the particles collected by the sediment traps between t_{i-1} and t_i ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$). The labile metal concentration sampled with DGT devices account for the metal concentration in the dissolved phase since DGT devices allow an integrative measurement close to the bioavailable metal fraction (34,35). Initial metal concentration in mussels $C_m(t_0)$ was the measured concentration in mussels in the collection site. IR is the product of the TSS ($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) loads and the filtration rate FR ($\text{L}^{-1}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$). The growth rate constant g (d^{-1}) was calculated for each month from the dry weight evolution of mussels' soft tissue. During spawning, the decrease of dry weight leads to a negative g . Indeed, we inferred that spawning concentrates the metals in soft tissue since gametes have a low metal content compared to the other soft part (36).

Values of the parameters k_u , k_e and AE used for modelling are summarized in Table 1. They were obtained from several studies with zebra mussels (3,4), or marine mussels (6) when not available for zebra mussel. The uptake rate constant k_u of Cd and Ni was a function of the filtration rate and Ca and Zn dissolved concentrations as determined in the laboratory (27,37). A mean of the elimination rate constants was used when several k_e were reported. Cu and Ni AEs were not available for zebra mussels or close species of bivalve. Hence, no prevailing model was fitted with our field data. When several AEs were reported, the AE determined from a natural seston the closest to our field characteristics

(i.e. TSS loads, particulate organic carbon and chlorophyll concentrations) was chosen, otherwise a mean AE of the different food types was estimated. Cr speciation was not determined in this study, that is why we used a mean k_u of Cr(III) and Cr(VI).

Table 1: Biokinetic parameters used to model metals concentrations in zebra mussels tissues.

	AE (%)	k_u (L.g ⁻¹ .d ⁻¹)	k_e (d ⁻¹)
Cd	26 ^{a1}	$k_u = FR \cdot \left(\frac{0.134}{1 + 10^{3.5} \cdot [Ca] + 10^{7.4} \cdot [Zn]} \right)^b$	0.012 ^{a3}
Cr	1.5 ^{a2}	1.15 ^a	0.015 ^{a3}
Zn	32 ^{c1}	1.047 ^{c2}	0.018 ^{c3}
Ni	-	$k_u = FR \cdot \left(\frac{0.043}{1 + 10^{3.6} \cdot [Ca]} \right)^b$	0.019 ^d
Cu	-	0.163 ^b	0.022 ^e

^a: (4)

^{a1}: AE referring to natural seston B of the Hudson River that had a TSS concentration of 11 mg.L⁻¹

^{a2}: AE referring to natural seston A of the Hudson River that had a TSS concentration of 28 mg.L⁻¹ (AE for seston B not available for Cr)

^{a3}: Mean k_e of Cr III and Cr IV obtained as a result of mussel contamination by the trophic and the dissolved routes

^b: values obtained from a previous laboratory study on zebra mussels (unpublished data for Cu, Ni (37))

^c: (3)

^{c1}: AE referring to natural seston '11 March' that had a chlorophyll concentration of 11,7 µg.L⁻¹

^{c2}: Mean k_u

^{c3}: Mean k_e obtained as a result of mussel contamination by the trophic and the dissolved routes

^d: (38)

^e: k_e estimated from bioaccumulation data after a depuration period (39)

In a first simulation, the ability of chemical sequential extractions to reflect the bioavailable particulate metal concentration was investigated. The measured metal concentrations were compared to the predicted values with an AE equal to 100% and C_f as the particulate metal concentration measured in the different fractions of the chemical extraction.

In a following simulation, we evaluated the predictive capacity of the prevailing biodynamic model to determine the contamination of mussels with parameters (k_u , k_e and AE) from the literature (Table 1).

Then, data from the 5 first months of exposure were used to optimize AE for each metal and each site. The biodynamic model was applied with optimized AEs to data from the last 6 months after that the predicted and the measured mussel concentrations were compared to validate the field-determined AE methodology.

RESULTS

Mussels' biological activity

Most mussels survived from October 2008 to July 2009, the mean mortality rate was <12%. In August the mortality was 27, 79 and 70% for Sites 1, 2 and 3 respectively and then reached 88, 88 and 92% in September. This mortality may be attributed to the unusually high water temperature (i.e. 20°C on average in August and September), associated with a decrease of dissolved oxygen (the concentration of dissolved oxygen reached 3.8 mg.L⁻¹ at Site 3 at the end of August).

The CI (Figure S1) followed a seasonal trend, with an increase during the six first months reaching a maximum at the end of March (0.45 ± 0.03 for Site 2) or April (0.40 ± 0.04 for Site 1 and 0.42 ± 0.06 for Site 3). There followed a decrease until the end of September (0.19 ± 0.02, 0.25 ± 0.05 and 0.26 ± 0.08 for Site 1, 2 and 3). Hence, we infer that spawning occurred in April for Site 2 and in May for Site 1 and 3.

The filtration rates are shown on Figure S2. The FRs sharply dropped at the 3 sites in December where they reached 7 L.g_{dry wt}⁻¹.d⁻¹ on average. Then, they increased steadily from January to August. The water temperature, which fell below 5°C in December, could partly explain the decrease of FR during the winter (28). The FR in Site 1 was generally higher compared to both other sites, the difference being significant in February and March (Kruskal and Wallis test, p<0.05). This may be explained by a smaller food supply (28) (observed via lower chlorophyll, DOC, POC and TSS concentrations at Site 1 (25)).

Metal contamination in mussels over the year of exposure

A significant difference of water and particulate metal contamination was observed between the upstream site in the one hand, and the two downstream sites in the other hand (detail description is given elsewhere (25,26) and compiled data are reported in Table S1). Nevertheless, over the 11-month exposure, no statistical difference of metal body burdens was observed between the sites (Figure 1) (Kruskal and Wallis analysis, p>0.05). The mean body burdens during the exposure, all sites taken together, were 0.8 ± 0.2 µg.g_{dry wt}⁻¹ for Cd, 1.0 ± 0.4 µg.g_{dry wt}⁻¹ for Cr, 11.5 ± 2.1 µg.g_{dry wt}⁻¹ for Cu, 7.4 ± 2.7 µg.g_{dry wt}⁻¹ for Ni and 106.7 ± 11.8 µg.g_{dry wt}⁻¹ for Zn. The metal concentrations in zebra mussels were similar to previous ones obtained for transplanted mussels along an affluent of the Seine River (30). These concentrations were similar to the metal contamination of mussel from reference sites in other studies (40-42) even though the Seine River basin is subjected to very high anthropogenic pressure (43). This highlights the complexity of urbanized sites which are undoubtedly contaminated but with low levels of numerous substances and consequently are not strongly contrasted sites regarding some specific substances.

A decrease of Cd, Cr and Cu body burden is observed in April, concomitant with maximal CI. The increase of CI reflects the growth of mussels and provokes a biological dilution of metals (30). Conversely metal body burdens increase in June, which may be attributed to the loss of weight due to spawning. Indeed, unlike hydrophobic compounds, metal

concentration in gametes are lower than other soft tissues (36). Spawning may lead to an increase of metal concentration expressed as metal per gram of tissue.

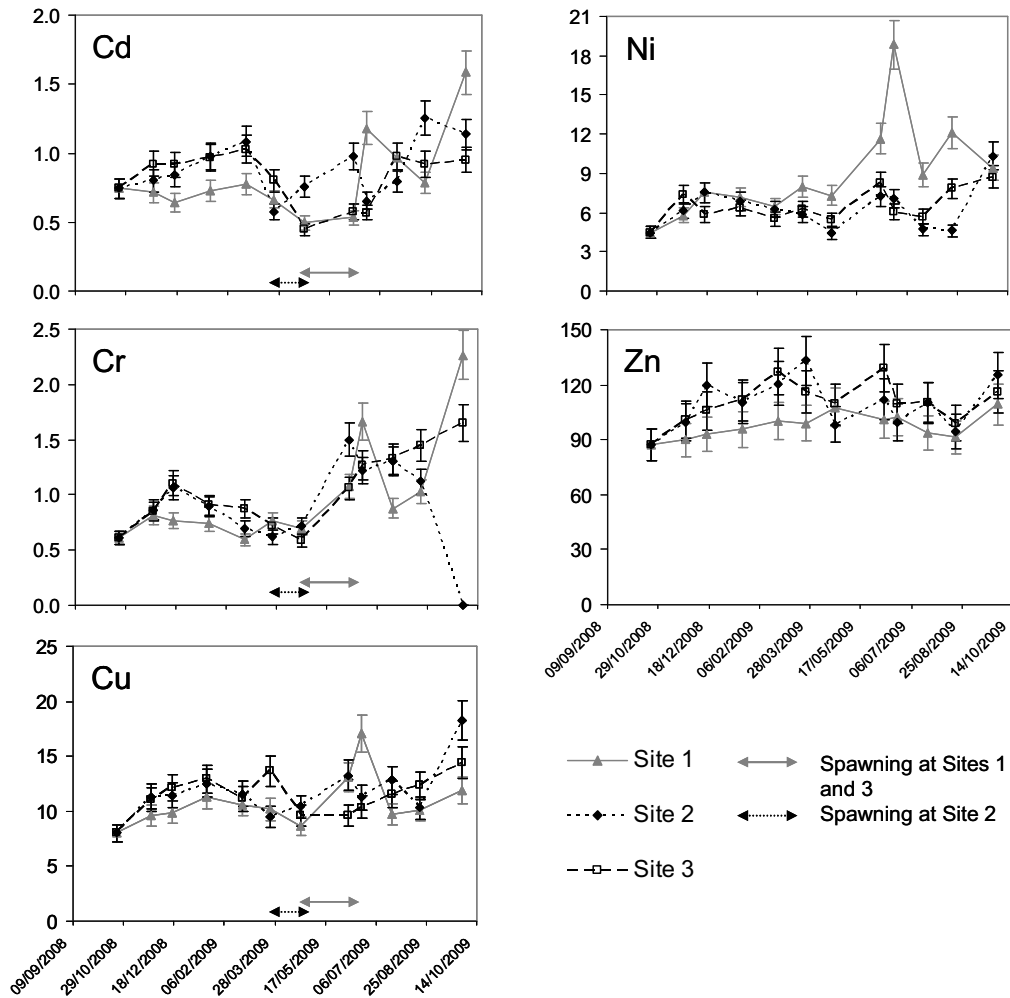


Figure 1: Metals concentrations in mussels ($\mu\text{g.g dry wt}^{-1}$) over the 11-month exposure at Site 1 (Marnay-sur-Seine), Site 2 (Bougival) and Site 3 (Triel-sur-Seine) and the spawning period corresponding to the observation of a decreased condition index.

DISCUSSION

Does a chemical sequential extraction mimic the bioavailability of particulate metals?

Assuming that the bioavailability of particulate metals would be properly assessed by a weak and selective extraction (13), as performed in the 1-2-steps of sequential extraction (31), a 100% AE combined to the concentration of particulate metals in selected fractions of the sequential extraction would be sufficient to adjust the modelled data to that measured.

The model overestimated the metal contamination in the mussel tissue if the concentration of particulate metals is the concentration measured in the fractions Exch + Red (Figure 2). A better adjustment was obtained when considering the particulate metal contamination as the concentration of the exchangeable fraction only (Figure 2) since the predicted values in the mussel tissues were then the same order of magnitude as measured values. However, 35% of predicted values are 3-fold higher compared to the measured values (comparisons over time for the 3 sites are given in SI on Figure S3, S4 and S5). For example, Cr and Ni contamination is always overestimated, which suggests that metals in the exchangeable fraction are not fully bioavailable. Conversely, Cu mussel body burden is well simulated in Site 1 and tends to be underestimated in Sites 2 and 3, which means that copper in less exchangeable fractions are probably bioavailable at these sites. Hence, representing the bioavailability of particulate metal by the concentration in the BCR defined exchangeable fraction was not sufficient to accurately predict metal accumulation in organisms. Thus, the speciation defined by the chemical extraction was found to be an unreliable predictor of particulate metal bioavailability independently from the site and the metal considered. This highlights the fundamental role of the trophic pathway and, in particular, the parameter AE, since it allows modulating the dietborne accumulation. Subsequently, we focused on this parameter and we assess its capacity to account the mechanisms that control the bioavailability considering, in the bioaccumulation modelling, that the particulate metal fraction is the fraction which is the closest to the bioavailable one (i.e. Exh + Red).

A methodology based on field data to assess the assimilation efficiencies

The application of the biodynamic model with AEs from the literature leads to an overestimation of metal accumulation in organisms (Figure 2). However, this overestimation was lesser upstream compared to downstream (see details of the simulation over time in SI, Figure S6). The properties of particulate metals (i.e. binding characteristic of particles, organic matter, sulfides and metal concentrations) and the biological behavior of organisms which probably differs between sites may explain the better fitting for data at Site 1, suggesting that AE from the literature are potentially more representative of food and eating behaviour at the upstream site. The application of variable AEs between sites would improve the prediction of the biodynamic model.

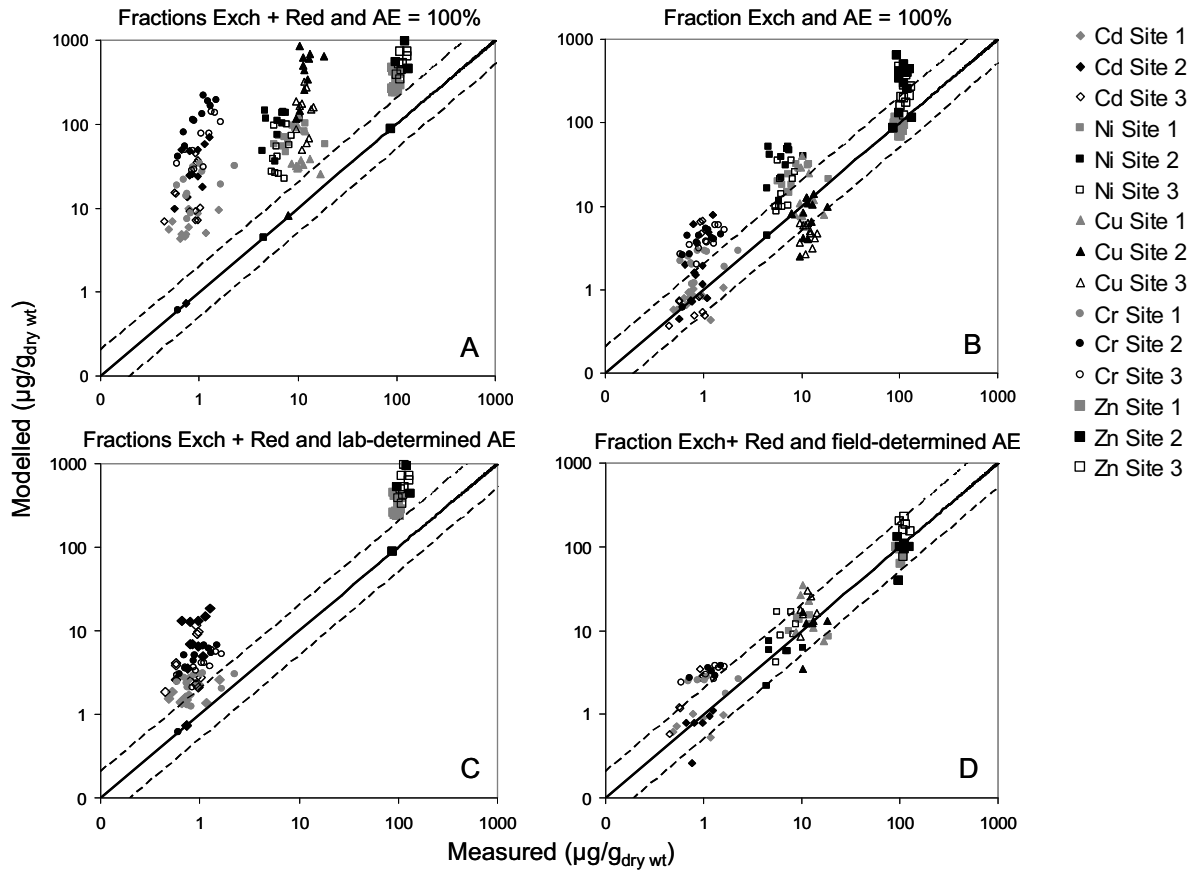


Figure 2: Measured and modelled metal concentrations in mussel tissue ($\mu\text{g}\cdot\text{g}_{\text{dry wt}}^{-1}$) as a function of the particulate metal concentration and the assimilation efficiency (AE). The particulate metal concentration is equal to the metal concentration measured in the different fractions of the chemical sequential extraction (Exchangeable: Exch., Reducible: Red). The assimilation efficiencies is 100%, the lab-determined AE from the literature or the field-determined AE from in situ data. The line draws a 1:1 relationship and the dashed lines represent a deviation of 2 above or below this line.

As a first step toward the evaluation of site-specific AE, the AE for each site, each metal and each date was calculated from the measured bioaccumulation data according to the following equation:

$$AE = \left(\left(\frac{C_{org}(t_i) - C_{org}(t_{i-1}) \cdot e^{-(k_e+g)(t_i-t_{i-1})}}{1 - e^{-(k_e+g)(t_i-t_{i-1})}} \right) \cdot (k_e + g) - k_u \cdot C_d \right) \cdot \frac{1}{FR \cdot MES \cdot C_p} \quad (5)$$

The values of AEs are represented on Figure S7. Standard deviations were rather high due to the addition of all the errors of the biodynamic parameters (i.e. FR, TSS, the growth rate constant, C_w and C_m). Results indicated that Cr was the metal displaying the lowest assimilation (close to 0) compared to Cd, Cu, Zn and Ni. Some data, particularly at the end of June for Site 1, are very high. These extreme values are due to the association of a high metal contamination in mussel tissue and a very low FR resulting in a high estimation of AE. Although the differences between sites were not significant, AEs at Site 1 were generally higher. The reasons why AEs were higher upstream are not

clear, especially since the sequential extraction showed that Cd and Zn were more labile downstream (25) (Table S2). We can hypothesize that, on Site 1, as the trophic status level is lower than downstream, it resulted in a greater uptake of carbon (possibly by increasing the gut passage time of food through the digestive system of mussels), and thus, a higher uptake of metals (44). Overall, at each site, AE showed low variation during the year of exposure. Thus, the biological cycle of the organism and the geochemical variations of the aquatic system over year may not have an influence on metal assimilation. A constant site-specific AE may thus lead to a better evaluation of metal bioaccumulation.

The use of an optimized AE for each site and for each metal does allow a good match between predicted and measured concentrations (Figure 2 and Figure S6). Indeed, 86% of the values predicted for the six last months of exposure were similar to the actual measured concentration within a 2-fold factor. AEs optimized from the 5 first months of exposure are reported in Table 2. Optimized AE were at least by a factor 3 smaller than laboratory determined AEs obtained from the literature (Table 1). This confirms the assimilation of metals freshly spiked onto particles in the laboratory is higher than natural particulate metals (8). As observed previously, AEs in Site 1 were higher compared to the other sites located downstream. Let us notice that AEs optimized from the 5 first months of exposure do not differ from AEs values obtained from an 11-month data calibration (except for Cu at Site 1). Thus, an exposure of few months is enough to determine site-specific AE.

Table 2: Assimilation efficiencies (AE) per site and per metal obtained from the optimisation of predicted concentrations with the measured ones over the first 5-month and 11-month exposure.

	Optimisation over the first 5-month exposure			Optimisation from the 11-month exposure		
	Site 1	Site 2	Site 3	Site 1	Site 2	Site 3
Cd	9%	1%	7%	9%	2%	4%
Cr	0%	0%	0%	0%	0%	0%
Zn	5%	0%	0%	5%	0%	0%
Ni	13%	3%	14%	13%	3%	14%
Cu	26%	2%	8%	9%	2%	5%

This study highlights the difficulty to use generic biodynamic parameters and proposes an original methodology to determine site-specific AEs that allows a good agreement of the biodynamic model predictions with bioaccumulation measurements. This original methodology for estimating AE requires, first of all, a robust biodynamic model with precisely determined kinetic constants (k_u , k_e and IR). Obtaining this robust model is not straightforward. But this methodology allows assessing the effective assimilation efficiency of metals, taking into account both the effects of organism physiology and the geochemical variations of metal with respect to particulate interaction and, the latter being less evaluated in lab-determined AE experiments.

Acknowledgement - The authors wish to thank Emmanuelle Uher and Aurélie Germain for their support in field work and sample analysis, Julien Guieu for his help for the English revision and the S.I.A.A.P. for providing access to the Site 2 (Bougival). This work is part of the Piren-Seine research program. A. Bourgeault acknowledges a PhD grant from the Ile-de-France Regional Council (R2DS program) and MEDISIS (Métaux dissous en Seine) project in the context of the invitation to tender EC2CO (Ecosphère Continentale et Côtière).

In Supporting Information are reported the Filtration Rate and the Condition Index of mussels over the exposure. The labile and the particulate metal concentrations as well as the percentage of metals in the exchangeable and the reducible fraction are reported in Tables. The resolution of the equations used for the simulations are also presented. The different simulations for Site 1, 2 and 3 over time are reported in SI with various AE (i.e. 100%, laboratory determined AE and field determined AE) and the metal contamination as the contamination measured in the 1-step or 2-steps of the sequential extraction.

SUPPORTING INFORMATION

Table S1: Labile^a and particulate^b metal concentrations over the 11-month exposure at Marnay (Site 1), Bougival (Site 2) and Triel (Site 3). An asterisks (*) indicates that the values were extrapolated as explained in the materials and methods section.

Date	Cd		Cr		Cu		Ni		Zn	
	labile (DGT) ($\mu\text{g.L}^{-1}$)	sediment trap ($\mu\text{g.g}^{-1}$) Exch+Red	labile (DGT) ($\mu\text{g.L}^{-1}$)	sediment trap ($\mu\text{g.g}^{-1}$) Exch+Red	labile (DGT) ($\mu\text{g.L}^{-1}$)	sediment trap ($\mu\text{g.g}^{-1}$) Exch+Red	labile (DGT) ($\mu\text{g.L}^{-1}$)	sediment trap ($\mu\text{g.g}^{-1}$) Exch+Red	labile (DGT) ($\mu\text{g.L}^{-1}$)	sediment trap ($\mu\text{g.g}^{-1}$) Exch+Red
Marnay (Site 1)										
25.11.08	0.0007 ± 0.0002	0.32*	0.0184 ± 0.0025	0.63*	0.0615 ± 0.0117	2.55*	0.1537 ± 0.0155	4.86*	0.4443 ± 0.0794	54.38*
16.12.08	0.0014 ± 0.0006	0.21*	0.0180 ± 0.0021	0.27*	0.0751 ± 0.0075	2.30*	0.2049 ± 0.0171	2.21*	1.4880 ± 0.3041	32.87*
19.01.09	0.0010 ± 0.0007	0.21	0.0352 ± 0.0062	1.03	0.0655 ± 0.0063	2.42	0.2021 ± 0.0274	3.64	0.9879 ± 0.6036	40.40
24.02.09	0.0012 ± 0.0001	0.22	0.0250 ± 0.0020	0.84	0.0748 ± 0.0077	2.24	0.2088 ± 0.0154	4.24	0.8363 ± 0.2054	48.53
24.03.09	0.0009 ± 0.0001	0.24	0.0249 ± 0.0038	0.80	0.0736 ± 0.0059	2.57	0.1949 ± 0.0178	4.41	0.1593 ± 0.2726	41.11
22.04.09	0.0004 ± 0.0004	0.25	0.0333 ± 0.0110	1.43	0.0970 ± 0.0096	2.45	0.2120 ± 0.0356	4.77	0.7561 ± 0.3556	52.91
09.06.09	0.0009 ± 0.0003	0.23	0.0214 ± 0.0033	1.13	0.0907 ± 0.0197	2.32	0.1730 ± 0.0370	4.44	0.6933 ± 0.1770	47.76
22.06.09	0.0011 ± 0.0005	0.20*	<QL ± 0.0000	1.06*	0.0852 ± 0.0086	2.08	0.1959 ± 0.0227	4.43	0.0000 ± 0.0000	53.07
22.07.09	0.0004 ± 0.0001	0.26	0.0178 ± 0.0027	0.93	0.0581 ± 0.0098	7.26	0.0954 ± 0.0082	4.23	0.3653 ± 0.2242	52.50
19.08.09	0.0006 ± 0.0001	0.29	0.0196 ± 0.0026	1.11	0.1038 ± 0.0123	7.68	0.1350 ± 0.0184	4.24	0.2743 ± 0.0185	55.47
24.09.09	0.0006 ± 0.0000	0.22*	0.0167 ± 0.0041	1.15*	0.0730 ± 0.0055	2.39*	0.1164 ± 0.0076	4.39*	0.1149 ± 0.0942	52.06*
Bougival (Site 2)										
25.11.08	0.0041 ± 0.0006	1.57*	0.0574 ± 0.0248	7.47*	0.2663 ± 0.0435	37.77*	0.3686 ± 0.0287	7.56*	2.6357 ± 0.3660	288.07*
16.12.08	0.0051 ± 0.0009	0.65*	0.0926 ± 0.0131	6.67*	0.2590 ± 0.0469	16.70*	0.4456 ± 0.0353	8.89*	3.1303 ± 0.4687	236.65*
19.01.09	0.0021 ± 0.0003	1.73	0.0270 ± 0.0060	7.93	0.1716 ± 0.0125	36.82	0.2971 ± 0.0523	8.47	1.7871 ± 0.3823	305.30
24.02.09	0.0022 ± 0.0002	1.38	0.0583 ± 0.0304	7.11	0.2181 ± 0.0760	42.79	0.3215 ± 0.0582	9.88	2.4681 ± 0.5169	325.97
24.03.09	0.0031 ± 0.0028	1.47	0.0353 ± 0.0033	7.23	0.1408 ± 0.0568	27.69	0.2284 ± 0.0982	8.45	0.4016 ± 0.7782	237.97
22.04.09	0.0016 ± 0.0006	1.80	0.0291 ± 0.0081	8.14	0.1649 ± 0.0290	27.55	0.1769 ± 0.0411	8.55	0.3518 ± 0.1285	247.44
09.06.09	0.0022 ± 0.0008	2.31	0.0244 ± 0.0065	10.06	0.1867 ± 0.0696	46.95	0.1846 ± 0.1641	8.10	1.5101 ± 0.8240	325.66
22.06.09	0.0041 ± 0.0028	1.48*	0.0024 ± 0.0035	6.57*	0.2981 ± 0.0485	24.69*	0.3244 ± 0.0534	6.01*	2.0656 ± 0.3286	239.23*
22.07.09	0.0054 ± 0.0009	2.90	0.0323 ± 0.0054	10.56	0.3864 ± 0.0328	61.22	0.4699 ± 0.0656	8.58	2.4936 ± 0.3778	377.07
19.08.09	0.0028 ± 0.0005	2.83	0.0277 ± 0.0033	9.33	0.2532 ± 0.0481	60.56	0.3210 ± 0.0857	7.50	1.6872 ± 0.8048	340.36
24.09.09	0.0066 ± 0.0024	2.88*	0.0211 ± 0.0024	9.43*	0.4257 ± 0.0726	53.95*	0.4194 ± 0.0478	8.70*	1.8259 ± 0.3294	362.45*
Triel (Site 3)										
25.11.08	0.0022 ± 0.0010	1.51*	0.0314 ± 0.0112	6.48*	0.1511 ± 0.0640	12.23*	0.1716 ± 0.1870	4.97*	1.4578 ± 0.7045	230.91*
16.12.08	0.0051 ± 0.0017	0.98*	0.0857 ± 0.0081	2.00*	0.2511 ±	9.04*	0.5448 ± 0.0412	3.40*	3.5673 ± 0.3334	157.00
19.01.09	0.0036 ± 0.0005	0.70	0.0284 ± 0.0035	4.81	0.1743 ± 0.0139	18.40	0.4651 ± 0.0440	5.37	2.7852 ± 0.4558	162.62
24.02.09	0.0027 ± 0.0004	1.42	0.0452 ± 0.0111	7.74	0.2095 ± 0.0158	38.89	0.4506 ± 0.0308	6.73	3.7381 ± 0.2701	277.20
24.03.09	0.0050 ± 0.0026	0.80	0.0415 ± 0.0144	6.02	0.2167 ± 0.0545	19.98	0.4265 ± 0.0927	6.30	1.4446 ± 0.2907	141.56
22.04.09	0.0021 ± 0.0009	1.52	0.0372 ± 0.0101	7.20	0.2406 ± 0.0707	24.58	0.4431 ± 0.1258	7.23	1.5454 ± 0.4717	192.39
09.06.09	0.0032 ± 0.0003	1.62	0.0243 ± 0.0031	10.02	0.2798 ± 0.0229	31.34	0.5783 ± 0.0451	8.06	2.8858 ± 0.2618	257.41
22.06.09	0.0045 ± 0.0005	1.65*	0.0083 ± 0.0069	8.73*	0.3004 ± 0.0216	14.11*	0.5425 ± 0.0446	7.33*	2.6829 ± 0.2066	246.19*
22.07.09	0.0051 ± 0.0004	2.90	0.0314 ± 0.0047	9.28	0.3878 ± 0.0299	31.97	0.7516 ± 0.0564	7.26	3.0716 ± 0.2291	260.48
19.08.09	0.0043 ± 0.0006	2.83	0.0256 ± 0.0026	6.77	0.3336 ± 0.0373	17.60	0.5643 ± 0.0534	7.68	2.4158 ± 0.1857	274.26
24.09.09	0.0050 ± 0.0007	1.14*	0.0319 ± 0.0165	8.61*	0.3628 ± 0.0444	14.78*	0.6810 ± 0.0707	8.10*	2.3656 ± 0.3861	253.71*

Table S2: Percentage of metals in the exchangeable and the reducible fraction of total suspended solid (TSS) collected with sediment trap (25). Mean over the exposure \pm SD.

	Site 1	Site 2	Site 3
Cd	82 \pm 6%	88 \pm 1%	88 \pm 6%
Cr	7 \pm 1%	25 \pm 2%	28 \pm 5%
Zn	64 \pm 5%	84 \pm 1%	84 \pm 4%
Ni	40 \pm 4%	45 \pm 3%	45 \pm 5%
Cu	21 \pm 12%	39 \pm 3%	41 \pm 9%

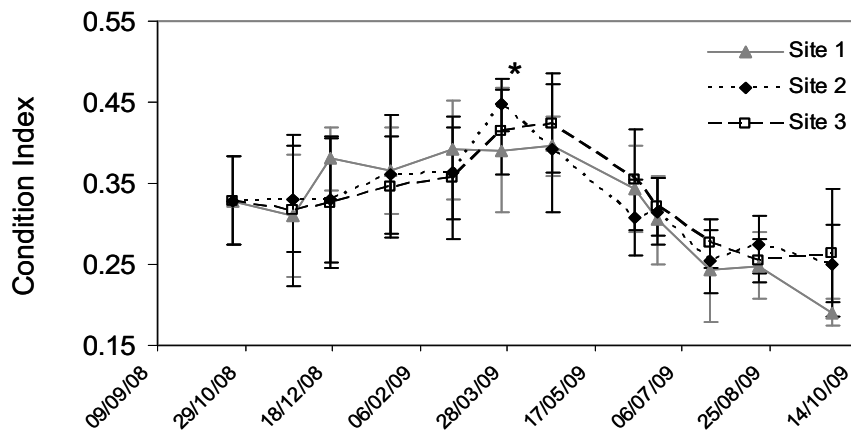


Figure S1: Condition Index (CI) of the mussels exposed at the three sites. Mean \pm SD (n=15). * Maximal values for each of the three sites significantly different from the initial CI (except for Site 1) and from the final CI (except for Site3), Anova TukeyHSD ($p < 0.05$).

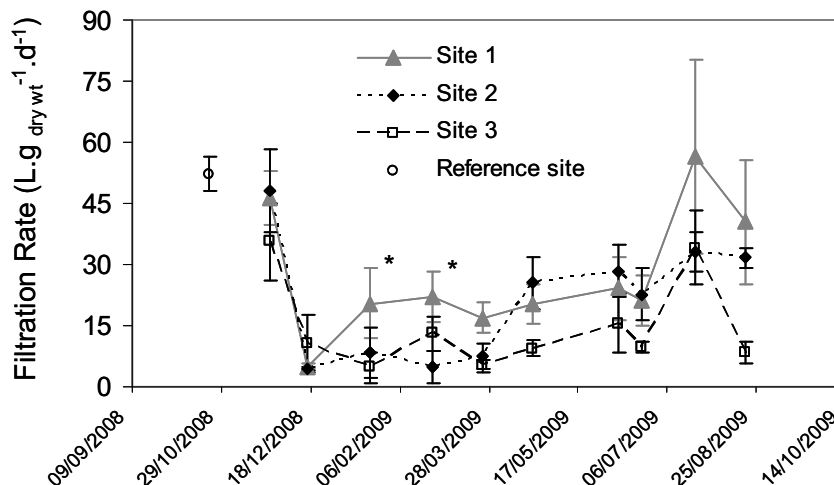


Figure S2: Filtration rate of zebra mussels ($L.g \text{ dry wt}^{-1} .d^{-1}$). Mean of three replicats (each composed by 5 mussels) \pm SD. The asterisks * indicate that the values are significantly different between Site 1 and Site 3 in February and between Site 1 and Site 2 in March (Kruskal and Wallis test, $p < 0.05$).

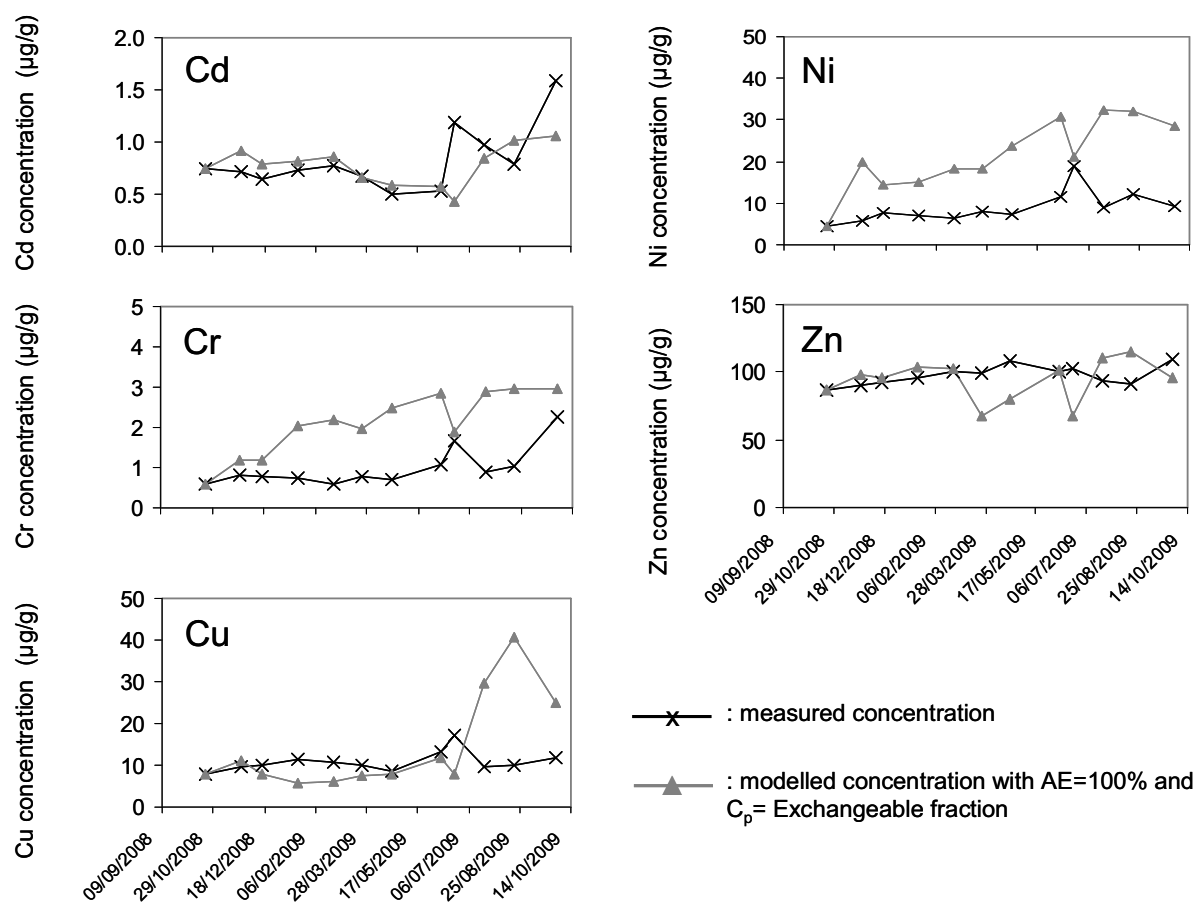


Figure S3: Measured and modelled metal concentrations in mussel tissue ($\mu\text{g.g}_{dry\ wt}^{-1}$) at Site 1 with AE=100% and the metal contamination as the concentration measured in the exchangeable fraction.

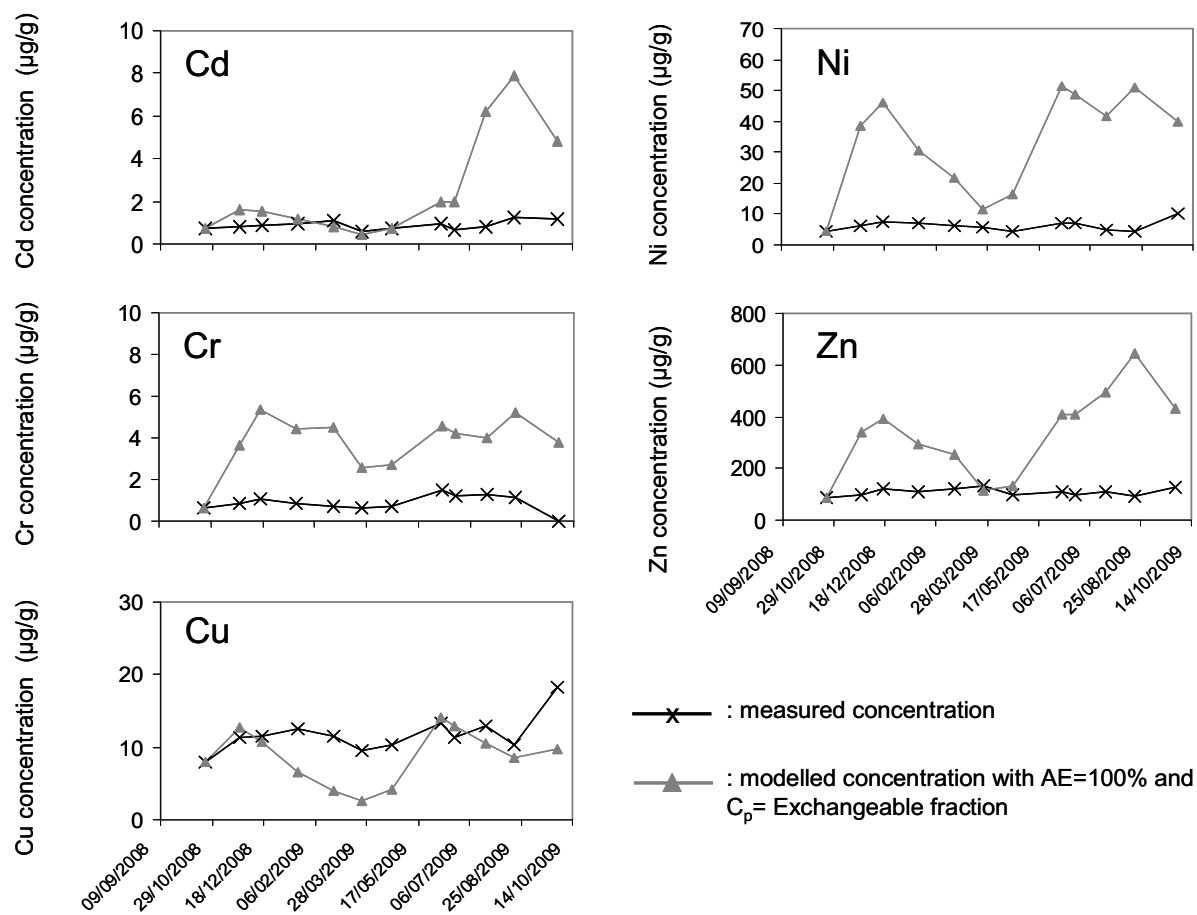


Figure S4: Measured and modelled metal concentrations in mussel tissue at Site 2 with $\text{AE}=100\%$ and the metal contamination as the concentration measured in the exchangeable fraction.

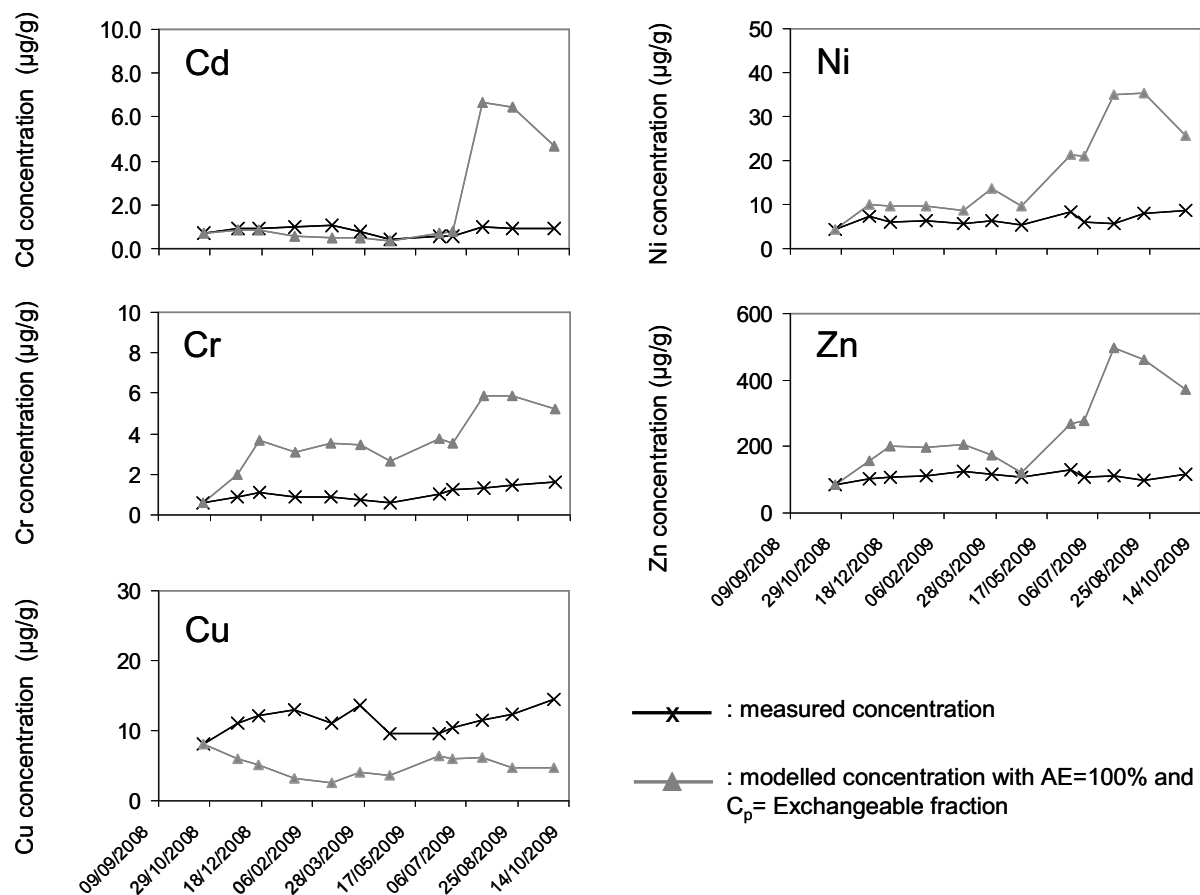


Figure S5: Measured and modelled metal concentrations in mussel tissue at Site 3 considering $AE=100\%$ and the metal contamination as the concentration measured in the exchangeable fraction.

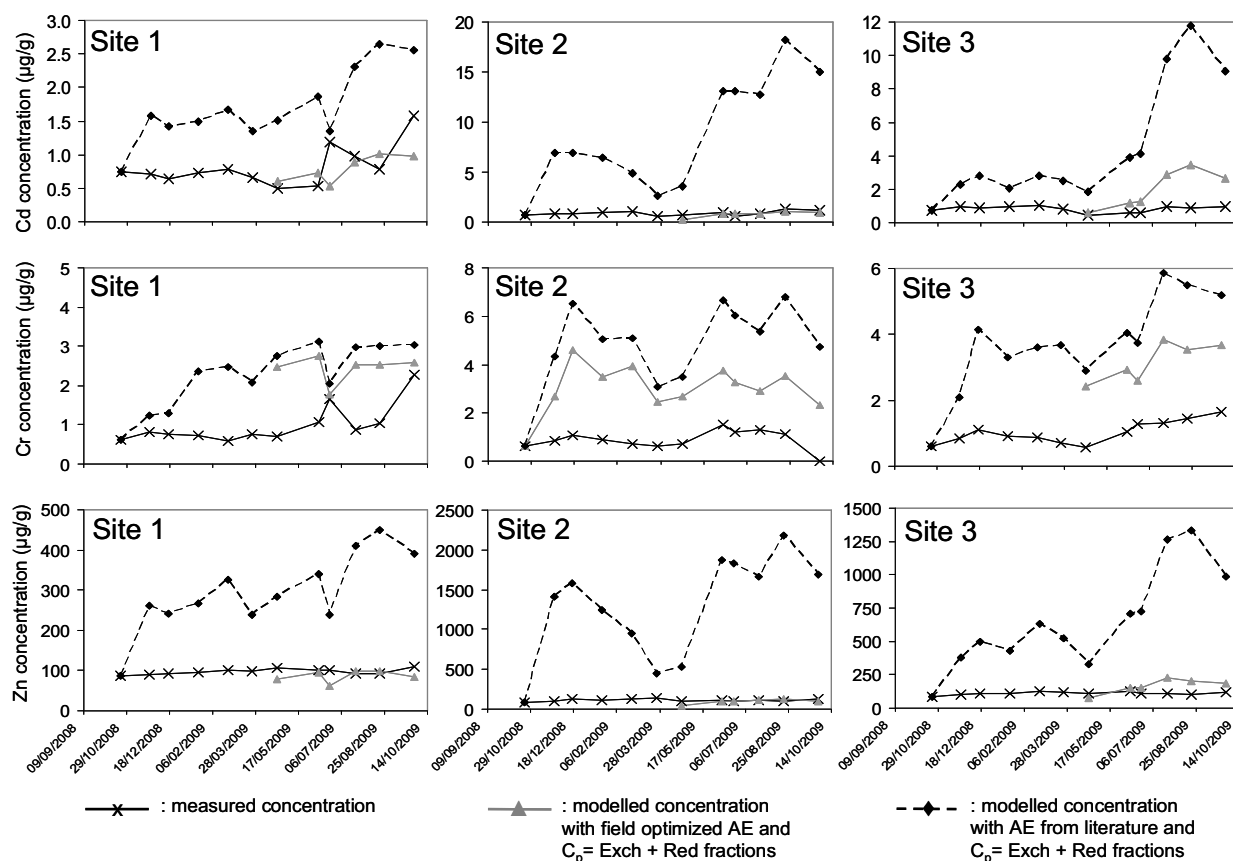


Figure S6: Measured and modelled metal concentration in zebra mussel ($\mu\text{g}\cdot\text{g}_{\text{dry wt}}^{-1}$) with AE from the literature or from optimization of field data.

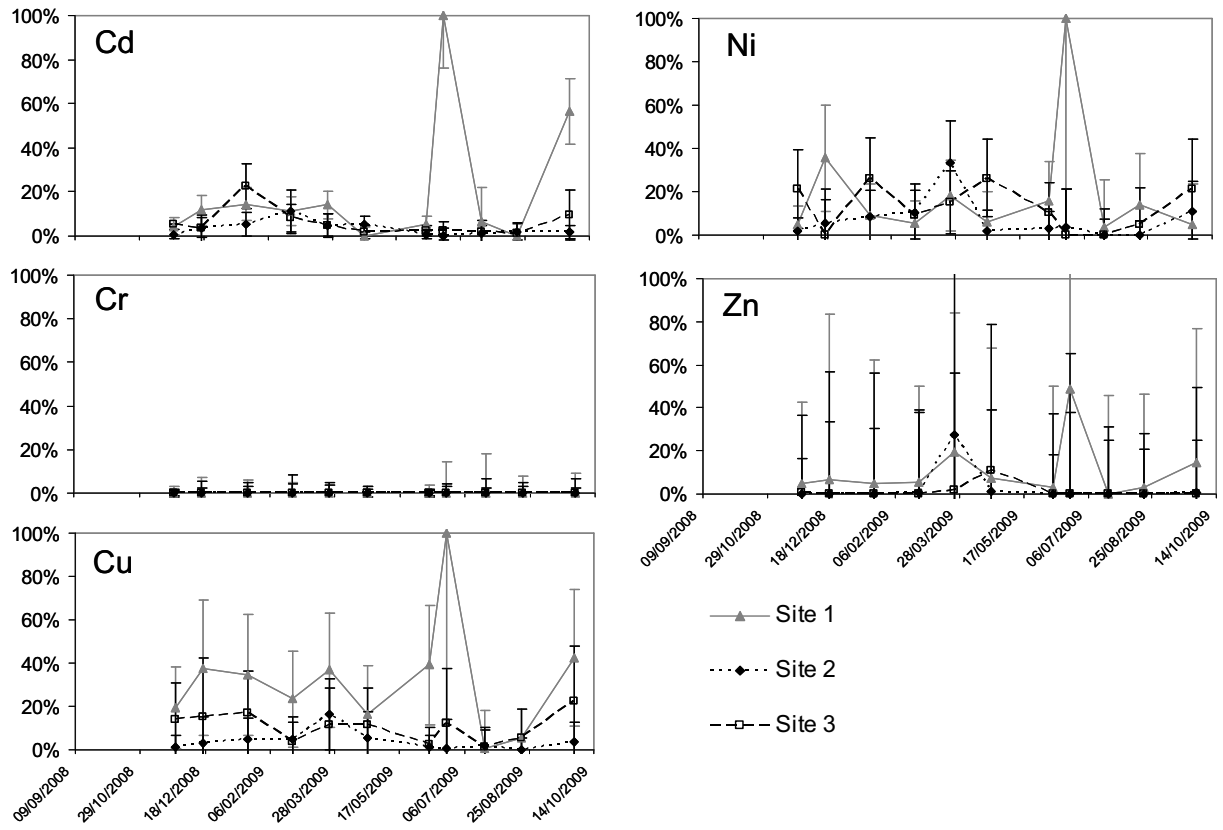


Figure S7: Temporal evolution of optimised assimilation efficiencies (AE) of Cd, Cr, Zn, Ni and Cu over time for the three sites.

Resolution of the first order differential equation

$$\frac{dC_m}{dt} = k_u \cdot C_w + AE \cdot IR \cdot C_f - (k_e + g) \cdot C_m \quad (1')$$

$$\text{with } C_{m_ss} = \frac{k_u \cdot C_w + AE \cdot IR \cdot C_f}{k_e + g} \quad (2')$$

From Equations 1' and 2', we obtained:

$$\frac{dC_m}{dt} = (k_e + g) \cdot C_{m_ss} - (k_e + g) \cdot C_m \quad (3')$$

The first order differential equation is:

$$\frac{dC_m}{dt} + (k_e + g) \cdot C_m = (k_e + g) \cdot C_{m_ss} \quad (4')$$

The solution of an equation $y' + ay = b$ is $y = a \cdot e^{-ax} + \frac{b}{a}$

Hence the solution of equation (4') is:

$$C_m(t) = a \cdot e^{-(k_e+g)t} + C_{m_ss} \quad (5')$$

Integrated both sides we obtain:

$$\int_{t_{i-1}}^{t_i} \ln C_m(t) = \int_{t_{i-1}}^{t_i} -(k_e + g) \cdot t + \beta$$

$$\ln \frac{C_m(t_i)}{C_m(t_{i-1})} = -(k_e + g) \cdot (t_i - t_{i-1}) + \beta$$

$$C_m(t_i) = \delta \cdot C_m(t_{i-1}) \cdot e^{-(k_e+g)(t_i-t_{i-1})} + C_{m_ss} \quad \text{with } \delta = 1 - \left(\frac{C_{m_ss}}{C_m(t_{i-1})} \right)$$

$$\text{Thus } C_m(t_i) = (C_m(t_{i-1}) - C_{m_ss}) \cdot e^{-(k_e+g)(t_i-t_{i-1})} + C_{m_ss}$$

$$C_m(t_i) = C_m(t_{i-1}) \cdot e^{-(k_e+g)(t_i-t_{i-1})} + C_{m_ss} \cdot (1 - e^{-(k_e+g)(t_i-t_{i-1})})$$

LITERATURE CITED

- (1) Roditi, H. A.; Fisher, N. S.; Sañudo-Wilhelmy, S. A. Field testing a metal bioaccumulation model for zebra mussels. *Environmental Science and Technology* **2000**, *34* (13), 2817-2825.
- (2) Luoma, S. N.; Rainbow, P. S. Why Is Metal Bioaccumulation So Variable? Biodynamics as a Unifying Concept. *Environmental Science and Technology* **2005**, *39* (7), 1921-1931.
- (3) Wang, W. X.; Fisher, N. S.; Luoma, S. N. Kinetic determinations of trace element bioaccumulation in the mussel *Mytilus edulis*. *Marine Ecology Progress Series* **1996**, *140* (1-3), 91-113.
- (4) Roditi, H. A.; Fisher, N. S. Rates and routes of trace element uptake in zebra mussels. *Limnology and Oceanography* **1999**, *44* (7), 1730-1749.
- (5) Croteau, M. N.; Luoma, S. N. Delineating copper accumulation pathways for the freshwater bivalve *Corbicula* using stable copper isotopes. *Environmental Toxicology and Chemistry* **2005**, *24* (11), 2871-2878.
- (6) Wang, W. X.; Fisher, N. S. Assimilation of trace elements and carbon by the mussel *Mytilus edulis*: Effects of food composition. *Limnol Oceanogr* **1996**, *41* (2), 197-207.
- (7) Wang, W.-X.; Fisher, N. S. Assimilation efficiencies of chemicals contaminants in aquatic invertebrates: a synthesis. *Environmental Toxicology and Chemistry* **1998**, *18* (8), 2034-2045.
- (8) Griscom, S. B.; Fisher, N. S.; Luoma, S. N. Geochemical influences on assimilation of sediment-bound metals in clams and mussels. *Environmental Science and Technology* **2000**, *34* (1), 91-99.
- (9) Wang, W. X.; Yan, Q. L.; Fan, W.; Xu, Y. Bioavailability of sedimentary metals from a contaminated bay. *Mar Ecol Prog Ser* **2002**, *240* 27-38.
- (10) Arifin, Z.; Bendell-Young, L. I. Feeding response and carbon assimilation by the blue mussel *Mytilus trossulus* exposed to environmentally relevant seston matrices. *Marine Ecology Progress Series* **1997**, *160* 241-253.
- (11) Arifin, Z.; Bendell-Young, L. I. Influence of a selective feeding behaviour by the blue mussel *Mytilus trossulus* on the assimilation of ^{109}Cd from environmentally relevant seston matrices. *Marine Ecology Progress Series* **2000**, *192* 181-193.
- (12) Stecko, J. R. P.; Bendell-Young, L. I. Uptake of ^{109}Cd from sediments by the bivalves *Macoma balthica* and *Protothaca staminea*. *Aquatic Toxicology* **2000**, *47* (3-4), 147-159.
- (13) Luoma, S. N. Can we determine the biological availability of sediment-bound trace elements? *Hydrobiologia* **1989**, *176-177* 379-396.
- (14) Griscom, S. B.; Fisher, N. S. Bioavailability of sediment-bound metals to marine bivalve molluscs: An overview. *Estuaries* **2004**, *27* (5), 826-838.
- (15) Bryan, G. W.; Langston, W. J. Bioavailability, accumulation and effects of heavy metals in sediments with special reference to United Kingdom estuaries. *Environmental Pollution* **1992**, *76* (2), 89-131.

- (16) Pueyo, M.; Rauret, G.; Lück, D.; Yli-Halla, M.; Muntau, H.; Quevauviller, P.; Lopez-Sanchez, J. F. 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* **2001**, 3 (2), 243-250.
- (17) Mayer, L. M.; Chen, Z.; Findlay, R. H.; Fang, J.; Sampson, S.; Self, R. F. L.; Jumars, P. A.; Quetel, C.; Donard, O. F. X. Bioavailability of sedimentary contaminants subject to deposit-feeder digestion. *Environmental Science and Technology* **1996**, 30 (8), 2641-2645.
- (18) Di Toro, D. M.; Mahony, J. D.; Hansen, D. J.; Scott, K. J.; Carlson, A. R.; Ankley, G. T. Acid volatile sulfide predicts the acute toxicity of cadmium and nickel in sediments. *Environmental Science and Technology* **1992**, 26 (1), 96-101.
- (19) Ahlf, W.; Drost, W.; Heise, S. Incorporation of metal bioavailability into regulatory frameworks-metal exposure in water and sediment. *Journal of Soils and Sediments* **2009**, 9 (5), 411-419.
- (20) Lee, B. G. Influences of dietary uptake and reactive sulfides on metal bioavailability from aquatic sediments. *Science* **2000**, 287 (5451), 282-284.
- (21) Li, L.; Xu, Z.; Wu, J.; Tian, G. Bioaccumulation of heavy metals in the earthworm *Eisenia fetida* in relation to bioavailable metal concentrations in pig manure. *Bioresource Technology* **2010**, 101 (10), 3430-3436.
- (22) Fan, W.; Wang, W. X. Extraction of spiked metals from contaminated coastal sediments: A comparison of different methods. *Environ Toxicol Chem* **2003**, 22 (11), 2659-2666.
- (23) De Jonge, M.; Blust, R.; Bervoets, L. The relation between Acid Volatile Sulfides (AVS) and metal accumulation in aquatic invertebrates: Implications of feeding behavior and ecology. *Environ Pollut* **2010**, 158 (5), 1381-1391.
- (24) Tusseau-Vuillemin, M. H.; Gourlay, C.; Lorgeoux, C.; Mouchel, J. M.; Buzier, R.; Gilbin, R.; Seidel, J. L.; Elbaz-Poulichet, F. Dissolved and bioavailable contaminants in the Seine river basin. *Science of the Total Environment* **2007**, 375 (1-3), 244-256.
- (25) Priadi, C.; Bourgeault, A.; Uher, E.; Ayrault, S.; Gourlay-Francé, C.; Tusseau-Vuillemin, M.-H. Time-integrated metal partitioning using sediment trap and DGT samplers versus discrete metal partitioning: Comparison of spatial and temporal variability in an urban river. **in prep.**
- (26) Priadi, C.; Ayrault, S.; Pacini, S.; Bonte, P. Urbanization impact of the Greater Paris Region on metal mobility in suspended sediments in the Seine River, France: Role of iron oxides *International Journal of environmental Science and Technology* **In press**.
- (27) Bourgeault, A.; Gourlay-Francé, C.; Tusseau-Vuillemin, M. H. Modelling the effect of water chemistry on the bioaccumulation of waterborne Cd in zebra mussels. *Environmental Toxicology and Chemistry* **2010**, 29 (10), 2182-2189.
- (28) Reeders, H. H.; Bij de Vaate, A. Zebra mussels (*Dreissena polymorpha*): a new perspective for water quality management. *Hydrobiologia* **1990**, 200-201 (1), 437-450.
- (29) Bervoets, L.; Voets, J.; Chu, S.; Covaci, A.; Schepens, P.; Blust, R. Comparison of accumulation of micropollutants between indigenous and transplanted zebra mussels (*Dreissena polymorpha*). *Environmental Toxicology and Chemistry* **2004**, 23 (8), 1973-1983.

- (30) Bourgeault, A.; Gourlay-Francé, C.; Vincent-Hubert, F.; Palais, F.; Geffard, A.; Biagianti-Risbourg, S.; Pain-Devin, S.; Tusseau-Vuillemin, M.-H. Lessons from a transplantation of zebra mussels into a small urban river: An integrated ecotoxicological assessment *Environmental Toxicology* **2010**, *25* (5), 468-478.
- (31) Larner, B. L.; Palmer, A. S.; Seen, A. J.; Townsend, A. T. 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* **2008**, *608* (2), 147-157.
- (32) Dunn, O. J. Multiple Comparisons Using Rank Sums. *Technometrics* **1964**, *6* (3), 241-252.
- (33) Guan, R.; Wang, W. X. Multiphase biokinetic modeling of cadmium accumulation in *Daphnia magna* from dietary and aqueous sources. *Environmental Toxicology and Chemistry* **2006**, *25* (11), 2840-2846.
- (34) Ferreira, D.; Tousset, N.; Ridame, C.; Tusseau-Vuillemin, M. H. More than inorganic copper is bioavailable to aquatic mosses at environmentally relevant concentrations. *Environmental Toxicology and Chemistry* **2008**, *27* (10), 2108-2116.
- (35) Tusseau-Vuillemin, M. H.; Gilbin, R.; Bakkaus, E.; Garric, J. Performance of diffusion gradient in thin films to evaluate the toxic fraction of copper to *Daphnia magna*. *Environmental Toxicology and Chemistry* **2004**, *23* (9), 2154-2161.
- (36) Phillips, D. J. H. *Quantitative Aquatic Biological Indicators: Their Use to Monitor Trace Metal and Organochlorine Pollution*; Applied Science Publishers Ltd.: London, 1980.
- (37) Frenay, K. "Bioaccumulation du nickel chez une moule d'eau douce (*Dreissena polymorpha*): influence de la physicochimie de l'eau," Cemagref, Rapport de Master. Master Systèmes aquatiques et gestion de l'eau 2010.
- (38) Zaroogian, G. E.; Johnson, M. Nickel uptake and loss in the bivalves *Crassostrea virginica* and *Mytilus edulis*. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* **1984**, *13* (4), 411-418.
- (39) Mersch, J.; Morhain, E.; Mouvet, C. Laboratory accumulation and depuration of copper and cadmium in the freshwater mussel *Dreissena polymorpha* and the aquatic moss *Rhynchostegium riparioides*. *Chemosphere* **1993**, *27* (8), 1475-1485.
- (40) Voets, J.; Talloen, W.; de Tender, T.; van Dongen, S.; Covaci, A.; Blust, R.; Bervoets, L. Microcontaminant accumulation, physiological condition and bilateral asymmetry in zebra mussels (*Dreissena polymorpha*) from clean and contaminated surface waters. *Aquatic Toxicology* **2006**, *79* (3), 213-225.
- (41) Camusso, M.; Balestrini, R.; Binelli, A. Use of zebra mussel (*Dreissena polymorpha*) to assess trace metal contamination in the largest Italian subalpine lakes. *Chemosphere* **2001**, *44* (2), 263-270.
- (42) De Lafontaine, Y.; Gagné, F.; Blaise, C.; Costan, G.; Gagnon, P.; Chan, H. M. Biomarkers in zebra mussels (*Dreissena polymorpha*) for the assessment and monitoring of water quality of the St Lawrence River (Canada). *Aquatic Toxicology* **2000**, *50* (1-2), 51-71.
- (43) Meybeck, M.; Lestel, L.; Bonté, P.; Moilleron, R.; Colin, J. L.; Rousselot, O.; Hervé, D.; de Pontevès, C.; Grosbois, C.; Thévenot, D. R. 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* **2007**, 375 (1-3), 204-231.

(44) Reeders, H. H.; Bij De Vaate, A.; Slim, F. J. The filtration rate of *Dreissena polymorpha* (Bivalvia) in three Dutch lakes with reference to biological water quality management. *Freshwater Biology* **1989**, 22 (1), 133-141.

Résumé

Dans le contexte réglementaire de la Directive Cadre sur l'Eau, il est nécessaire d'évaluer l'impact de la contamination métallique sur les milieux aquatiques pour pouvoir établir un diagnostic des masses d'eau. Intégrer dans ce diagnostic, la biodisponibilité des métaux par une mesure de la bioaccumulation dans des organismes modèles, permet d'évaluer plus finement le risque pour l'environnement. Cependant le lien entre la bioaccumulation et la contamination chimique du milieu reste difficile à établir puisqu'il dépend de paramètres physicochimiques et physiologiques.

Afin de faire ce lien chez la moule zébrée, nous avons utilisé un modèle cinétique de bioaccumulation: le modèle biodynamique. Des expositions en laboratoire ont permis d'étudier l'influence de la physicochimie de l'eau (concentration en calcium, zinc et matière organique dissoute) sur les constantes d'accumulation du modèle par voie dissoute et de mettre au point un protocole d'exposition permettant de déterminer les constantes d'assimilation par voie trophique. L'effet compétiteur des ions (Ca et Zn) sur l'accumulation du Cd et du Ni par voie dissoute a été mis en évidence et intégré au modèle biodynamique par une approche s'inspirant du modèle du ligand biologique (BLM).

Des suivis de contamination de dreissènes transplantées, de 2 mois et 1 an, ont mis en évidence la capacité du modèle à relier la contamination métallique du milieu à celle des organismes, en prenant en compte la physicochimie du milieu (notamment le niveau trophique) et la physiologie de l'organisme (taux de filtration, taux de croissance).

Mots clés: Bioaccumulation, Métaux, Biodisponibilité, Facteurs de contrôle, *Dreissena polymorpha*, Modèle Biodynamique

Abstract

In the context of the Water Framework Directive, it is necessary to evaluate the impact of metal contamination on aquatic environments in order to establish a diagnosis of aquatic systems. Integrating bioavailability of metals in this diagnosis by measuring the bioaccumulation in model organisms allows assessing more accurately the risk to the environment. However the relationship between bioaccumulation and chemical contamination of the environment is not direct since it depends on physicochemical and physiological parameters.

To make this link in zebra mussels, we used a bioaccumulation kinetic model: the biodynamic model. Laboratory exposures were performed to examine the influence of the water physico-chemistry (concentration of calcium, zinc and dissolved organic matter) on the dissolved accumulation constant. The competing effect of ions (Ca and Zn) on the accumulation of dissolved Cd and Ni was demonstrated and integrated into the biodynamic model by an approach similar to the Biolotic Ligand Model (BLM). A protocol of exposure was established to determine the constants of dietborne assimilation.

A bioaccumulation monitoring in transplanted zebra mussels, during 2 months and 1 year, showed the ability of the model to relate the metal contamination of the environment to the bioaccumulation, taking into account the physico-chemistry of the environment (including trophic level) and the physiology of the organism (filtration rate, growth rate).

Key-words: Bioaccumulation, Metals, Bioavailability, Confounding factors, *Dreissena polymorpha*, Biodynamic Model