



HAL
open science

Modélisation de la bioaccumulation des métaux par voie dissoute chez le genre *Gammarus* : influence des facteurs environnementaux et de l'histoire de vie des organismes

Nastassia Urien

► To cite this version:

Nastassia Urien. Modélisation de la bioaccumulation des métaux par voie dissoute chez le genre *Gammarus* : influence des facteurs environnementaux et de l'histoire de vie des organismes. Ecologie, Environnement. Université Claude Bernard - Lyon I, 2015. Français. NNT : 2015LYO10242 . tel-01273362

HAL Id: tel-01273362

<https://theses.hal.science/tel-01273362>

Submitted on 12 Feb 2016

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.



UNIVERSITÉ LYON 1 – CLAUDE BERNARD

ÉCOLE DOCTORALE : *Évolution Écosystèmes Microbiologie Modélisation*

THÈSE DE DOCTORAT

Spécialité : Écotoxicologie des milieux aquatiques

Soutenue publiquement le 24 novembre 2015 par :

Nastassia URIEN

**Modélisation de la bioaccumulation des métaux par voie dissoute
chez le genre *Gammarus* : influence des facteurs environnementaux
et de l’histoire de vie des organismes**

Thèse dirigée par Olivier GEFFARD (Irstea, Lyon-Villeurbanne)

et encadrée par Jérémie D. LEBRUN (Irstea, Antony)

Jury :

M. Peter G.C. CAMPBELL	INRS - Université du Québec (Canada)	Rapporteur
Mme Annette DE VAUFLEURY	Université de Franche-Comté, Besançon	Rapporteur
Mme Sandrine CHARLES	Université Claude Bernard, Lyon 1	Examineur
M. Alexandre PERY	AgroParisTech (Paris)	Examineur
Mme Catherine GOURLAY-FRANCÉ	ANSES (Maison-Alfort)	Examineur

UNIVERSITE CLAUDE BERNARD - LYON 1

Président de l'Université

M. François-Noël GILLY

Vice-président du Conseil d'Administration

M. le Professeur Hamda BEN HADID

Vice-président du Conseil des Etudes et de la Vie Universitaire

M. le Professeur Philippe LALLE

Vice-président du Conseil Scientifique

M. le Professeur Germain GILLET

Directeur Général des Services

M. Alain HELLEU

COMPOSANTES SANTE

Faculté de Médecine Lyon Est – Claude Bernard

Directeur : M. le Professeur J. ETIENNE

Faculté de Médecine et de Maïeutique Lyon Sud – Charles Mérieux

Directeur : Mme la Professeure C. BURILLON

Faculté d'Odontologie

Directeur : M. le Professeur D. BOURGEOIS

Institut des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques

Directeur : Mme la Professeure C. VINCIGUERRA

Institut des Sciences et Techniques de la Réadaptation

Directeur : M. le Professeur Y. MATILLON

Département de formation et Centre de Recherche en Biologie Humaine

Directeur : Mme. la Professeure A-M. SCHOTT

COMPOSANTES ET DEPARTEMENTS DE SCIENCES ET TECHNOLOGIE

Faculté des Sciences et Technologies

Directeur : M. F. DE MARCHI

Département Biologie

Directeur : M. le Professeur F. FLEURY

Département Chimie Biochimie

Directeur : Mme Caroline FELIX

Département GEP

Directeur : M. Hassan HAMMOURI

Département Informatique

Directeur : M. le Professeur S. AKKOUCHE

Département Mathématiques

Directeur : M. le Professeur Georges TOMANOV

Département Mécanique

Directeur : M. le Professeur H. BEN HADID

Département Physique

Directeur : M. Jean-Claude PLENET

UFR Sciences et Techniques des Activités Physiques et Sportives

Directeur : M. Y. VANPOULLE

Observatoire des Sciences de l'Univers de Lyon

Directeur : M. B. GUIDERDONI

Polytech Lyon

Directeur : M. P. FOURNIER

Ecole Supérieure de Chimie Physique Electronique

Directeur : M. G. PIGNAULT

Institut Universitaire de Technologie de Lyon 1

Directeur : M. le Professeur C. VITON

Ecole Supérieure du Professorat et de l'Education

Directeur : M. le Professeur A. MOUGNIOTTE

Institut de Science Financière et d'Assurances

Directeur : M. N. LEBOISNE

Remerciements

Ce travail de thèse est né d'une collaboration entre les laboratoires d'écotoxicologie d'Irstea Lyon-Villeurbanne (Unité de recherche MAEP) et Antony (Unité de recherche HBAN). Aussi, je souhaite remercier Didier Pont, Nathalie Touze et Pascal Boistard de m'avoir accueillie au sein de ces deux unités.

Ce travail a bénéficié du soutien financier du projet ANR SequAdapt (programme BIOADAPT) et de l'ONEMA dans le cadre d'un partenariat ONEMA-Irstea (Fiche action 36).

Si je reprends le fil de l'histoire, je souhaite remercier tout d'abord Catherine Gourlay-Francé, responsable de l'équipe d'écotoxicologie d'Irstea Antony, de m'avoir accueillie au sein de son équipe pour mon stage de fin d'études. Je remercie par la même occasion Jérémie Lebrun, d'avoir accepté de m'encadrer lors de ce stage. Quand je relis les remerciements de mon rapport de stage, il est écrit : «Je tiens à remercier sincèrement Jérémie pour sa (bio)disponibilité et son dynamisme. Il m'a donné goût à l'écotoxicologie, domaine dans lequel j'espère continuer à évoluer prochainement... ». Je crois que c'est chose faite... Jérémie, je te remercie donc encore une fois pour cela et aussi d'avoir accepté de continuer l'aventure en encadrant ma thèse (une première pour toi). Je souhaite également remercier chaleureusement mon directeur de thèse, Olivier Geffard, de m'avoir permis de réaliser tout ce travail et de toujours m'avoir fait confiance et soutenue.

Je suis très honorée que Peter G. C. Campbell, Professeur à l'INRS à Québec, et Anne De Vaufléury, Maître de conférences à l'université de Franche-Comté (Besançon), aient accepté de rapporter mon travail de thèse. Je remercie tout particulièrement le professeur P. G. C. Campbell d'avoir tout mis en œuvre pour assister à ma soutenance en direct depuis Canberra, malgré le décalage horaire et les contraintes liées à une visioconférence. Je suis très reconnaissante à Catherine Gourlay-Francé, Sandrine Charles et Alexandre Péry d'avoir accepté de faire partie des membres du jury.

Je remercie également les membres de mes comités de thèse : Adeline Bourgeault, Magalie Baudrimont, Arnaud Chaumont, Lise Fechner, Marina Coquery, Jeanne Garric et Sandrine Charles.

Je tiens à remercier Sophie Ayrault, du laboratoire LSCE, d'avoir fourni un accès à l'ICP-MS pour la réalisation d'analyses en métaux pour une partie de mes échantillons, ainsi que Louise pour son support technique indispensable. Je remercie également les analystes, Nadine Derlet et Nina Pourette, de la plateforme chimie d'Irstea Antony pour les analyses physicochimiques ainsi que les analystes du LAMA (Irstea Lyon), en particulier Josiane Gahou et Lysiane Dherret, pour l'analyse des échantillons de la campagne nationale ainsi que mes échantillons de dernière minute en fin de thèse.

Je remercie également la fine équipe de Lyon, en particulier pour les sorties terrain. Adeline, j'ai pris un réel plaisir à me rendre à nos rendez-vous annuels (Biomarqu'Indic) pour sillonner le bassin de la Seine sous les couleurs d'automne et encager des gammares par tous les temps, même à la lumière d'un réverbère ! Je te promets, dès que je le peux, je fonce à Nigloland !

Un grand merci à toute l'équipe d'écotoxicologie d'Antony pour ces trois années de bonne humeur, de labo intensif, mais toujours « en chanson », de mots-fléchés, de thés, de gâteaux et bonbons en tout genre ! Merci Mathieu et Marine pour Radio Nostalgie et Daniel Balavoine à tue-tête dans la voiture terrain. Merci Violaine pour ton punch et les glissades sur le verglas... « à la pêche aux moules, je ne veux plus y aller... » n'a jamais sonné aussi juste. Emma, merci pour tous tes conseils, ton assistance, ton temps au laboratoire et lors de mes déboires avec l'AAS. Merci aussi pour la manip' aux « mille échantillons », j'espère que tu ne fais plus trop de cauchemars... Lise, merci d'avoir toujours pris le temps de répondre à mes questions, de t'être rendue disponible pour relire mes articles, merci pour tes conseils constructifs et tes encouragements. Armelle, j'ai été enchantée de partager mon bureau avec toi, même si cela n'a pas duré longtemps. Je te souhaite bon courage pour la suite. Merci Juliette pour tous tes petits conseils et ton humour. Je tiens à remercier Antoine, que j'ai encadré lors de son stage de fin d'études et qui a contribué à la réussite de ce travail de thèse. Merci pour ton enthousiasme, ta bonne humeur et ton implication. Merci à Rym également, « mafich'mouch'kil » (en phonétique bien sûr !). Un énorme merci à Irène, sans qui toutes ces expériences n'auraient pas eu lieu. Merci d'avoir toujours accepté de « manipuler » à mes côtés (au laboratoire comme sur le terrain) même si je chante faux et malgré les journées parfois intenses et le rythme que j'imposais. Merci pour ta constante bonne humeur, quel plaisir de travailler dans ces conditions. Je te souhaite le meilleur pour l'avenir. Enfin, Anne-So, ma collègue de galère pendant la rédaction... Merci pour ton soutien, les rendez-vous à 7h30 et les pauses-café. Cela a été un plaisir de partager le bureau avec toi ces dernières semaines. Je te souhaite plein de bonnes choses pour la suite.

Jérémy, imagine, une vie sans une doctorante pour te donner des nœuds dans la tête !?! J'espère que tu dors mieux depuis que je suis partie... Tout de même, je tiens à te remercier pour tous les échanges que nous avons eus durant ces trois ans et demi et qui m'ont beaucoup apporté. Je suis passée de « petit mec » à « madame crevette »... Merci de m'avoir transmis le goût pour l'écotox (la science est avec moi !), de m'avoir initiée aux joies du labo et surtout du terrain, ma partie préférée, surtout quand je m'embourbe dans les champs ou que tu « marches/voles » sur l'eau... Merci de m'avoir fait confiance et de m'avoir impliquée dans les autres projets de l'équipe (PIREN, Biomarqu'Indic) et de m'avoir toujours encouragée à valoriser mes travaux en participant à de nombreuses conférences. Le comique de répétition est ma spécialité, alors encore une fois, merci pour ta (bio)disponibilité et ta patience aussi...

J'ai également une pensée pour toi Olivier Delaigue, merci d'avoir assuré l'assistance R pendant la rédaction et d'avoir gentiment pris en charge l'envoi des manuscrits. Je te dois bien un Orangina ou deux !..

Je tiens à remercier chaleureusement toutes les personnes qui ont contribué de près ou de loin à la qualité de l'environnement dans lequel s'est déroulée cette thèse. Je pense particulièrement à la « team volley » et à la « team frisbee », merci Pierre, Florent, François, Simon P., Simon S, Valérie, Louise, Laure, Guillaume, Olivier, Sylvain, Yannick, Julien, Carina, Carine et ceux que j'oublie pour ce défouloir ! Merci également à team Earth Kitchen : Laure, Louise, Julie, Violaine, Laeti, Armelle, Irène, Carina et Carolina. Je ne suis pas prête d'oublier toutes les soirées chez Mamane, où la Chouffe coule à flot et le temps passe si vite...

Merci à tous les copains rennais, les copains du foyer de Cachan. Un merci tout particulier à Marianna et Fx, de m'avoir accueillie et de vous être occupés de moi à Lyon lors de mes réunions, comités, formations et pour ma soutenance... Vous êtes les bienvenus chez les caribous ! Manu, je tiens à te remercier du fond du cœur pour ton soutien durant ce parcours qui m'a menée jusqu'à cette aventure qu'est la thèse. Je te souhaite de réussir, et qui sait, peut-être qu'un jour, l'enseignement de l'écotoxicologie à l'école primaire sera obligatoire !

Marie-Gabrielle, merci d'avoir relu attentivement mon manuscrit. J'espère avoir mis des virgules à peu près là où il fallait dans mes remerciements. Audrey, many thanks for the review.

Enfin, merci à ma famille de m'avoir soutenue (merci maman pour les bouts de relecture et le détournement des gammars !). Alice, dépêche-toi d'être docteur et on écrira des articles ensemble « Urien et Urien, 20XX » !!

Pierre, la curiosité, l'enthousiasme je l'avais déjà... mais tu m'as transmis quelque chose qui pousse à faire plus, à faire mieux, et je me suis prise au jeu...Merci pour tout ce que tu m'as apporté pendant deux ans (malgré cet océan qui nous a parfois séparés). Je n'irai pas jusqu'à me faire pousser la barbe, mais tu as été une source d'inspiration pour moi... alors pour tout cela, merci !

Résumé

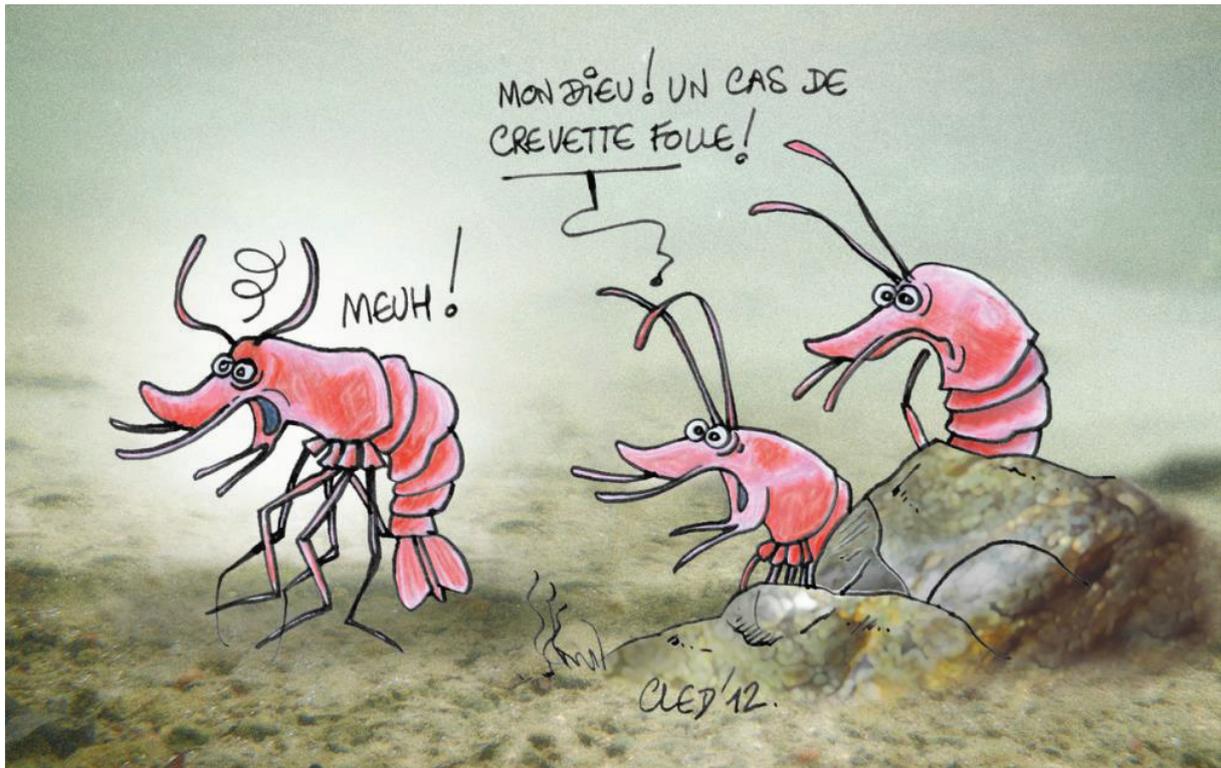
L'utilisation du biote dans le suivi de la contamination métallique des milieux aquatiques est aujourd'hui une approche pertinente, car elle permet (i) de répondre aux difficultés analytiques liées à la présence des métaux à faible dose dans l'eau, (ii) d'intégrer la contamination dans le temps et (iii) de renseigner sur la biodisponibilité des métaux et leur potentiel toxique. Toutefois, l'interprétation des niveaux de contamination des organismes en termes de contamination biodisponible des milieux est difficile car elle dépend de facteurs confondants (physicochimiques et biologiques). Dans ce contexte, l'objectif de ce travail de thèse est d'étudier la variabilité des capacités de bioaccumulation des métaux par voie dissoute chez le gammare, en s'appuyant sur un modèle cinétique. Des expérimentations en laboratoire ont permis d'étudier l'influence de facteurs physicochimiques (cations majeurs de l'eau) et biologiques (histoire de vie) sur les constantes d'accumulation et d'élimination du modèle pour le Cd, le Cu, le Ni et le Pb. Les résultats de ces travaux ont montré l'importance de prendre en compte l'influence des teneurs calciques du milieu et la pré-exposition des gammarès à certains métaux dans l'interprétation de la bioaccumulation. Des suivis de la contamination dans des gammarès transplantés *in situ* à l'échelle de la France ont montré les limites du modèle pour relier la contamination du milieu à celle des organismes. Ainsi, pour une meilleure caractérisation de la contamination biodisponible des milieux, il est nécessaire d'approfondir les connaissances sur l'influence d'autres facteurs physicochimiques et sur l'importance de la voie trophique comme source de contamination biodisponible pour les gammarès.

Mot clés : Bioaccumulation, biodisponibilité, métaux traces, modèle cinétique, *Gammarus*, facteurs environnementaux, histoire de vie

Abstract

The use of biota in order to monitor metallic contamination in freshwaters is a relevant tool to (i) overcome difficulties of measuring low concentrations in water, (ii) integrate metal fluctuations over time and, (iii) quantify the bioavailable fraction of metals, considered as potentially toxic. However, the interpretation of metal contents in aquatic organisms in terms of bioavailable contamination in freshwaters remains complex because it depends on confounding factors (physicochemical and biotic factors). In this context, the aim of this work was to study the variability of waterborne metal bioaccumulation abilities in gammarids, using the kinetic model. In the laboratory, the influence of water chemistry (major ions) and biological factors (local acclimation) on the accumulation and elimination rate constants of the kinetic model was assessed. The results showed that the consideration of calcium concentrations in water and the pre-exposure of gammarids to some metals were crucial for a reliable interpretation of bioaccumulation. Meanwhile, metal contamination was followed in transplanted gammarids at the national-scale (France) and showed the limits of kinetic modelling to link metal contamination in water to bioaccumulation. Therefore, to better characterize the bioavailable contamination in freshwaters, it is necessary to further study the influence of other physicochemical factors, such as temperature, and the importance of food as a source of bioavailable metals for gammarids.

Key-words: Bioaccumulation, bioavailability, trace metal, kinetic model, *Gammarus*, environmental factors, life history



Avec l'aimable autorisation de Cled'12.

Sommaire

Liste des publications et des communications.....	I
Liste des documents en annexe.....	IV
Liste des abréviations utilisées (par ordre alphabétique)	V
Introduction	1
Objectif de la thèse	5
Démarche scientifique et organisation du manuscrit	5
I. État des connaissances.....	9
II. Matériels et méthodes.....	49
III. Modélisation de la bioaccumulation des métaux par voie dissoute chez le gammaré : influence des facteurs physicochimiques et validation des modèles in situ	89
IV. Variabilité naturelle inter-populations des capacités de bioaccumulation des métaux par voie dissoute chez le genre Gammarus.....	139
V. Effet d'une exposition métallique chronique sur la capacité de bioaccumulation des métaux chez Gammarus.....	165
VI. Discussion générale.....	201
Conclusion et perspectives.....	211
Annexes	214
Références	219
Table des matières	238

Liste des publications et des communications

PUBLICATIONS

N. Urien, E. Uher, E. Billoir, O. Geffard, L.C. Fehner., J.D. Lebrun. 2015. A biodynamic model predicting waterborne lead bioaccumulation in *Gammarus pulex*: Influence of water chemistry and *in situ* validation. Environ. Pollut. 203, 22–30. doi:10.1016/j.envpol.2015.03.045

J.D. Lebrun, O. Geffard, **N. Urien**, A. François, E. Uher, L.C. Fehner. 2015. Seasonal variability and inter-species comparison of metal bioaccumulation in caged gammarids under urban diffuse contamination gradient: Implications for biomonitoring investigations. Sci. Total Environ. 511, 501–508. doi:10.1016/j.scitotenv.2014.12.078

N. Urien, I. Friedel, L. C. Fehner, A. Chaumot, O. Geffard, J. D. Lebrun. Environmental relevance of laboratory-derived kinetic models to predict metal bioaccumulation in gammarids: field experimentation at the national scale (France). (Soumis au journal “Water Research ”)

N. Urien, I. Friedel, O. Geffard, J.D. Lebrun. Assessing the variability of metal bioaccumulation kinetics among populations of gammarids from uncontaminated freshwaters: towards generalized modeling of metal bioaccumulation. (En préparation pour le journal “Aquatic toxicology ”)

N. Urien, I. Friedel, A. Farfarana, L.C. Fehner, A. Chaumot, O. Geffard, J. D. Lebrun: Effects of metal field-exposure history on waterborne bioaccumulation kinetics of Ni, Pb and Cd in gammarid species. (En préparation pour le journal “Environmental pollution ”)

COMMUNICATIONS ORALES

Colloques internationaux

N. Urien, O. Geffard, L.C. Fechner, E. Billoir, A. Chaumot, J.D. Lebrun. **Society of Environmental Toxicology and Chemistry Europe 25th Annual Meeting** (SETAC, Barcelona, Espagne, 2015). *“Between-population variability of waterborne metal bioaccumulation in Gammarus sp. from uncontaminated freshwaters.”*

N. Urien, E. Uher, L.C. Fechner, O. Geffard, J.D. Lebrun. **14th European Meeting on Environmental Chemistry** (EMEC, Budva, Montenegro, 2013). *“Modelling Pb, Cd and Ni bioaccumulation in Gammarus pulex: Application to realistic environmental conditions and importance of water chemistry.”*

N. Urien, J. D. Lebrun, O. Geffard, E. Uher, C. Gourlay-Francé. **Society of Environmental Toxicology and Chemistry Europe 23th annual meeting** (SETAC, Glasgow, UK, 2013). *“Modelling the effects of water chemistry on the bioaccumulation of waterborne lead (Pb) by Gammarus pulex: From laboratory to field.”*

Colloques nationaux

N. Urien, J. Faburé, J. D. Lebrun, E. Uher, O. Geffard, L. Fechner, H. Budzinski, G. Munoz et **P. Labadie**. **Atelier du PIREN-Seine** : Réponses du biota comme outils d'évaluation et de suivi de la qualité des milieux aquatiques (CNRS-Paris 6, France, 2015). *“Variabilité spatio-temporelle de la bioaccumulation des contaminants métalliques et organiques en Seine chez des organismes modèles: Biofilms et Gammares.”*

<http://www.sisyphes.upmc.fr/piren/?q=event/2028>

N. Urien, A. Farfarana, I. Friedel, E. Uher, A. Chaumot, A. François, O. Geffard, L.C. Fechner, J. D. Lebrun. **Société Française d'Ecotoxicologie Appliquée** (SEFA, Besançon, France, 2014). *“Variabilité de la bioaccumulation des métaux chez le genre Gammarus: Implication dans l'évaluation de la contamination biodisponible des milieux aquatiques ?”*

N. Urien, J.D. Lebrun, E. Uher, C. Gourlay-Francé. **PIREN-Seine** (Paris, France, 2013). *"Modélisation des facteurs physiologiques et chimiques contrôlant la bioaccumulation du plomb (Pb) chez Gammarus pulex: Application au bassin versant de la Seine."*

POSTERS

Colloques internationaux

N. Urien, J.D. Lebrun, A. Farfarana, A. Chaumot, L.C. Fechner, O. Geffard. **Society of Environmental Toxicology and Chemistry Europe 25th Annual Meeting** (SETAC, Barcelona, Espagne, 2015). *"Contrasting abilities of metal bioaccumulation in Gammarus populations with different exposure histories."*

J.D. Lebrun, **N. Urien**, I. Friedel, E. Gismondi, J.P. Thomé, L.C. Fechner. **Society of Environmental Toxicology and Chemistry Europe 25th Annual Meeting, POSTER CORNER** (Barcelona, Espagne, 2015). *"Consequences of adaptation of gammarids to chronic metallic exposures: Alterations of biological functions."*

N. Urien, E. Uher, L.C. Fechner, O. Geffard, J.D. Lebrun. **Society of Environmental Toxicology and Chemistry Europe 24th Annual Meeting** (Basel, Switzerland, 2014). *"Modelling Pb and Cd bioaccumulation in Gammarus pulex: Application to realistic environmental conditions and consideration of water chemistry."*

J.D. Lebrun, **N. Urien**, O. Geffard, L.C. Fechner. **Society of Environmental Toxicology and Chemistry Europe 24th Annual Meeting** (Basel, Switzerland, 2014). *"Seasonal variability of metal bioaccumulation in gammarids and inter-species comparison: A biomonitoring investigation under an urban diffusive contamination gradient."*

Colloques nationaux

N. Urien, E. Uher et J.D. Lebrun. **Société Française d'Écotoxicologie Appliquée** (SEFA, Thionville, France, 2013). *"Modélisation de la bioaccumulation du Pb par voie dissoute chez Gammarus pulex : Influence de la chimie de l'eau."*

Liste des documents en annexe

Annexe 1 : Clé de détermination du genre Gammarus (d'après Că răușu et al., 1955; Goedmakers, 1981; Nagel, 1989).....	214
Annexe 2 : Protocole de digestion acide de tissus biologiques en digiprep.....	215
Annexe 3 : Fiche de conformité EMR – CE278k.....	217

Liste des abréviations utilisées (par ordre alphabétique)

AAS	<i>Atomic absorption spectrometry (spectrométrie à absorption atomique)</i>
BBAC	<i>Bioavailable background assessment concentration (valeurs seuils de contamination biodisponible)</i>
BLM	<i>Biotic ligand model (modèle du ligand biotique)</i>
DCE	<i>Directive cadre européenne sur l'eau</i>
DGT	<i>Diffusive gradient in thin film (gradient de diffusion en couche mince)</i>
ETM	<i>Elément trace métallique</i>
FIAM	<i>Free ion activity model (modèle de l'ion libre)</i>
ICP-MS	<i>Inductively coupled plasma - mass spectrometry (spectrométrie de masse couplée à un plasma inductif)</i>
Mⁿ⁺	<i>Cation métallique M</i>
MOD	<i>Matière organique dissoute</i>
MRG	<i>Metal-rich granule</i>
MTLP	<i>Metallothionein protein like</i>
NQE	<i>Norme de qualité environnementale</i>
PCB	<i>Polychlorobiphényles</i>
PNEC	<i>Predicted no effect concentration (concentration sans effet prévisible pour l'environnement)</i>
ROCCH	<i>Réseau d'observation de la contamination chimique</i>
RCS	<i>Réseau de contrôle de surveillance national</i>
SDAGE	<i>Schéma directeur d'aménagement et de gestion des eaux</i>

Eléments métalliques

As	arsenic	Hg	mercure
Cd	cadmium	Ni	nickel
Co	cobalt	Pb	plomb
Cr	chrome	Se	sélénium
Cu	cuivre	Zn	zinc
Fe	fer		

Introduction

Les éléments traces métalliques (ETM) sont naturellement présents dans la croûte terrestre et sont disséminés dans l'environnement (air, sol, eau) via des phénomènes tels que l'érosion et les retombées atmosphériques lors de feux de forêts et d'éruptions volcaniques. Toutefois, l'augmentation de la dissémination des ETM dans l'environnement, constatée durant ces dernières décennies, ainsi que le changement de leur spéciation (transformation en formes chimiques plus mobilisables pour les organismes) et de leur répartition sont majoritairement attribuables à l'intensification des activités humaines telles que l'industrialisation (mines, métallurgie, etc.), l'urbanisation (matériaux de construction, routes, etc.) et l'agriculture (engrais, pesticides) (Brignon et al., 2005). Les ETM sont particulièrement préoccupants, car ce sont des éléments non biodégradables qui se concentrent dans les milieux aquatiques, réceptacles ultimes de la contamination. Certains métaux, comme le mercure (Hg) et le plomb (Pb), sont dits « non-essentiels », car ils n'ont aucun rôle biologique connu chez les organismes. Leur présence, même à de faibles doses, se traduit par des effets toxiques pour les organismes (Wang and Rainbow, 2006). D'autres métaux, comme le cuivre (Cu) et le zinc (Zn), sont essentiels au métabolisme des organismes dans une gamme de concentrations optimales, au-delà desquelles, toutefois, des effets délétères sont observables (Atli and Canli, 2011). Ainsi, les ETM exercent une pression chronique et diffuse dans les milieux aquatiques, pouvant conduire à des modifications de la biodiversité (pression de sélection de certaines espèces et extinction d'autres espèces) et entraîner de graves conséquences sur le fonctionnement des écosystèmes, comme, par exemple, une réduction de la dégradation de la litière de feuilles, étape indispensable dans le cycle du carbone et des nutriments dans les rivières (Cain et al., 2004; Roussel et al., 2008). Dans les cours d'eau, les ETM les plus fréquemment trouvés sont l'As (arsenic), le Cd, le Cr (chrome), le Cu, le Hg, le Ni, le Pb et le Zn, car ce sont les plus utilisés dans les activités humaines (Fechner et al., 2011; Lebrun et al., 2015, 2014; Thévenot et al., 2009; Tusseau-Vuillemin et al., 2007).

Afin de protéger les écosystèmes aquatiques et la santé humaine, la surveillance de l'état chimique des masses d'eau est aujourd'hui une question centrale, qui figure parmi les objectifs de la directive cadre européenne sur l'eau (DCE) (DCE, 2000/60/EC). Dans la DCE, l'évaluation de l'état chimique s'appuie sur des normes de qualité environnementale (NQE), lesquelles correspondent à des concentrations seuils à ne pas dépasser pour une liste de substances chimiques considérées comme prioritaires (DCE, 2013/39/EC). Parmi ces substances figurent le Cd, le Ni et le Pb, pour qui les NQE se rapportent à des mesures de concentrations dissoutes dans la colonne d'eau (après filtration à 0.45 µm). Toutefois, une mesure dans l'eau ne renseigne pas sur la biodisponibilité des ETM, désignée comme la capacité d'un métal à interagir avec un organisme, y pénétrer et être potentiellement toxique (Luoma et al., 2008). Dans ce contexte, des approches, basées sur l'utilisation du biote, ont été développées : (i) la biosurveillance passive, qui repose sur le prélèvement

d'organismes autochtones, et (ii) la biosurveillance active, qui consiste à transplanter, à l'aide de cages, des organismes sur un site d'intérêt. L'approche passive est la plus répandue, mais elle est contrainte par la présence d'organismes autochtones sur les sites à surveiller. Alternativement, l'approche active offre la possibilité d'étudier n'importe quel site. Cette approche est généralement utilisée pour suivre les tendances spatiales de la contamination. Elle permet par ailleurs d'obtenir des données de bioaccumulation comparables entre elles dans la mesure où l'influence de certains facteurs biotiques peut être limitée, grâce à l'utilisation d'organismes standardisés et issus d'une seule population de référence (Besse et al., 2012).

Parmi les macroinvertébrés disponibles pour la biosurveillance des milieux aquatiques, les amphipodes du genre *Gammarus* suscitent un réel intérêt. En effet, outre leur fréquente utilisation en laboratoire comme modèle biologique pour l'étude des effets de divers contaminants (métaux, pesticides, polychlorobiphényles (PCB), produits pharmaceutiques, etc.), les gammars satisfont à de nombreux prérequis pour la biosurveillance, car ils sont (i) abondamment répartis dans les zones tempérées d'Europe ; (ii) sédentaires ; (iii) faciles à identifier, collecter et manipuler ; (iv) essentiels au bon fonctionnement des écosystèmes aquatiques (impliqués dans la dégradation de la litière et une importante source de nourriture) ; et (v) sensibles à de nombreux stress. En outre, les gammars ont des capacités à accumuler les métaux, essentiels ou non, pour une large gamme de concentrations (Amyot et al., 1996; Besse et al., 2013; Fialkowski et al., 2003a; Lebrun et al., 2015).

La compréhension et la formalisation des liens entre exposition et bioaccumulation sont essentielles pour mieux évaluer et prédire la biodisponibilité des contaminants, et la toxicité des milieux aquatiques. Cependant, ce lien est complexe, car il dépend à la fois du métal considéré, de la composition physicochimique du milieu et de facteurs biotiques propres à l'organisme exposé (Rainbow, 2002). Il a été par exemple largement montré que certains cations majeurs de l'eau (Ca^{2+} , Mg^{2+} , etc.) pouvaient influencer l'entrée des métaux dans les organismes en raison de leur pouvoir compétiteur avec les ETM, au niveau des sites biologiques d'internalisation (Bourgeault et al., 2010; Ferreira et al., 2009; Komjarova and Blust, 2009a). Chez le gammare, il a été observé au laboratoire qu'une augmentation des teneurs calciques du milieu d'exposition diminuait l'accumulation du Ni et du Cd (Lebrun et al., 2011; Pellet et al., 2009). La bioaccumulation peut également être modulée par des facteurs biologiques tels que la taille, le cycle de reproduction ou encore l'« histoire de vie » des organismes comme une pré-exposition à des métaux. Chez *Gammarus pulex*, une récente étude a montré que les concentrations en métaux chez des organismes autochtones étaient plus faibles que chez des organismes transplantés provenant d'un site de référence (Khan et al., 2011). Les auteurs ont suggéré que ces organismes autochtones avaient développé des mécanismes d'adaptation visant à minimiser l'internalisation des métaux.

Afin de relier la contamination des milieux et celle des organismes, différents modèles cinétiques visant à décrire les processus de bioaccumulation sont développés depuis les années 70-80 (Landrum et al., 1992; Luoma and Rainbow, 2005). Parmi ces modèles, le

modèle biodynamique est le plus couramment utilisé pour les organismes aquatiques, car il permet d'intégrer à la fois différentes voies de contamination, i.e. la voie dissoute et la voie trophique, et le taux de croissance de l'organisme durant l'exposition (en raison d'un facteur de biodilution du contaminant dans les tissus). Chez les organismes aquatiques, la contribution significative de la voie trophique dans la bioaccumulation des métaux n'est pas univoque. Chez les amphipodes d'eau douce, elle est peu documentée et il a été notamment montré qu'elle était négligeable chez *G. pulex* pour le Zn (Xu and Pascoe, 1994), de même que chez un autre amphipode, *Hyaletta azteca*, pour une large gamme de métaux (Borgmann et al., 2007). Bien qu'il soit légitime de s'interroger quant à la contribution de la voie trophique dans la bioaccumulation des métaux, la compréhension et la quantification de cette voie demandent des approches analytiques lourdes et encore peu disponibles. Par conséquent, pour ces travaux, il a été choisi de se placer dans les conditions où, l'étude de la bioaccumulation des métaux se ferait par la voie dissoute. En négligeant la voie trophique, le modèle biodynamique peut être simplifié et assimilé à un modèle à deux compartiments (eau et organisme), où la bioaccumulation est régie par une cinétique de premier ordre (Landrum et al., 1992). En considérant également que la croissance des organismes exposés est négligeable, la concentration de métal dans un organisme résulte d'une différence entre un flux entrant et un flux sortant de métal, caractérisés par des constantes d'accumulation (k_{in}) et d'élimination (k_{out}), tels que décrits dans l'équation suivante :

$$\frac{dC_{org}}{dt} = k_{in} \times C_w - k_{out} \times C_{org}$$

Où C_{org} , représente la concentration de métal dans l'organisme ($\mu\text{g/g}$) ;

t , représente le temps (j) ;

k_{in} , représente la constante cinétique d'accumulation (L/g/j) ;

C_w , représente la concentration en métal dissous dans l'eau ($\mu\text{g/L}$) ;

k_{out} , représente la constante cinétique d'élimination ($1/\text{j}$) ;

Les paramètres du modèle cinétiques sont spécifiques du couple métal/espèce considéré, et sont déterminés en reproduisant de façon réaliste, et dans des conditions simples en laboratoire, les flux entrants et sortants de métal pour différentes conditions d'exposition. L'approche biodynamique a été largement utilisée pour l'étude de nombreux contaminants métalliques, et pour de nombreuses espèces marines et d'eau douce (Bourgeault et al., 2010; Croteau et al., 2007; Ferreira et al., 2009; Luoma and Rainbow, 2005). Pour certains modèles, essentiellement développés chez des espèces marines, leur capacité à prédire la bioaccumulation *in situ* a été démontrée (Luoma and Rainbow, 2005).

Récemment, des modèles cinétiques de bioaccumulation des métaux chez le genre *Gammarus* ont été proposés (Lebrun et al., 2011; Pellet et al., 2009; Xu and Pascoe, 1993). Cependant, à l'exception de ces récents travaux chez le gammare, l'une des limites des modèles cinétiques est qu'ils n'intègrent pas l'impact des facteurs physicochimiques sur la biodisponibilité des métaux et par conséquent, leur utilisation en milieu naturel est limitée.

Par ailleurs, les paramètres du modèle cinétiques ont été déterminés à partir d'organismes issus d'une seule population de référence. Néanmoins, les gammares résident dans des environnements divers, caractérisés par différentes compositions physicochimiques (niveaux calciques, température, etc.) et différents niveaux de contamination, auxquels ils se sont acclimatés localement. Cette acclimatation pourrait se traduire par la modulation de fonctions physiologiques (osmorégulation, gestion des contaminants, etc.) impliquées dans l'accumulation de certains métaux, et par conséquent induire des capacités différentes à accumuler et/ou éliminer les métaux. Aujourd'hui, la variabilité des capacités de bioaccumulation des métaux entre populations de gammares est peu étudiée et peu connue. Pourtant, cette information est indispensable, car elle conditionne la pertinence environnementale des modèles cinétiques développés au laboratoire. De plus, dans le cadre de la biosurveillance des milieux aquatiques, cette information est nécessaire pour une meilleure interprétation des données de bioaccumulation et pour une meilleure gestion des écosystèmes aquatiques.

Objectif de la thèse

Ce travail de thèse vise à évaluer la **variabilité** des capacités de **bioaccumulation des métaux** par voie dissoute chez l'amphipode d'eau douce du genre ***Gammarus***, en s'appuyant sur l'utilisation d'un **modèle cinétique**. Plus précisément, les objectifs sont de formaliser l'impact de facteurs physicochimiques (cations majeurs de l'eau), mais également biologiques (histoires de vie) sur les constantes d'accumulation et d'élimination du Cd, du Cu, du Ni et du Pb du modèle cinétique. La pertinence environnementale de ces modèles développés en laboratoire a été évaluée sur le terrain à l'aide de suivis de la contamination de gammars transplantés *in situ*, à l'échelle de la France.

Il a été choisi d'étudier ces quatre métaux, car, d'une part, le Pb, le Cd et le Ni sont des métaux faisant l'objet d'un suivi par la DCE, et d'autre part, le Cu est un métal essentiel, connu pour sa toxicité à faible dose, et est par ailleurs largement utilisé dans différentes activités humaines comme l'agriculture.

À terme, ces travaux permettront d'améliorer les connaissances sur les mécanismes physiologiques impliqués dans le processus de bioaccumulation des métaux chez le gammare et de mieux caractériser le lien entre la contamination du milieu et celle des organismes. Sur un plan plus opérationnel, ces travaux de thèse permettront d'évaluer la pertinence d'utiliser le gammare pour le suivi de la contamination métallique biodisponible des milieux aquatiques.

Démarche scientifique et organisation du manuscrit

Ce travail de thèse se structure en 6 chapitres.

Les chapitres I et II sont respectivement consacrés à « **l'état de l'art** » et aux « **matériels et méthodes** ».

Le **chapitre I** propose une synthèse bibliographique sur la contamination métallique dans les milieux aquatiques d'eau douce et sur les différentes approches visant à caractériser la fraction biodisponible des métaux, parmi lesquelles la bioaccumulation. Le principe théorique du modèle cinétique utilisé pour formaliser la bioaccumulation des métaux y est également décrit.

Le **chapitre II** détaille les expériences réalisées au laboratoire pour calibrer le modèle cinétique et les expérimentations *in situ* pour confronter les modèles aux conditions

environnementales. Les méthodes analytiques ainsi que le modèle biologique, *Gammarus*, sont également présentés.

Les **chapitres III à V** présentent l'ensemble des **résultats** de ce travail de thèse.

Le **chapitre III** se divise en deux parties :

La première partie (III.1) présente le développement du modèle cinétique pour le Pb, par voie dissoute, chez *Gammarus*, en intégrant l'impact de facteurs physicochimiques sur la bioaccumulation. Pour cela, les constantes d'accumulation et d'élimination du modèle cinétique ont été déterminées chez des gammares issus d'une population de référence, via des cinétiques d'exposition en laboratoire à différentes concentrations de Pb, mais également divers teneurs en Ca^{2+} , Mg^{2+} et Na^+ . Ces travaux ont été valorisés dans une publication parue dans le journal « Environmental pollution ».

La seconde partie (III.2) a pour objectif de confronter des modèles cinétiques, développés pour le Pb dans la partie précédente et disponibles dans la littérature pour le Cd, le Cu et le Ni, aux conditions naturelles des milieux aquatiques français. Pour cela, la contamination de gammares transplantés sur une centaine de sites en France a été suivie, puis comparée à la bioaccumulation prédite par le modèle, à partir des constantes cinétiques déterminées en laboratoire et de la concentration en métal dissous dans les milieux étudiés. Ce travail fait l'objet d'une publication soumise au journal « Water research ».

La **chapitre IV** a pour objectif d'étudier la variabilité des capacités de bioaccumulation des métaux entre populations de référence, acclimatées à des environnements physicochimiques variés. Pour cela, les constantes d'accumulation et d'élimination du modèle cinétique pour le Cd, le Cu, le Ni et le Pb ont été déterminées chez 5 populations de gammares résidant dans des milieux non contaminés, mais présentant des contrastes au niveau de la composition physicochimique et de la localisation géographique. Ce travail fait l'objet d'une publication en préparation pour le journal « Aquatic toxicology ».

Le **chapitre V** traite de la possibilité pour les gammares de s'adapter à la contamination métallique et de son implication dans leur capacité à accumuler et gérer les métaux lors d'une exposition ultérieure. Ce travail a été réalisé selon deux approches, chacune faisant l'objet d'une partie.

La première approche (V.1) est basée sur l'utilisation de gammares autochtones provenant de 3 populations résidentes de milieux soumis à une contamination métallique chronique,

pour lesquels les constantes d'accumulation et d'élimination du modèle cinétique pour le Cd, le Ni et le Pb ont été déterminées. Ce travail fait l'objet d'une publication en préparation.

La seconde approche (V.2) est basée sur l'acclimatation, en laboratoire et sur du long terme, d'une population de gammare naïve, à une faible contamination en Cd et en Pb. Suite à cette acclimatation, les constantes d'accumulation et d'élimination du modèle ont été déterminées pour le Cd, le Ni et le Pb chez les individus pré-exposés et contrôles.

Enfin, le **chapitre VI** est consacré à la « **discussion générale** » des principaux résultats de ce travail de thèse et est suivi d'une partie « **conclusion et perspectives** ».

CHAPITRE I

I. État des connaissances

Préambule

Le premier chapitre de ce travail de thèse présente l'état des connaissances concernant les métaux présents dans les milieux aquatiques d'eau douce.

La première partie de ce chapitre (I.1) consiste à décrire de manière générale les sources et l'occurrence de la contamination métallique dans les milieux aquatiques en France. Elle traite également des interactions des métaux avec les organismes exposés (internalisation) et de leurs effets toxiques. Enfin, des notions de réglementation en matière de qualité des milieux aquatiques seront présentées. La seconde partie de ce chapitre (I.2) définit les notions de spéciation et de biodisponibilité des métaux. Elle présente également les principaux facteurs environnementaux modulant la biodisponibilité des métaux. La troisième partie (I.3) traite des différentes approches existantes pour estimer la biodisponibilité des métaux dans les milieux aquatiques. Enfin, la quatrième et dernière partie (I.4) présente les modèles cinétiques permettant de décrire les processus de bioaccumulation des métaux chez les organismes aquatiques.

1. Les métaux : sources, occurrences et interactions avec les organismes aquatiques

1.1. Généralités sur les éléments traces métalliques (ETM)

Le terme générique « éléments traces métalliques » (ETM), encore assimilé au terme « métaux lourds », désigne des métaux et métalloïdes¹ souvent réputés toxiques, présents dans les milieux à faibles doses (du ng/L au µg/L). Parmi les ETM, on retrouve des métaux tels que le cadmium (Cd), le plomb (Pb), le mercure (Hg), le nickel (Ni), le chrome (Cr), le cuivre (Cu), le zinc (Zn), ou encore des métalloïdes tels que le sélénium (Se) et l'arsenic (As) (Rollin and Quiot, 2006).

Les ETM sont naturellement présents dans la croûte terrestre et sont disséminés dans l'environnement suite à l'érosion des roches, et aux retombées atmosphériques lors de feux de forêt ou d'éruptions volcaniques (Brignon et al., 2005). Toutefois, depuis la révolution industrielle du XVIII^e siècle, la présence de métaux dans les milieux aquatiques, considérés comme le réceptacle ultime de la contamination, est majoritairement attribuable aux activités humaines telles que l'industrialisation, l'urbanisation et l'intensification des pratiques agricoles. Les ETM sont par ailleurs des éléments persistants, car, ils ne sont sujets à aucune biodégradation et exercent par conséquent une pression chronique et diffuse sur les écosystèmes aquatiques (Thévenot et al., 2009).

1.2. Sources et niveaux de contamination des ETM dans les milieux aquatiques d'eau douce

1.2.1. Le plomb (Pb)

Les activités minières représentent la première source anthropique de contamination en Pb dans le monde (Nordberg et al., 2014). En France, la contamination en Pb des milieux aquatiques est principalement liée aux industries métallurgiques (rejets directs et atmosphériques), au lessivage des sols agricoles après épandage de boues activées provenant du traitement des eaux usées, et à la lixiviation des déchets stockés en décharge (batteries au plomb). Les rejets d'eaux usées domestiques contribuent également à la présence de Pb dans les milieux aquatiques (Billon et al., 2009; Brignon et al., 2005). Actuellement, la contamination des milieux aquatiques en Pb est en grande partie liée à sa rémanence, i.e. sa persistance après l'arrêt de son émission (e.g. fermeture de sites miniers,

¹ Un métalloïde est un élément chimique semi-métallique, c'est-à-dire dont les propriétés physiques et chimiques sont intermédiaires entre celles d'un métal et d'un non-métal.

interdiction de vente d'essence plombée dans l'Union Européenne depuis 2000, interdiction des canalisations en Pb depuis 1995 et interdiction de mise sur le marché de peintures au Pb depuis 1993). De façon plus anecdotique, les plombs de chasses et plombs de pêches peuvent contribuer à la contamination des milieux aquatiques (Scheuhammer and Norris, 1996).

À l'échelle européenne, les concentrations dissoutes en Pb varient de <0.005 à 6.4 µg/L (i.e. après filtration des eaux brutes à 0.45 µm) (Foregs Geochemical Atlas). En France, des concentrations similaires ont été rapportées dans le Nord de la France par l'Agence de l'eau Artois-Picardie en raison de la présence d'une ancienne entreprise métallurgique (Agence de l'eau Artois-Picardie; Billon et al., 2009; Prygiel et al., 2013).

1.2.2. Le cadmium (Cd)

La contamination des masses d'eau en Cd provient essentiellement de trois sources de rejets diffus, qui sont l'utilisation de piles et accumulateurs Ni-Cd, de pigments (teintures) et de traitements de surfaces (anticorrosif) (Brignon et al., 2005). Dans une moindre mesure, le lessivage des sols après l'emploi d'engrais phosphatés dans l'agriculture (le Cd est une impureté du phosphate lors de son extraction), la combustion d'énergie fossile, l'incinération de déchets ménagers, les ruissèlements urbains (gouttières, revêtements routiers) constituent également de multiples sources de rejets diffus. Les principaux rejets ponctuels de Cd dans les milieux aquatiques proviennent de l'industrie sidérurgique et métallurgique (Brignon et al., 2005; SOGREAH, 2007).

Les concentrations en Cd dans les milieux aquatiques sont généralement très faibles (concentrations de l'ordre du ng/L). Toutefois, en France, des concentrations dissoutes pouvant atteindre jusqu'à 27 µg/L ont été observées dans un ancien bassin minier du Lot (Andrès et al., 1999).

1.2.3. Le nickel (Ni)

La contamination des milieux aquatiques en Ni provient principalement des activités minières, du raffinage et de la combustion d'énergie fossile (Chau and Kulikovsky-Cordeiro, 1995; Eisler, 1998; Mukherjee, 1998). Le Ni entre également dans la composition de piles en Ni-Cd, tout comme dans de nombreux matériaux de construction, et peut atteindre les milieux aquatiques lors du ruissèlement d'eaux pluviales.

Les concentrations de Ni mesurées dans les milieux aquatiques non soumis à des pressions humaines varient généralement de 1 à 10 µg/L, et peuvent atteindre une centaine de µg/L, voire 2000 µg/L dans les rivières les plus contaminées (Ontario, Canada) (Chau and Kulikovsky-Cordeiro, 1995; Eisler, 1998). En Europe, les concentrations dissoutes de Ni

peuvent varier de 0.03 à 25 µg/L, pour une médiane de 1.91 µg/L. En France, les valeurs maximums ont été enregistrées en Bretagne (environ 6 à 7 µg/L) (Foregs Geochemical Atlas).

1.2.4. Le cuivre (Cu)

La contamination des milieux aquatiques en Cu provient essentiellement du lessivage des sols contaminés par des rejets diffus tels que les retombées atmosphériques, principalement liées aux activités minières, métallurgiques et électriques, et par des boues activées de stations d'épuration (Foregs Geochemical Atlas). Le Cu est également utilisé dans de nombreuses applications en agriculture biologique et conventionnelle (notamment le sulfate de cuivre largement utilisé en viticulture), car il possède des propriétés fongicides et algicides (Monbet and Coquery, 2013).

La concentration moyenne mondiale en Cu dans les milieux aquatiques a été estimée à 1.5 µg/L (Martin and Windom, 1991). En Europe, les concentrations dissoutes en Cu mesurées dans les rivières varient entre 0.08 et 15 µg/L pour une médiane estimée à 0.88 µg/L (Foregs Geochemical Atlas). En France, une gamme de concentration similaire a été rapportée sur le bassin de la Seine (0.3 à 12.6 µg/L) (Lebrun et al., 2014). Dans le bassin Ardières-Morcille, connu pour ses activités viticoles, des concentrations supérieures à 16 µg/L de Cu ont été recensées en aval de bassin (Montuelle et al., 2010).

1.3. Interaction des ETM avec les organismes aquatiques

Les ETM peuvent interagir avec les organismes et être accumulés dans leurs tissus. Dans le milieu aquatique, il existe deux voies d'internalisation : la voie dissoute (contact avec le métal en solution) et la voie trophique (ingestion de nourriture contaminée).

Les interactions entre les métaux et les organismes aquatiques sont étudiées depuis les années 1970. Ces études visaient principalement à relier l'effet biologique à la concentration métallique du milieu. C'est ainsi qu'il a été observé que l'effet biologique induit par un métal était mieux décrit par la concentration de métal libre (M^{n+}) que par sa concentration totale (Morel, 1983). Ces observations ont été formalisées et ont donné lieu à deux modèles successifs : le modèle de l'ion libre (free ion activity model : FIAM (Morel, 1983)) et le modèle du ligand biotique (biotic ligand model : BLM (Di Toro et al., 2001)). Le FIAM et le BLM reposent sur la même hypothèse principale, qui est de considérer que la réponse biologique de l'organisme est proportionnelle à la concentration du complexe métal-ligand {M-X-cellule} à la surface de la membrane cellulaire, elle-même proportionnelle à la concentration en métal libre dans la solution (M^{n+}). Le BLM, lui, étend le concept et permet de prédire la toxicité pour les organismes en tenant compte de l'influence de la composition de l'eau et de la matière organique. Initialement, le BLM a été développé sur le modèle biologique des branchies de poisson (Macdonald et al., 2002; Niyogi and Wood, 2004;

Paquin et al., 2000; Santore et al., 2001) puis fut progressivement étendu aux zooplanctons (daphnies) (Deleebeeck et al., 2008; De Schamphelaere et al., 2005; Heijerick et al., 2005; Janssen et al., 2003) et aux phytoplanctons (Campbell et al., 2002; De Schamphelaere et al., 2005, 2014). Le modèle de l'ion libre présente cependant quelques exceptions, largement décrites par P.G.C Campbell (Campbell, 1995; Campbell et al., 2002). Parmi ces exceptions figurent, par exemple, le cas du mercure pour lequel c'est la forme méthylée qui va préférentiellement diffuser à travers les membranes biologiques.

1.3.1. Internalisation des ETM par voie dissoute

L'accumulation d'un métal chez un organisme implique que ce dernier traverse la membrane cellulaire. Chez les organismes aquatiques, les branchies constituent le lieu principal de transports des métaux en solution vers l'intérieur des cellules (Verbost et al., 1989).

A l'approche d'une surface biologique, le métal rencontre une couche protectrice (généralement le mucus) composée de glycoprotéines. Les macromolécules présentes dans cette couche protectrice renferment une variété de groupements fonctionnels oxygénés peu complexants. Dans la gamme de pH rencontrée dans les eaux naturelles, ces groupements fonctionnels se dissocient, ce qui crée un ensemble de sites négativement chargés que le métal devra franchir avant d'atteindre la barrière membranaire proprement dite. La membrane cellulaire hydrophobe est composée de phospholipides et de protéines dont des transporteurs protéiques et canaux ioniques impliqués dans le transport d'ions à travers la membrane (Campbell, 1995). En ce qui concerne les interactions entre les métaux et les organismes, quatre étapes ont été identifiées (et sont schématisées sur la Figure I-1) :

- (i) Diffusion du métal de la solution vers la surface biologique (couche de diffusion),
- (ii) Diffusion du métal à travers la couche protectrice (mucus),
- (iii) Complexation du métal à des sites complexants de la membrane cellulaire,
- (iv) Prise en charge du métal, i.e. internalisation.

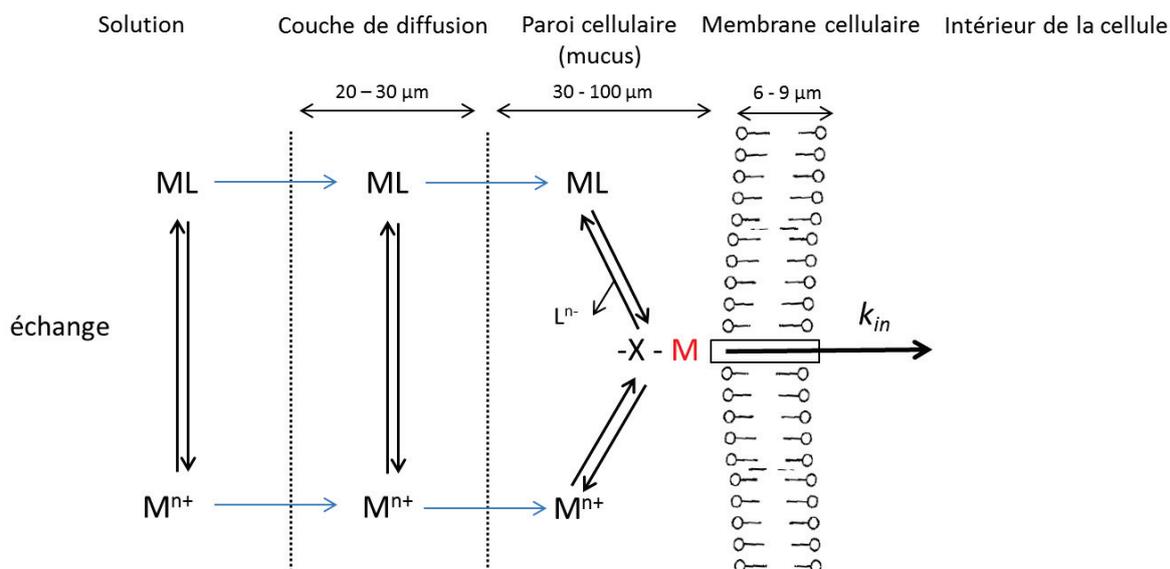


Figure I-1 : Modèle conceptuel des interactions entre les métaux et les organismes aquatiques (modifié d'après Campbell, 1995).

Différentes voies sont généralement décrites pour expliquer la prise en charge des métaux à travers les membranes cellulaires (Figure I-2). Parmi elles, les protéines membranaires de transport et les canaux ioniques sont les deux voies prépondérantes (transport par diffusion facilitée²), auxquelles peuvent s'ajouter occasionnellement la diffusion passive (cas des complexes hydrophobes comme le mercure) et le transport accidentel via des canaux insuffisamment sélectifs (cas des complexes M-histidine par exemple). L'endocytose, quant à elle, est majoritairement observée dans les membranes intestinales, donc dans le cas de l'accumulation des ETM par voie trophique (Luoma et al., 2008; Simkiss and Taylor, 1995).

² La diffusion facilitée d'un métal ne nécessite pas d'énergie car elle se fait dans le sens du gradient de concentration (du plus concentré vers le moins concentré).

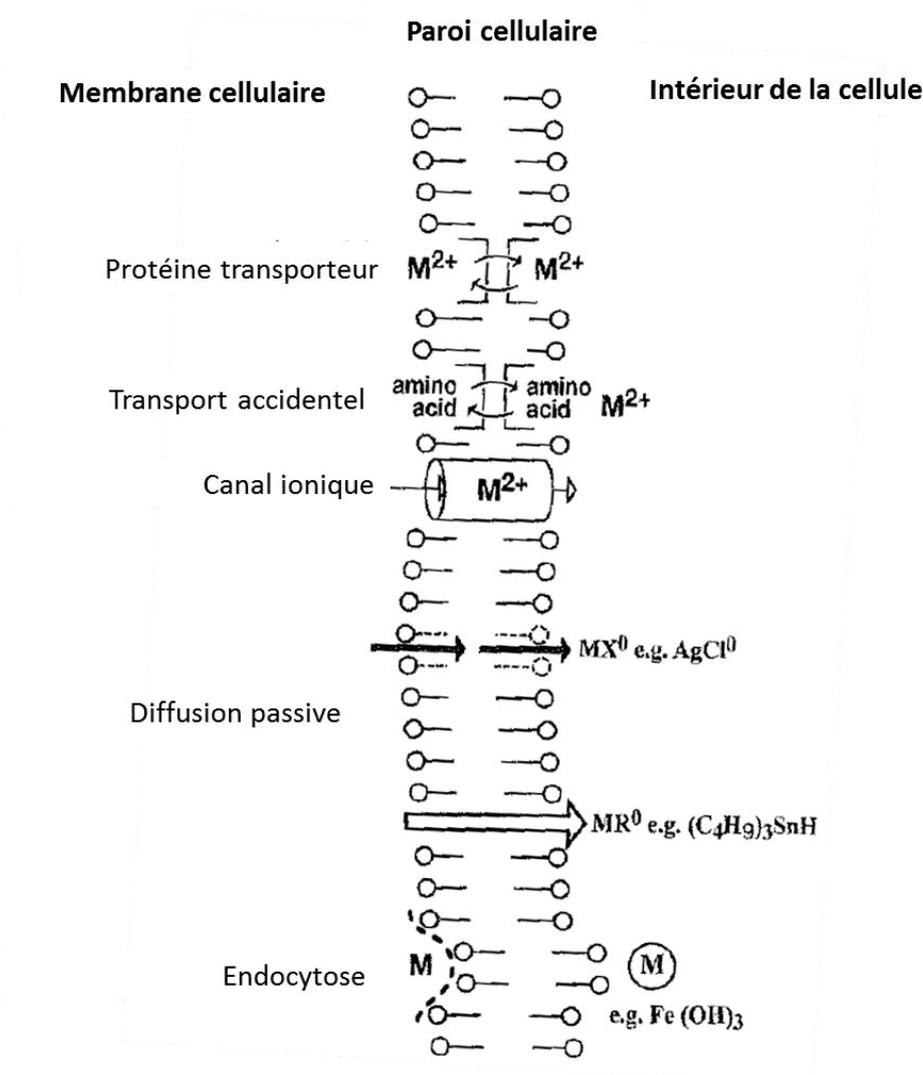


Figure I-2 : Schéma simplifié des mécanismes d'internalisation des ETM à travers la membrane cellulaire. Exemple chez les invertébrés aquatiques (modifié d'après Luoma et al., 2008).

1.3.2. Internalisation des ETM par voie trophique

L'entrée des métaux dans les organismes aquatiques peut également se faire par voie trophique, après ingestion de nourriture contaminée, et passage du métal au travers de la paroi intestinale du tractus digestif (par endocytose et par diffusion facilitée, Figure I-2). Certains auteurs soutiennent l'importance de la voie trophique dans l'internalisation et dans la toxicité des métaux chez les organismes aquatiques (Besser et al., 2005; Luoma and Rainbow, 2005; Zubrod et al., 2015). Bien qu'il soit pertinent d'étudier cette voie d'accumulation, son importance relative doit cependant encore être déterminée pour de nombreuses espèces et métaux. De plus, les résultats actuellement disponibles ne sont pas univoques : ils varient selon le groupe fonctionnel trophique auquel appartiennent les espèces étudiées (filtreurs, déchetteurs, brouteurs, fouisseurs, etc.). Par exemple, chez un

bivalve filtreur, *Dresseina polymorpha*, il a été montré, en laboratoire et *in situ*, que la voie trophique était prédominante dans l'accumulation du Cd (Bourgeault et al., 2010; Roditi et al., 2000). De même, la voie trophique est majoritaire dans l'accumulation du Cd, du Zn et de l'Ag chez le ver de vase, *Arenicola marina*, qui ingère le sédiment (Casado-Martinez et al., 2009). En revanche, Borgmann et al. (2007) ont observé une contribution négligeable de la voie trophique dans l'accumulation de 25 métaux parmi les 27 étudiés (exception pour Cd et Se) chez l'amphipode, *Hyallela azteca*, transplanté pendant 17 jours sur deux rivières, et alimenté avec la nourriture provenant des sites contaminés. Un résultat similaire a été rapporté, en laboratoire, pour le Zn chez l'amphipode, *Gammarus pulex*, exposé durant 15 jours (Xu and Pascoe, 1994).

La contribution de la voie trophique dans la bioaccumulation des métaux par les organismes varie également selon les conditions d'exposition des organismes (accès à la nourriture, type de nourriture, niveau de contamination, conditions contrôlées ou étude *in situ*, etc). La quantité de métal ingérée et son assimilation par l'organisme peuvent par exemple varier en fonction des conditions de stress de l'organisme, qui peuvent modifier son comportement alimentaire (Decho et Luoma, 1996; Forrow et Maltby, 2000). Aussi, une récente étude de Golding et al. (2013) a mis en évidence l'importance du type de nourriture ingérée dans l'évaluation de l'accumulation par la voie trophique. En effet, les auteurs ont observé que l'accumulation du Cd chez *H. azteca* était différente selon que la nourriture contaminée provenait du milieu naturel ou bien d'une nourriture industrielle (type TetraMin®). Enfin, l'évaluation de l'accumulation des ETM par la voie trophique n'est pas toujours possible, car les techniques sont lourdes et requièrent l'utilisation de radio-traceurs ou d'isotopes stables, qui ne sont pas disponibles pour une utilisation de routine pour tous les métaux.

1.3.3. Le devenir des ETM internalisés et mécanismes de détoxification

Une fois internalisé, l'ion métallique libre va rapidement former des complexes avec des ligands cytosoliques, grâce notamment à son affinité pour les groupements thiols. Ainsi, la concentration en métal libre dans la cellule avoisine zéro et le gradient de concentration pour l'internalisation de nouveaux ions métalliques est maintenu. Ensuite, le métal va rester dans la cellule hôte ou bien traverser la membrane baso-latérale, puis être libéré dans le milieu circulant et acheminé vers des organes cibles via l'hémolymphe (cas des crustacés) ou bien le sang (poissons). Dans les deux cas de figure, le métal va ensuite (i) être métaboliquement disponible et exercer une toxicité, en se fixant sur des molécules essentielles au fonctionnement cellulaire, comme des enzymes ou encore des acides nucléiques (ADN) (Lacaze, 2011), ou bien (ii) être détoxifié sous forme inerte, puis stocké ou excrété (Ahearn et al., 2004).

Tous les organismes ont des mécanismes de détoxification qui visent à limiter la disponibilité intracellulaire des ETM, et par conséquent, leur potentiel toxique. L'organe principal de la

détoxification et du stockage des métaux chez les organismes aquatiques et en particulier chez les invertébrés est l'hépatopancréas (Ahearn et al., 2004). On dénombre en général trois mécanismes de détoxification à travers des processus de séquestration/complexation :

- (i) complexation par des métallothionéines (MTPL), peptides cytosoliques de faible poids moléculaire, pourvus de nombreux groupements thiols,
- (ii) séquestration dans des organelles telles que le lysosome (organites cellulaires présents dans toutes les cellules animales, excepté les hématies, et qui a une fonction « d'éboueur » dans la cellule).
- (iii) séquestration dans des granules insolubles (MRG) (riche en groupements phosphate et sulfure).

L'excrétion des métaux se fait principalement via l'urine et les fèces.

Les mécanismes de détoxification des ETM varient d'une espèce à une autre. Rainbow et White (1989) ont par exemple observé que le décapode marin, *Palaemon elegans*, et la bernacle, *Elminius modestus*, accumulaient et stockaient le Cd, généralement sous forme complexée à des MTPL, sans aucune excrétion. En revanche, toujours chez *P. elegans*, il a été observé que le Zn était accumulé puis excrété sans être détoxifié (Rainbow, 2002). Chez l'amphipode d'eau douce, *Gammarus fossarum*, Geffard et al. (2010) ont montré que le Cd pouvait être pris en charge, à la fois dans la fraction soluble (MTPL) et insoluble ; tandis que le Pb est essentiellement présent dans la fraction insoluble (MRG).

1.4. Effets toxiques des ETM sur les organismes aquatiques

Certains métaux, dits non-essentiels, n'ont aucun rôle connu chez les organismes, et leur présence dans les milieux aquatiques, même à de faibles doses, se traduit par des effets toxiques pour les organismes exposés. Parmi ces métaux figurent le Cd et le Pb (bien qu'une exception semble exister pour le Cd chez la diatomée marine, *Thalassiosira weissflogii*, d'après Lee et al. (1995)). D'autres, comme le Cu, sont essentiels au métabolisme des organismes dans une gamme de concentrations optimales, en deçà desquelles, une carence est observée et au-delà desquelles, des effets toxiques sont observables (Atli et Canli, 2011; Muysen et al., 2004; Tercier Waeber et al., 2012). Pour ces métaux essentiels, les organismes possèdent une concentration basale, qui représente la concentration présente dans l'organisme (métal faisant partie intégrante de composés biochimiques par exemple) quelle que soit l'exposition dans le milieu, et plus ou moins constante (Borgmann and Norwood, 1995a). Le statut du Ni est plus ambiguë. Il a été montré que le Ni était essentiel pour la croissance des végétaux et de quelques espèces de vertébrés, mais les études visant à déterminer son rôle, essentiel ou non, vis-à-vis des animaux aquatiques, ne sont pas concluantes (Chowdhury et al., 2008; Eisler, 1998).

Les effets toxiques des ETM peuvent être observés à différents niveaux biologiques : génétique (génotoxicité), biochimique (ionorégulation, activités enzymatiques...), ou encore

physiologique (diminution de la locomotion, prédation, reproduction...). Ils peuvent se traduire *in fine* par la mort des individus, avec de possibles répercussions à l'échelle de la population. Le Tableau I-I dresse une liste non exhaustive des effets toxiques de chacun des quatre métaux étudiés dans ce travail de thèse, observés chez différents organismes aquatiques.

Tableau I-1 : Études concernant l'impact du Cd, du Cu, du Ni et du Pb chez les organismes aquatiques. Liste non-exhaustive.

Pb	Espèce	Temps d'exposition et dose	Effet(s)	Références
(gastéropode)	<i>Lymnaea stagnalis</i>	72 heures 5 ou 10 mg/L	↘ locomotion ↘ alimentation ↗ mortalité	(Pyatt et al., 2002)
(poisson)	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	96 heures 0.25, 0.5, 1, 3 et 5 mg/L	Perturbation de l'osmorégulation	(Rogers et al., 2003)
	<i>Channa punctatus</i>	4 jours 5.9 mg/L	Immunotoxicité	(Paul et al., 2014)
Cd	Espèce	Temps d'exposition et dose	Effet(s)	Références
(amphipode)	<i>Gammarus pulex</i>	168 heures 7.5 et 15 µg/L	↘ Locomotion ↘ Alimentation ↘ Ventilation	(Felten et al., 2008)
	<i>Gammarus fossarum</i>	3 et 7 jours 15 µg/L	↗ Perturbation de l'osmorégulation	(Issartel et al., 2010)
(bivalve)	<i>Mytilus galloprovincialis</i>	14 jours 10 µg/L	↗ Génotoxicité ↗ Immunotoxicité ↗ Cytotoxicité	(Rocha et al., 2014)

(poisson)	<i>Gambusia affinis</i>	10 jours 17 µg/L	↘ Reproduction	(Cazan and Klerks, 2015)
Ni	Espèce	Temps d'exposition et dose	Effet(s)	Références
(gastéropode)	<i>Lymnaea stagnalis</i>	21 jours 1.3 µg/L	↗ Perturbation de l'osmorégulation ↘ Croissance	(Niyogi et al., 2014)
(poisson)	<i>Prochilodus lineatus</i>	24 et 96 heures 25, 50 et 2500 mg/L	↗ Génotoxicité	(Palermo et al., 2015)
	<i>Oncorhynchus mykiss</i>	117 heures 12 µg/L	↘ Capacités respiratoires	(Pane et al., 2003)
Cu	Espèce	Temps d'exposition et dose	Effet(s)	Références
(amphipode)	<i>Gammarus pulex</i>	5 jours 0.5 - 100 µg/L.	↘ Métabolisme digestif	(Lebrun et al., 2012)
	<i>Gammarus pulex</i>	4 à 24 heures 25 - 1000 µg/L	Perturbation de l'osmorégulation	(Brooks and Lloyd Mills, 2003)
poisson	<i>Oreochromis niloticus</i>	30 jours / 50 µg/L et 96h / 0.1, 0.5, 1.0 et 1.5 mg/L	Perturbation de l'osmorégulation	(Atli and Canli, 2011)

Le Tableau I-I montre que la grande majorité des études menées en conditions contrôlées de laboratoire, sur l'évaluation de la toxicité des métaux, sont réalisées à des concentrations bien supérieures à celles mesurées dans les milieux naturels ; ce qui souligne la nécessité de travailler à des concentrations réalistes, d'un point de vue environnemental.

1.5. Règlementation

Les effets toxiques des métaux sur la santé humaine et sur l'environnement sont aujourd'hui bien documentés et ont donné lieu à des restrictions de rejets, d'emplois ou encore de teneurs dans les produits de la pêche et l'aquaculture (DCE, 2006/1881/EC; REACH, 1907/2006/EC).

La Directive cadre européenne sur l'Eau (DCE, 2000/60/EC) établit un cadre pour une politique communautaire pour la gestion des ressources aquatiques. Afin d'assurer la protection de la santé humaine et celle de l'environnement, la DCE vise à atteindre le bon état chimique et écologique des masses d'eau en 2015 (2021 ou 2027 en cas de trop fortes contraintes techniques ou économiques). Pour cela, les états membres s'engagent à protéger, améliorer et restaurer les milieux aquatiques, notamment à travers (i) la réduction des rejets de substances prioritaires, (ii) la suppression des rejets de substances dangereuses prioritaires, (iii) le suivi des substances prioritaires et le diagnostic de l'état des masses d'eau. À l'heure actuelle, 45 substances figurent sur la liste des substances prioritaires de la DCE. Parmi ces substances, 4 sont des métaux : Cd, Hg, Ni et Pb. Les deux premiers (Cd et Hg) sont définis comme étant des substances prioritaires dangereuses, et leurs rejets doivent être supprimés, afin de retrouver des concentrations semblables au niveau du bruit de fond naturel³. L'évaluation de l'état chimique des masses d'eau vis-à-vis de ces 4 métaux, et plus généralement de l'ensemble des substances prioritaires, est basée sur l'utilisation de normes de qualité environnementale (NQE) (DCE, 2013/39/EC).

Une NQE est définie comme étant la concentration d'une substance prioritaire dans l'eau les sédiments ou les organismes aquatiques (biote) - qui ne doit pas être dépassée, afin de protéger la santé humaine et les écosystèmes. Le dépassement de la NQE pour une seule de ces substances suffit à déclasser le site de « bon » à « mauvais » état chimique. Par ailleurs, la DCE précise que dans le cas des métaux, les NQE sont exprimées en concentration de métal dissous dans le milieu, i.e. après filtration de l'eau brute à travers un filtre de porosité 0.45µm. Le Tableau I-II présente les valeurs de NQE pour le Cd, le Hg, le Ni et le Pb dans différents compartiments de l'environnement (eaux de surfaces intérieures, autres eaux de surfaces (les eaux côtières et les estuaires), et le biote pour le mercure). Les NQE sont exprimées en valeur moyenne annuelle (NQE-MA), afin d'assurer une protection chronique, et en concentration maximale admissible (NQE-CMA), afin de fournir une protection à court

³ Concentration métallique dans les sites de référence non influencés par les activités humaines.

terme contre d'éventuels pics de pollution. Les NQE-CMA sont basées sur des données de toxicité aiguë de laboratoire, tandis que les NQE-MA sont basés sur des données de toxicité chronique lorsqu'elles existent. La DCE impose, par ailleurs, la prise en compte de certains facteurs physicochimiques qui affecteraient la biodisponibilité des métaux, comme dans le cas du Cd, pour lequel plusieurs classes de NQE sont proposées en fonction des teneurs en CaCO_3 ⁴ de l'eau.

Actuellement, le suivi des milieux aquatiques repose sur des mesures directes dans la colonne d'eau. Or ces mesures ponctuelles n'intègrent pas les fluctuations temporelles de la contamination et peuvent être sujettes à des difficultés analytiques, liées à la présence des ETM à de faibles concentrations dans les milieux. C'est pourquoi la DCE recommande désormais l'utilisation de matrices plus intégratrices que l'eau, telles que le sédiment ou le biote, pourvu qu'elles offrent, *a minima*, la même protection que les NQE-eau. De plus, le biote a l'avantage, par rapport au sédiment, de renseigner sur la biodisponibilité des métaux, c'est-à-dire leur capacité à interagir avec l'organisme et à induire une toxicité.

Tableau I-II : Normes de qualité environnementales (NQE) des métaux. MA: moyenne annuelle. CMA: concentration maximale admissible. Directive fille adoptée le 24 août 2013 par le parlement européen.

Élément métallique	NQE-MA Eaux de surface intérieures (µg/L)	NQE-MA Autres eaux de surfaces (µg/L)	NQE-CMA Eaux de surface intérieures (µg/L)	NQE-CMA Autres eaux de surfaces (µg/L)	NQE-Biote (µg/kg (poids à l'état frais))
Cadmium et ses composés	≤ 0,08 (Class 1)	0.2 (pas de notion de classe de dureté de l'eau)	≤ 0,45 (Class 1)	≤ 0,45 (Class 1)	-
	0,08 (Class 2)		0,45 (Class 2)	0,45 (Class 2)	
	0,09 (Class 3)		0,6 (Class 3)	0,6 (Class 3)	
	0,15 (Class 4)		0,9 (Class 4)	0,9 (Class 4)	
	0,25 (Class 5)		1,5 (Class 5)	1,5 (Class 5)	
Plomb et ses composés	1.2	1.3	14	14	-
Mercure et ses composés	-	-	0.07	0.07	20
Nickel et ses composés	4	8.6	34	34	-

(Class 1: < 40 mg CaCO_3 /L, Class 2: 40 to < 50 mg CaCO_3 /L, Class 3: 50 to < 100 mg CaCO_3 /L, Class 4: 100 to < 200 mg CaCO_3 /L and Class 5: ≥ 200 mg CaCO_3 /L).

⁴ Les teneurs en CaCO_3 renseignent sur la dureté de l'eau. Plus les teneurs en CaCO_3 seront élevées, plus l'eau sera dite « dure ».

Actuellement, aucune NQE n'est définie pour le Cu. Néanmoins, en 2005, l'INERIS⁵ a proposé une concentration sans effet prévisible pour l'environnement (PNEC) dans le compartiment aquatique pour le Cu en France ($PNEC_{\text{eau_douce}} = 1.6 \mu\text{g/L}$) (Bisson et al., 2005).

⁵ Institut nationale de l'environnement industriel et des risques.

2. Notions de spéciation, de biodisponibilité et facteurs de contrôle de la biodisponibilité des ETM dans les milieux aquatiques

2.1. Notion de spéciation métallique

La spéciation désigne les différentes formes chimiques sous lesquelles un contaminant peut être présent dans un environnement (Templeton et al., 2000). Dans les milieux aquatiques, les métaux existent sous forme particulaire et dissoute. Cette distinction arbitraire est obtenue par filtration des eaux brutes à $0.45\ \mu\text{m}$ (elle peut être de $0.22\ \mu\text{m}$ chez certains auteurs). Au sein de la fraction dissoute, le métal est présent sous différentes formes chimiques : ions métalliques libres, complexes organiques simples et polymères, complexes inorganiques et hydroxo-complexes (Figure I-3). Chaque forme chimique a une capacité spécifique d'interaction avec le biote. La spéciation d'un métal sera différente selon l'élément considéré et la répartition de ce dernier au sein de la colonne d'eau va être conditionnée par les caractéristiques physicochimiques du milieu telles que le pH, la température, la présence de ligands comme la matière organique dissoute (MOD) (Buffle et al., 2009).

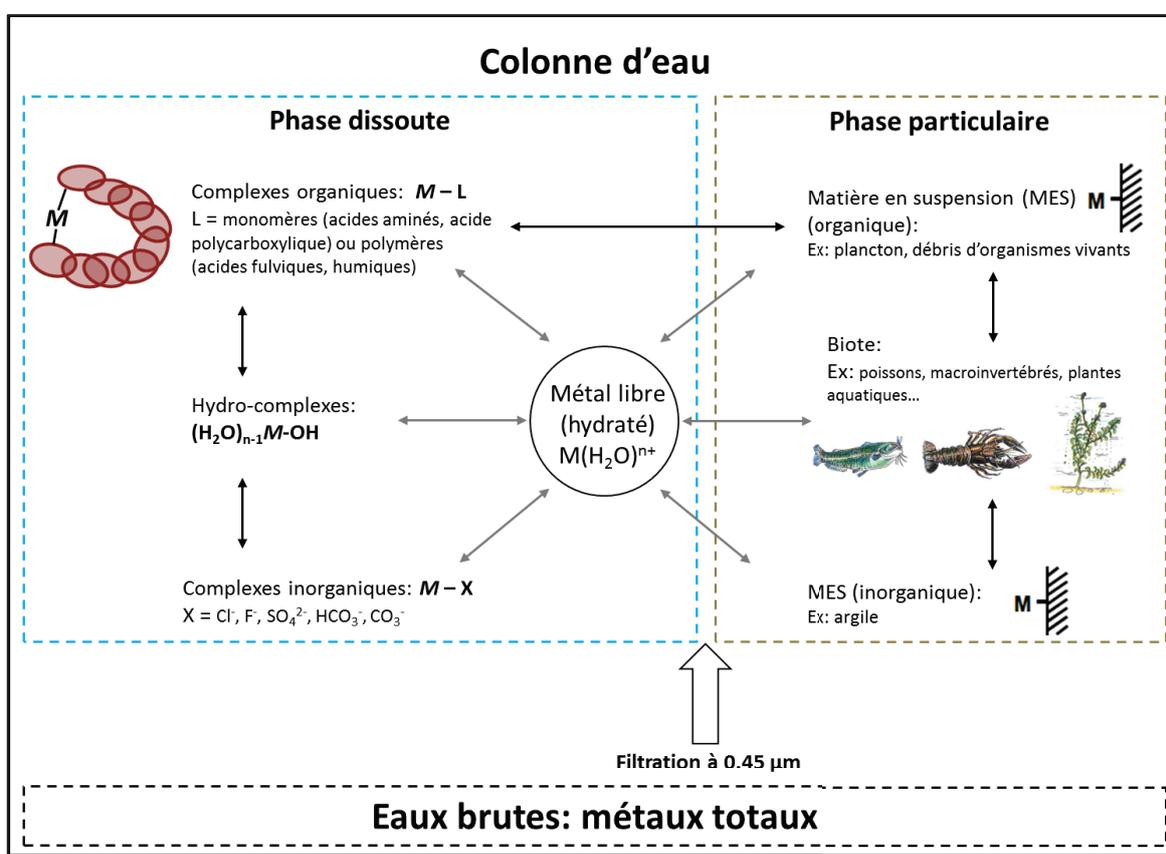


Figure I-3 : Schéma de la spéciation des métaux et des interactions entre les différentes formes chimiques ainsi qu'avec le biote (Adapté de Buffle, 1988).

2.2. Notions de biodisponibilité des ETM dans les milieux aquatiques

La biodisponibilité d'un contaminant désigne sa capacité à être adsorbé à la surface de l'organisme et être internalisé (Luoma et al., 2008; Sanders et Riedel, 1998). En d'autres termes, tout ce qui est accumulé par l'organisme est *de facto* biodisponible.

Depuis la formalisation du FIAM et BLM, il est souvent considéré que la forme métallique la plus biodisponible pour les organismes est la forme de l'ion libre (M^{n+}). En effet, il est souvent admis que c'est l'ion métallique libre (M^{n+}) qui traverse les membranes biologiques suite à sa fixation sur les protéines spécifiques (protéines membranaires de transport et les canaux ioniques) (Campbell, 1995; McGeer, 2004). En réalité, dans le milieu naturel, en raison des interactions entre le biote et le milieu et les différentes capacités des organismes à réguler les métaux, seule une fraction de la concentration totale de métal sera internalisée par le biote (Figure I-4). Ainsi, la biodisponibilité des métaux va dépendre de la composition physicochimique du milieu, qui va influencer la spéciation des métaux en solution, mais également les interactions des métaux avec les organismes (complexation avec la MOD, compétitions de l'ion métallique avec le Ca^{2+} , Mg^{2+} , etc.) ; et les facteurs biologiques propres à l'organisme exposé, tels que sa taille, son stade de maturité, ses capacités à internaliser le métal, etc. (Nordberg et al., 2014). Il est par ailleurs important de noter que la notion de biodisponibilité est relative à un organisme donné : ce qui est biodisponible pour l'un ne l'est pas nécessairement pour l'autre. Ainsi la mesure stricte des concentrations métalliques biodisponibles dans un milieu n'est pas possible, le terme d'estimation des concentrations biodisponibles dans le milieu sera préféré.

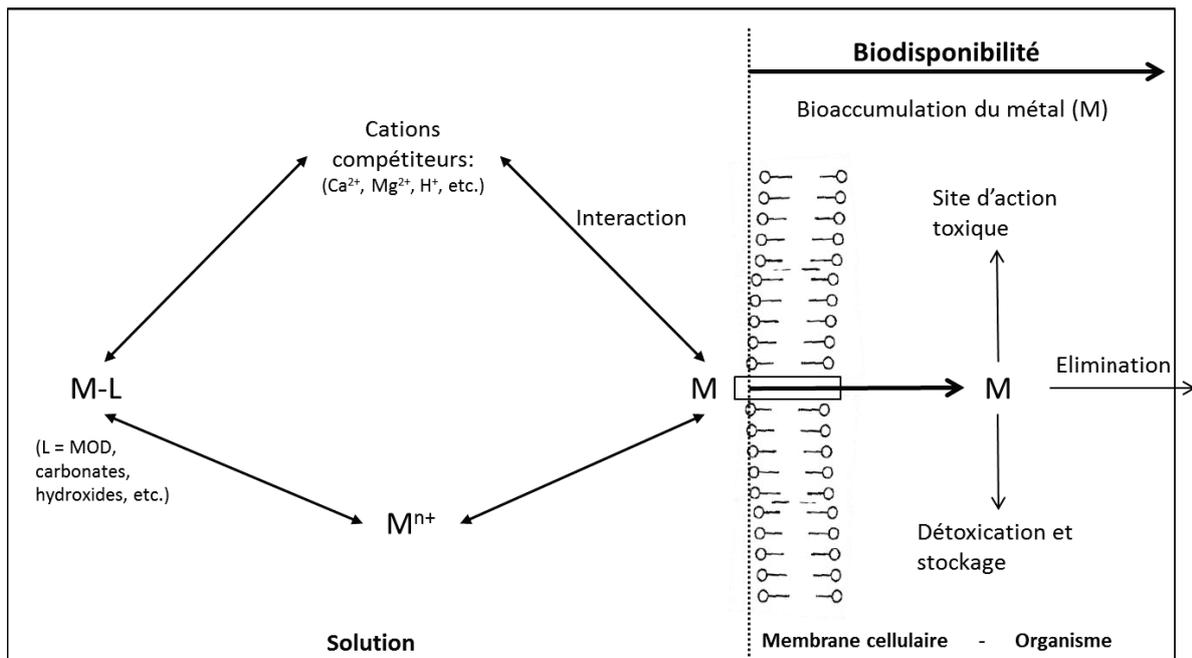


Figure I-4 : Illustration de la notion de biodisponibilité des métaux (modifié d'après McGeer, 2007)

Par conséquent, de manière à améliorer le suivi de l'état chimique des milieux et la protection des écosystèmes aquatiques, il semble plus pertinent d'estimer les concentrations biodisponibles de métaux plutôt que la concentration en métal total ou dissous dans un milieu donné.

2.3. Facteurs environnementaux influençant la biodisponibilité des ETM

2.3.1. Influence des facteurs physicochimiques

L'influence de la composition physicochimique du milieu sur la biodisponibilité des métaux peut se diviser en deux catégories : (i) les facteurs contrôlant la spéciation des métaux dans la colonne d'eau (pH, matière organique dissoute, température), et (ii) les facteurs influençant les interactions du métal avec l'organisme et par conséquent l'internalisation du métal (cations majeurs, autres métaux).

(i) La matière organique dissoute

Les matières organiques dissoutes (MOD) sont des macro-molécules qui proviennent principalement de la dégradation de végétaux et d'animaux morts ou bien d'exsudats d'organismes vivants, et sont essentiellement composées de substances humiques (acides humiques et acides fulviques). Les MOD sont globalement chargées négativement et possèdent des groupements fonctionnels tels que les carboxyles, les phénols, les amines, ou encore les thiols, qui leur confèrent des propriétés complexantes (Filella et Town, 2005). Par conséquent, les MOD sont capables de lier, selon leur nature et plus ou moins fortement les ETM, et ainsi de diminuer leur biodisponibilité (Murphy et Zachara, 1995) ; car une fois formé, le complexe métal-MOD est trop volumineux et polaire pour traverser la membrane cellulaire des organismes ciblés (Richards et al., 2001). Ainsi, de nombreuses études, réalisées en laboratoire, ont montré une diminution de la biodisponibilité du Cu en présence de MOD ; se traduisant par une diminution de la bioaccumulation et de la toxicité du métal chez les organismes aquatiques, parmi lesquels le poisson ou les bryophytes (Ferreira et al., 2008; Hollis et al., 1997; Luider et al., 2004). Des résultats similaires ont également été observés pour le Cd chez le gammare et la moule zébrée (Pellet et al., 2009; Voets et al., 2004), ainsi que pour le Pb chez la truite (Macdonald et al., 2002). Néanmoins, la biodisponibilité du Cd serait moins affectée par la présence de MOD que celle du Cu, car son affinité pour les MOD est nettement moins forte (Alberts et Giesy, 1983; Morel et Hering, 1993). Bien que les résultats obtenus en laboratoire plaident en faveur d'un effet protecteur des MOD, leur influence sur la biodisponibilité des métaux *in situ* n'est pas univoque. En milieu naturel, une étude de De Jonge et al. (2014) n'a pas montré de corrélation

significative entre les concentrations de carbone organique dissous (le dosage des concentrations en carbone organique dissous (COD) permet d'estimer les teneurs en MOD des milieux aquatiques, mais ne confère aucune information quant à la nature, la structure ou encore les propriétés des molécules présentes) et la biodisponibilité du Cd, du Ni et du Pb chez quatre espèces d'insectes aquatiques. La complexité et la qualité des molécules organiques, qui composent les MOD, ont une influence sur leur pouvoir complexant (Richards et al., 2001). Or dans les milieux aquatiques, on retrouve une grande diversité de molécules organiques, dont il est, à l'heure actuelle, impossible de déterminer la composition avec exactitude. Par ailleurs, les métaux associés à la matière organique *in situ* peuvent être ingérés en tant que nourriture par les organismes, et ainsi être une source non négligeable de métal biodisponible vis-à-vis des organismes. De tels scénarii ont d'ailleurs été observés pour le Cu chez l'huitre et le Cd chez la moule (Bourgeault et al., 2010; Guo et al., 2001).

(ii) Les cations majeurs de l'eau ; Ca^{2+} , Mg^{2+} et Na^+

Le calcium (Ca^{2+}), le magnésium (Mg^{2+}) et le sodium (Na^+) sont des cations majoritairement présents dans les milieux aquatiques. Une eau dont les concentrations en Ca^{2+} et Mg^{2+} sont élevées sera dite « dure » ; une eau dont les concentrations en Ca^{2+} et Mg^{2+} sont faibles sera dite « douce ». En Europe, les concentrations en Ca^{2+} dans les milieux aquatiques peuvent varier de 0.02 à 592 mg/L, avec une médiane autour de 40 mg/L. En ce qui concerne le Mg^{2+} , les concentrations oscillent entre 0.05 et 230 mg/L, avec une médiane de 6.02 mg/L (Foregs Geochemical Atlas). Na^+ est plutôt associé à la salinité de l'eau (NaCl). Les concentrations de Na^+ en Europe sont comprises entre 0.23 et 1300 mg/L, avec une médiane égale à 6.58 mg/L (Foregs Geochemical Atlas).

De manière générale, les cations majeurs de l'eau limitent la biodisponibilité des métaux et jouent par conséquent un rôle protecteur vis-à-vis de leur toxicité (McGeer, 2004). En effet, certains métaux empruntent les mêmes voies d'internalisation dans les organismes que les cations (canaux ioniques), ainsi, il existe une compétition entre le métal et le cation pour la fixation sur les canaux ioniques.

De nombreuses études ont montré que le Ca^{2+} diminuait la biodisponibilité du Pb et du Cd chez un grand nombre d'organismes aquatiques comme les poissons (Grosell et al., 2006; Hollis et al., 1997), les bivalves (Bourgeault et al., 2010), les décapodes (Komjarova and Blust, 2009), les amphipodes (Lebrun et al., 2011; Pellet et al., 2009; Wright et Frain, 1981), ou encore les insectes aquatiques (De Jonge et al., 2014). En effet, il a été suggéré que le Pb et le Cd peuvent traverser les membranes biologiques via les canaux calciques en raison de leur ressemblance chimique avec l'ion Ca^{2+} . En présence de fortes concentrations calciques, la compétition entre les métaux et le calcium pour la fixation sur les sites biologiques va limiter l'internalisation des métaux (Niyogi et Wood, 2004; Rainbow et Black, 2005; Rogers et Wood, 2004). Une diminution de la biodisponibilité du Ni a également été observée chez

l'amphipode, *Gammarus pulex*, et le décapode, *Daphnia magna*, pour des concentrations croissantes de Ca^{2+} (Komjarova et Blust, 2009; Lebrun et al., 2011).

Dans une moindre mesure, Mg^{2+} peut influencer la biodisponibilité du Ni par compétition. Une diminution de la biodisponibilité du Ni en présence de Mg^{2+} a été observée par Deleebeeck et al. (2008) chez *Daphnia magna*. En revanche, deux autres études portant respectivement sur *D. magna* et *G. pulex* n'ont pas rapporté d'effet significatif de la présence de Mg^{2+} sur la biodisponibilité du Ni (Komjarova and Blust, 2009; Lebrun et al., 2011).

La présence de Na^+ dans le milieu aquatique peut influencer la biodisponibilité du Cu, qui, par analogie avec ce dernier, pénètre dans les organismes aquatiques via les canaux sodiques (Grosell et Wood, 2002; Niyogi et Wood, 2004). Ainsi, des études ont rapporté une diminution de l'accumulation et de la toxicité du Cu en présence de Na^+ chez des organismes tels que des insectes aquatiques (De Jonge et al., 2014), des poissons (Niyogi et Wood, 2004), des décapodes (De Schampelaere et Janssen, 2004, 2002). En revanche, chez *G. pulex*, *D. magna* et *Fontinalis antipyretica*, aucun effet significatif du Na^+ sur la biodisponibilité du Cu n'a été observé (Ferreira et al., 2009; Komjarova et Blust, 2009; Lebrun et al., 2012).

(iii) Le pH

L'acidification des milieux tend à augmenter la biodisponibilité des métaux, car elle favorise la désorption des métaux complexés (à la MOD par exemple) et ainsi sa forme cationique libre (M^{n+}). Néanmoins, dans la littérature, on observe également un effet compétiteur entre les ions H^+ et les métaux, ce qui tend à diminuer la biodisponibilité de ces derniers. En laboratoire, un milieu acide (pH = 6.5) conduit à une diminution de la toxicité du Cu chez l'amphipode *Hyaella azteca* (Borgmann et al., 2005) ou encore du Pb chez le poisson *Pimephales promelas* (Grosell et al., 2006). Chez *D. magna*, une acidification du milieu (pH = 6) conduit à une augmentation de l'accumulation de Ni et de Cd (Komjarova and Blust, 2009b) mais à une diminution de l'accumulation chez le poisson zèbre (Komjarova and Blust, 2009a). En milieu naturel, Croteau et al. (1998) et Hare et Tessier (1996) ont observé une diminution de la toxicité du Cd dans des lacs acides (pH 4-5). Toutefois, en France, les variations de pH dans les milieux aquatiques sont faibles (pH 7-8) comparativement aux gammes de pH étudiées en laboratoire et globalement, l'influence du pH est négligeable devant l'influence d'autres facteurs tels que les cations majeurs, pour qui les concentrations dans les milieux peuvent varier d'un facteur 100.

(iv) *Température*

La température est considérée comme un catalyseur de réaction et peut donc influencer la vitesse de dissociation des complexes métalliques en solution, libérant ainsi des ions libres. Il a également été avancé que la température pouvait, dans certains cas, augmenter le métabolisme des organismes, ce qui favoriserait les mécanismes d'accumulation, comme cela a été observée *in situ* chez *G. pulex* (Fialkowski et al., 2003). Néanmoins, une augmentation de température supérieure à la température optimale des organismes peut avoir des effets délétères et induire des changements physiologiques susceptibles d'impacter ses capacités à réguler les métaux. Ainsi, une étude de Khan et al. (2006) a montré que chez l'écrevisse, une augmentation de 7°C du milieu d'exposition (20 à 27°C) augmentait la toxicité du Cd de 26%, du Cu et Zn de 18-20% et du Pb de 14%. Par ailleurs, une augmentation de l'accumulation du Cd a été observée chez le décapode *Daphnia magna* exposée à 100 µg/L et pour des températures variant de 10°C à 26°C (Heugens et al., 2003). D'autres études ont également rapporté qu'une élévation de température augmentait la biodisponibilité et l'accumulation du Cd chez le chironome (Bervoets et al., 1996), l'isopode, *Asellus aquaticus* (Van Hattum et al., 1993), l'anguille (Yang et Chen, 1996) ou encore le gammare (Pellet et al., 2009). Néanmoins, en ce qui concerne l'étude de Pellet et al. (2009), chez le gammare, l'effet de la température (de 8°C à 16°C) sur la biodisponibilité du Cd était négligeable par rapport à d'autres facteurs comme Ca²⁺.

(v) *Interactions avec d'autres métaux*

L'accumulation métallique dans un organisme peut être diminuée en raison de compétitions entre les métaux. L'interaction métal-métal la plus documentée chez l'humain et l'animal concerne le Cd et le Zn (revue de Brzóska et Moniuszko-Jakoniuk, 2001). Chez les organismes aquatiques d'eau douce, des études ont mis en évidence une diminution de l'accumulation du Cd en présence de Zn chez *D. magna* (Komjarova et Blust, 2008), la palourde, *A. cygnea* (Hemelraad et al., 1987) ou encore la moule zébrée, *D. polymorpha* (Bourgeault et al., 2010).

2.3.2. *Influence des facteurs biotiques*

La biodisponibilité d'un métal peut être différente selon l'organisme exposé et son état physiologique. En effet, des facteurs biotiques tels que l'âge, le sexe, le cycle de reproduction ou de mue, la taille ou encore l'histoire de vie peuvent influencer la capacité d'un métal à pénétrer dans un organisme.

(i) Age/taille, sexe et cycle de vie reproduction

Il est généralement observé que les concentrations métalliques dans les organismes aquatiques sont négativement corrélées à la masse, la taille ou l'âge des individus. Ceci s'explique par un phénomène de biodilution des métaux dans les organismes (Verschoor et al., 2012). Chez l'amphipode, *G. pulex*, les teneurs internes en Cd et Cu diminuent avec la taille des individus (Geffard et al., 2007), comme observé chez l'huître *Crassostrea gigas* (Mouneyrac et al., 1998). Des résultats similaires ont également été observés pour le Pb chez le bivalve marin, *Mytilus galloprovincialis*, ou le poisson méditerranéen, *Scomberesox saurus* ; le Cu chez *D. magna* et le Cd chez *G. roeseli* (Canli et Atli, 2003; Conti et al., 2008; Verschoor et al., 2012). En revanche, Conti et al. (2008) ont observé une relation positive entre les teneurs en Cd et Cu chez *Mytilus galloprovincialis* et la masse des organismes.

Le dimorphisme mâle/femelle vis-à-vis de la biodisponibilité des métaux est peu documenté. Parmi les études disponibles, celles de Geffard et al. (2007) et de Serafim et Bebianno (2001) n'ont rapporté aucune différence significative entre mâles et femelles pour l'accumulation du Cd et Cu chez *G. pulex* et chez la palourde, *Ruditapes decussatus*, respectivement.

La période de reproduction et le cycle de mue induisent des changements biochimiques chez les organismes qui peuvent influencer leurs capacités à bioaccumuler les contaminants tels que les métaux. Il a très bien été décrit chez les bivalves que la période de reproduction était accompagnée d'une augmentation de la masse lipidique. Ces variations de taille et de poids durant les cycles de reproduction peuvent s'accompagner d'une variabilité de la bioaccumulation des métaux comme cela a été observé pour le Cd, Cr, Cu, Ni, Pb et Zn chez la moule zébrée (Kraak et al., 1991; Kwan et al., 2003). Chez les amphipodes, la période de mue est signe de changement physiologique profond en raison principalement de la forte demande en Ca^{2+} pour reformer sa cuticule. Il a été par exemple observé chez le gammare, que les vitesses d'accumulation du Cd étaient plus élevées chez les organismes en premier stade de mue, durant lequel la demande calcique est la plus forte (Wright, 1980). Les auteurs ont alors avancé deux hypothèses pour expliquer l'augmentation de l'internalisation du Cd : le Cd entre via les canaux calciques dont l'activité est augmentée ou bien la cuticule est plus perméable.

(ii) Histoire de vie des organismes

Les organismes aquatiques évoluent dans des environnements naturels et anthropisés très divers, caractérisés par des températures, des niveaux calciques et des niveaux de contamination très différents, auxquels les organismes se sont acclimaté localement et pouvant se traduire par la modulation de fonctions physiologiques impliquées dans la bioaccumulation de certains métaux. Par conséquent, une acclimatation pourrait induire des capacités différentes à accumuler et/ou éliminer les métaux.

Deux types d'adaptation peuvent être distingués : d'une part, l'adaptation physiologique ou encore acclimatation, qui se produit en réponse à un stress au cours de la vie de l'individu et qui n'est pas transmissible à la future génération (réversible) ; et d'autre part, l'adaptation génétique, qui est le fruit d'une évolution sur plusieurs générations d'organismes exposés au même stress et conduisant à une sélection des génotypes tolérants (transmissible) (Amiard-Triquet et al., 2011). L'origine physiologique ou génétique d'une éventuelle modulation des capacités à accumuler et/ou éliminer les métaux chez les organismes ne faisait pas l'objet de ces travaux de thèse. Dans le présent manuscrit, le terme adaptation sera générique aux deux mécanismes et le terme acclimatation sera préféré afin de limiter toute ambiguïté.

Parmi les différentes histoires de vie, deux grandes catégories de facteurs peuvent être considérées dans ce travail de thèse : les conditions physicochimiques du milieu (dureté, salinité, etc.) et la pré-exposition aux métaux. Les études relatives à la possibilité d'une acclimatation des organismes à la contamination métallique et son implication dans leur capacité à accumuler et/ou éliminer les métaux sont relativement bien documentées, tandis que celles concernant l'impact d'une acclimatation à un environnement physicochimique sur les capacités de bioaccumulation des métaux sont plus rares et touchent essentiellement le milieu marin.

Conditions physicochimiques : En milieu marin, plusieurs études se sont intéressées à l'effet d'une acclimatation des organismes à différentes salinités sur les capacités de bioaccumulation des métaux (notamment en milieu estuarien). Ainsi, Blackmore et Wang (2003) ont montré que des bivalves, *Perna viridis*, provenant d'un estuaire très salé, accumulaient plus rapidement le Cd qu'une population collectée dans un estuaire moins salé, pour les mêmes conditions d'exposition en laboratoire. En eau douce, une revue de Cairns et Yan (2009) a rapporté que des crustacées (daphnies, gammarés et écrevisses) vivant dans des milieux faiblement ionisés (conductivité très faible) avaient des activités de transport du calcium, du sodium ou des chlorures plus élevées, afin de maintenir leurs besoins physiologiques et de contrer la fuite d'ions vers le milieu extérieur. Des résultats similaires ont été rapportés chez le poisson zèbre (Boisen et al., 2003). Il a également été avancé que ces ions pouvaient agir sur la physiologie des organismes, notamment vis-à-vis de la densité des canaux ioniques (Buchwalter and Luoma, 2005). Ainsi la modification de ces fonctions physiologiques, si elles sont impliquées dans l'accumulation de certains métaux (métaux empruntant des voies d'entrée similaires), peut conduire à des capacités différentes à accumuler et/ou éliminer les métaux chez ces organismes.

Pré-exposition aux métaux : Les organismes pré-exposés à une contamination métallique peuvent développer une tolérance vis-à-vis des métaux via une modification de leur capacité d'accumulation, de détoxification et/ou d'excrétion des métaux (Blackmore et Wang, 2002;

Tessier et al., 1995). L'effet de la pré-exposition des organismes à un ou plusieurs métaux a été majoritairement étudié d'un point de vue toxique (Chiodi Boudet et al., 2013). En revanche, les études considérant les capacités à accumuler et/ou à éliminer les métaux chez les organismes pré-exposés sont moins abondantes, particulièrement quand il s'agit d'organismes d'eau douce. Ainsi, il a été montré que les truites arc-en-ciel, *Oncorhynchus mykiss*, et les moules marines, *Perna viridis*, pré-exposées au Cd, accumulaient plus de Cd que des organismes non pré-exposés (Blackmore et Wang, 2002; Hollis et al., 1999; McGeer et al., 2007). Chez le gammare, une récente étude a rapporté que les teneurs en Cu et en Zn des organismes autochtones chroniquement exposés à ces deux métaux étaient supérieures à celles observées dans des organismes transplantés issus d'une population de référence (Khan et al., 2011). Chez la truite arc-en-ciel, *Oncorhynchus mykiss*, il a été observé que des organismes pré-exposés durant 1 mois au Cd (3 µg/L) et au Cu (75 µg/L) en laboratoire accumulaient plus de Cd que les organismes contrôles (non pré-exposés) (McGeer et al., 2007).

3. Estimation de la spéciation et biodisponibilité des ETM en milieu aquatique

Des méthodes ont été développées et proposées afin d'accéder à la concentration de l'ion métallique libre (M^{n+}), ou ce qui s'en approche le plus. Ce sont des méthodes analytiques (électrochimiques, séparatives physiques : filtration, ultrafiltration, ou chimiques par échange d'ions : utilisation de résines complexantes) ou des méthodes de calcul de la spéciation via des modèles. Plus récemment, les techniques d'échantillonnage passif ont été proposées pour une évaluation de la spéciation *in situ* (plus particulièrement la technique DGT). Toutefois, toutes ces méthodes ne donnent pas accès à la fraction réellement bioaccumulée par l'organisme dans la mesure où elles ne peuvent pas intégrer certaines interactions qui modulent de façon espèce-spécifique la biodisponibilité, comme la compétition entre les ions métalliques et les ions majeurs.

3.1. Méthodes d'analyse de la spéciation des ETM

3.1.1. Méthodes électrochimiques

Les méthodes électrochimiques reposent sur la mesure d'un courant induit par l'oxydation ou la réduction de l'ion métallique à une électrode. Parmi ces méthodes, on distingue principalement la potentiométrie et la voltamétrie.

La potentiométrie utilise des électrodes spécifiques et permet une mesure directe de la concentration des ions libres (M^{n+}) présents dans la solution. Cependant, seules quatre électrodes sont disponibles pour les métaux (Ag, Cu, Cd et Pb) et les limites de détections sont élevées (Monbet et Coquery, 2013).

La voltamétrie permet, quant à elle, d'atteindre de faibles limites de détections et est largement utilisée dans l'étude de la spéciation des métaux puisqu'elle n'est pas spécifique. Les espèces mesurées sont les ions métalliques libres en solution, ainsi que tous les complexes métalliques capables de se dissocier à la surface de l'électrode lors de la mesure, i.e. les complexes métalliques dits « labiles ». Il est par ailleurs généralement admis que la concentration en métal labile est très proche de la concentration en métal biodisponible.

Même si ces méthodes permettent de mesurer de manière fiable l'ion libre (M^{n+}) (ou les concentrations labiles), elles restent difficiles à mettre en place dans le milieu naturel, car elles sont limitées par d'importants problèmes d'interférences dues à la présence d'autres ions ou de matières organiques (Roman and Rivera, 1992).

3.1.2. Méthodes séparatives

Elles reposent sur la séparation des différentes formes chimiques en solution, en fonction de leurs caractéristiques physiques ou chimiques, puis consistent en une analyse classique par spectrométrie (AAS, ICP-MS) de ou des compartiments d'intérêt.

(i) Séparation par la taille

Ces méthodes reposent sur la séparation physique de certaines formes chimiques présentes dans la phase dissoute (après filtration des eaux brutes à travers un filtre de diamètre 0.45 μm). Parmi les méthodes de séparation, on peut citer des procédés faisant appel à la force de gravité (ultracentrifugation), à un gradient de pressions (ultrafiltration tangentielle ou non) ou encore à un gradient de concentrations (dialyse).

(ii) La technique DGT : Diffusive Gradient in Thin film : mesure des concentrations labiles de métal

Il est difficile de déterminer toutes les espèces chimiques métalliques présentes en solution et il est également délicat de mesurer directement la fraction libre d'un métal dans le milieu naturel. La mesure de métaux labiles a donc été envisagée. Le terme labile regroupe les concentrations en ions libres ainsi que les complexes métalliques faiblement liés à des ions minéraux ou à des molécules organiques, et facilement dissociables dans la solution environnante (Tusseau-Vuillemin et al., 2007).

La technique DGT a été développée par Zhang et Davison (1995) et permet de quantifier les concentrations en métaux labiles dans le milieu. La technique DGT repose sur la diffusion des ions métalliques à travers un hydrogel (dont la vitesse d'accumulation est contrôlée et connue) pour venir se fixer de manière irréversible sur la résine chélatante (Figure I-5).

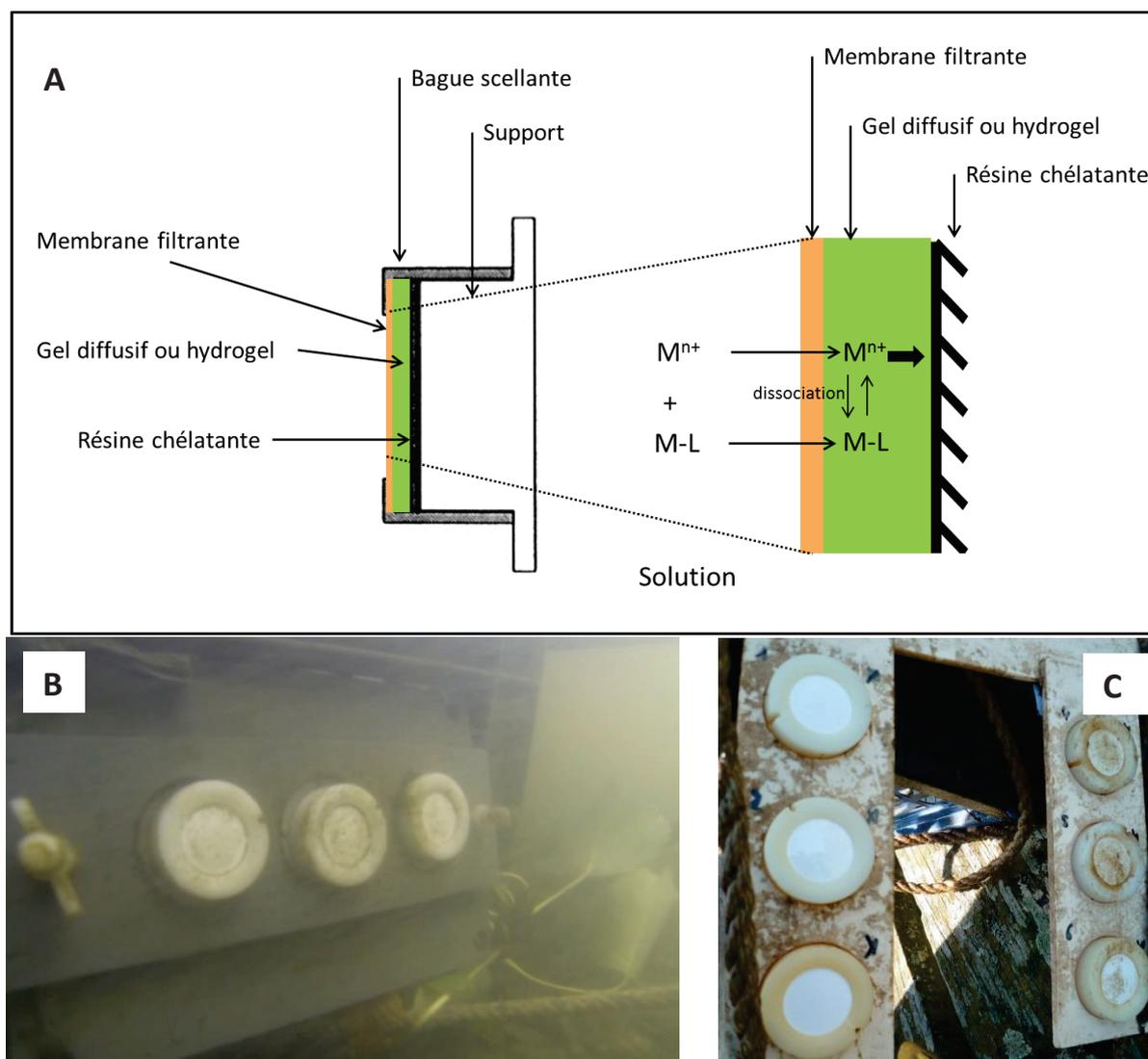


Figure I-5 : (A) Représentation schématique d'une DGT à piston et principe de diffusion du métal à travers l'hydrogel (M = métal libre et L = ligand). (B) DGT déployées en rivière et (C) DGT avant (à gauche)/après déploiement (à droite).

Ensuite, les métaux chélatés sur la résine sont élués par une solution acide, puis la concentration en métal est analysée par les méthodes classiques (spectrométrie AAS, ICP-MS) et directement ramenée à la concentration labile (C_{labile}) dans le milieu étudié.

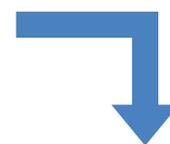
Outre sa simplicité d'utilisation, la technique DGT a l'avantage d'intégrer les variations temporelles de concentrations métalliques durant son temps de déploiement *in situ* et de concentrer les métaux, ce qui facilite considérablement les mesures chimiques.

Néanmoins, la fiabilité des résultats obtenus *in situ* peut être limitée par le phénomène de « biofouling », c'est-à-dire le développement de biofilm à la surface du dispositif, qui peut altérer la diffusion du contaminant à travers la résine (Uher et al., 2012). Par ailleurs, la

technique DGT ne permet pas de tenir compte de l'influence des cations compétiteurs sur la biodisponibilité des métaux.

3.1.3. Modèles de spéciation

Afin de prédire la répartition des différentes formes métalliques, et notamment la forme de l'ion libre, présentes dans une solution donnée, des modèles mathématiques ont été développés. Ces modèles sont basés sur des équilibres thermodynamiques des différents complexes métalliques et requièrent, pour le calcul, la connaissance des concentrations dissoutes des différentes espèces qui composent le milieu (métaux, DOC, ions majeurs, etc.), ainsi que les paramètres tels que la température, le pH, etc. Parmi les modèles de spéciation les plus couramment utilisés, on peut citer MINEQL⁶, Visual Minteq ou encore le WHAM⁷. Néanmoins, de tels modèles nécessitent d'avoir accès aux différentes constantes thermodynamiques, ce qui n'est pas toujours le cas. De plus, cette approche nécessite également d'avoir une caractérisation physicochimique du milieu exhaustive, ce qui représente une contrainte forte à son utilisation à large échelle.



Plomb à 0.1 mg/L

Pb+2	31.995	Pb+2
	7.041	PbOH+
	0.021	Pb(OH) ₂ (aq)
	0.367	PbCl+
	0.870	PbSO ₄ (aq)
	0.053	Pb(CO ₃) ₂ -2
	39.111	PbCO ₃ (aq)
	20.541	PbHCO ₃ +

Figure I-6 : Exemple d'interface de modèle de spéciation, ici Visual MINTEQ, et de sortie de modèle pour l'exemple de la spéciation du Pb dans de la Volvic.

⁶ Schecher and Driscoll (1988)

⁷ Windermere Humic Aqueous Model, (Tipping, 1994)

3.2. Suivi des ETM dans le biote : la biosurveillance

La mesure de la bioaccumulation, c'est-à-dire des concentrations en contaminants dans un organisme, est une mesure intégrant les fluctuations spatio-temporelles de la contamination dans un milieu donné. De plus, la bioaccumulation est directement reliée à la contamination biodisponible, car elle intègre tous les paramètres biologiques et physicochimiques qui peuvent influencer la biodisponibilité (Rainbow and Phillips, 1993) (notamment ceux évoqués dans la partie 2.3 de ce chapitre). Pour toutes ces raisons, la bioaccumulation peut être considérée comme une mesure pertinente pour le suivi de l'état chimique des milieux aquatiques (Besse et al., 2013).

La biosurveillance (biomonitoring en anglais) est un outil de veille de la qualité de l'eau qui consiste à suivre la contamination dans les tissus des organismes aquatiques (Goldberg, 1975). On peut distinguer deux méthodes de biosurveillance. La première, définie comme passive, repose sur le prélèvement et l'analyse d'organismes autochtones. La seconde, dite active, est basée sur la transplantation d'organismes calibrés issus d'une population de référence (Besse et al., 2012).

Le choix de l'espèce utilisée pour la biosurveillance dépend de plusieurs critères (Beeby, 2001; Phillips, 1977) ;

- les organismes doivent avoir la capacité à accumuler le contaminant étudié et être résistants à ce dernier (i.e. avoir un faible taux de mortalité),
- avoir une répartition géographique large, un mode de vie sédentaire et être abondant,
- être facile à prélever et à identifier,
- avoir une taille suffisante pour permettre des mesures de concentration dans les tissus.

Dans le cas de la biosurveillance active, on peut ajouter aux caractéristiques précédentes que les organismes doivent être assez robustes pour supporter des conditions d'encagement *in situ* et qu'il est nécessaire de disposer d'une population témoin (i.e. vivant dans une zone non contaminée) présente en quantité suffisante toute l'année.

3.2.1. La biosurveillance passive

Les premiers programmes de biosurveillance ont été mis en place dans les années 1970 et concernaient la surveillance des milieux marins. C'est le « Mussel Watch program », initié aux États-Unis et basé sur l'utilisation de bivalves (Goldberg, 1975), ainsi que de son

homologue français, le ROCCH⁸ (Amiard-Triquet et al., 1999). Les programmes de biosurveillance en milieux aquatiques d'eau douce sont plus récents et moins développés. Les études, basées sur une approche passive, concernent souvent de petites zones géographiques, voire même des approches amont-aval d'un cours d'eau. Si la biosurveillance passive est adaptée pour le suivi temporel de la contamination, elle n'est en revanche pas recommandée pour des suivis à large échelle (nationale par exemple). Il est en effet complexe d'obtenir des données de bioaccumulation comparables à large échelle dans les milieux d'eau douce, contrairement aux milieux marins, en raison de l'hétérogénéité des hydrosystèmes rencontrés (taille, caractéristiques physicochimiques...). Cette hétérogénéité se traduit certes par une grande diversité d'espèces disponibles pour la biosurveillance, mais aussi par un nombre restreint d'espèces représentatives d'un large territoire. Par conséquent, la mise en place de programme de biosurveillance passive à large échelle est limitée (Besse et al., 2012, 2011). En Europe, quelques campagnes de biosurveillance passives des milieux d'eau douce ont été menées. Ainsi, en 1994, un programme belge⁹, basé sur la pêche et l'analyse d'anguilles autochtones, a été initié pour suivre la contamination en PCB (polychlorobiphényle), pesticides et ETM dans les eaux flamandes. En France, le prélèvement de mousses aquatiques autochtones a été utilisé pour la surveillance de la contamination métallique (Tilghman et al., 2008). Une récente étude (Lebrun et al., 2014)(Lebrun et al., 2014), basée sur le prélèvement de gammarex autochtones, a été réalisée pour suivre la contamination en Cu, en Mn et en Zn à l'échelle du bassin de la Seine.

L'une des principales limites de l'approche passive est que le suivi de la contamination ne peut pas avoir lieu sur des sites où l'espèce d'intérêt n'est pas présente. C'est pourquoi, une approche basée sur la transplantation d'organismes *in situ* s'est peu à peu développée.

3.2.2. La biosurveillance active

La biosurveillance active permet (i) d'effectuer un suivi des sites dénués de l'espèce à étudier ; (ii) de limiter l'influence d'un certain nombre de facteurs biotiques sur la bioaccumulation en utilisant des organismes homogènes par la taille, le sexe, le cycle de reproduction, etc. ; (iii) d'utiliser une population dont l'histoire de vie est connue ; (iv) de contrôler le temps d'exposition des organismes et leur condition de vie via l'apport contrôlé de nourriture. Les organismes transplantés sont souvent issus d'une population de référence connue et la standardisation de la méthode d'encagement va permettre une comparaison fiable et robuste de la bioaccumulation entre les sites (Besse et al., 2012).

⁸ Réseau d'observation de la contamination chimique, anciennement RNO (Réseau national d'observation) créé en 1974 par le ministère chargé de l'Environnement. Il est actuellement coordonné par l'Ifremer pour le compte du ministère de l'Écologie et du Développement Durable.

⁹ Flemish Eel Pollutant Monitoring Network, <https://www.inbo.be/>, consulté en juin 2015

En 1996, le premier programme français de surveillance active a été initié. Il s'agit du programme RINBIO¹⁰, utilisant des moules transplantées, et qui avait pour but de suivre les tendances de la contamination métallique et organique sur le littoral Méditerranéen. Bien que la biosurveillance active ait un réel intérêt pour suivre la contamination à large échelle, cette approche est encore peu développée.

Parmi les organismes utilisés pour le suivi de la contamination métallique, on retrouve des macrophytes tels que les bryophytes (Mersch and Reichard, 1998), des macroinvertébrés tels que la palourde, la moule zébrée, l'anodonte, le gammare, le chironome (Andrès et al., 1999; Bervoets et al., 2005, 2004; Besse et al., 2013; Bourgeault et al., 2010; Couillard et al., 1995; Lebrun et al., 2015), et des poissons tels que la carpe et la perchaude (Bervoets et al., 2009; Couture et al., 2015; Reynders et al., 2008). Généralement, le nombre de sites d'étude est compris entre 2 et 10, avec un maximum de 56 (Flandres, Belgique) dans l'étude de Bervoets et al. (2005) utilisant *Dresseina polymorpha*. Depuis quelques années, les amphipodes du genre *Gammarus* sont des candidats intéressants dans la mise en place de programmes de biosurveillance active, car ils sont retrouvés abondamment dans les milieux aquatiques, où ils jouent un rôle écologique fort (dégradation de la litière et source de nourriture de nombreux prédateurs). Ils sont faciles à collecter, à manipuler, robustes, et, leurs petites tailles (1 cm) font qu'ils sont appropriés pour l'encagement. Actuellement, les études de suivi de la contamination métallique basées sur l'encagement de gammares en Europe sont peu répandues et concernent essentiellement les espèces les plus représentatives, *Gammarus pulex* et *G. fossarum* (Besse et al., 2013; Fialkowski et al., 2003a; Lebrun et al., 2015). Il est à noter que l'étude de Besse et al. (2013) concernait 27 sites (région Rhône-Alpes).

¹⁰ Réseau intégrateurs biologiques développé en 1996 par l'Ifremer dans le cadre du Schéma directeur d'aménagement et de gestion des eaux (SDAGE) du Bassin Rhône Méditerranée Corse et conçu en partenariat avec l'Agence de l'eau Rhône Méditerranée & Corse (Andral, 2002; Andral and Tomasino, 2010).

4. Modélisation cinétique de la bioaccumulation des ETM dans les organismes aquatiques

La bioaccumulation est le processus par lequel un organisme internalise une substance à une vitesse plus grande que celle avec laquelle il l'excrète ou la métabolise (Ramade, 1992). Pour évaluer la bioaccumulation des contaminants du milieu dans les organismes, deux approches sont généralement utilisées : le modèle d'équilibre et le modèle cinétiques (Landrum et al., 1992). Le modèle d'équilibre repose sur l'hypothèse que l'organisme est dans un état stationnaire avec son milieu, i.e. que l'exposition et les facteurs environnementaux et physiologiques affectant l'accumulation et l'excrétion du contaminant restent constants pendant un temps suffisant. Dans ces conditions simplifiées, l'état stationnaire est généralement décrit par le facteur de bioconcentration (BCF) qui correspond au rapport de la contamination de l'organisme sur celle du milieu. L'état d'équilibre est une hypothèse forte, qui peut être long à atteindre et complique les expérimentations en laboratoire. L'approche cinétique n'est pas contrainte par l'hypothèse d'équilibre. Les modèles cinétiques sont généralement divisés en deux catégories : le modèle cinétique à compartiments et le modèle cinétique à base physiologique. Le modèle à compartiments décrit les flux d'un contaminant entre les compartiments généralement deux qui sont l'eau et l'organisme. Ce modèle repose sur une cinétique d'ordre un, où l'organisme est considéré comme un compartiment unique et homogène, caractérisé par un taux d'entrée et un taux de sortie du contaminant. Le modèle à base physiologique, quant à lui, prend en compte la physiologie de l'organisme en intégrant clairement la notion de taux d'ingestion de la nourriture (IR), d'efficacité d'assimilation (AE), ainsi que le taux croissance des organismes (g). Parmi les modèles cinétiques à base physiologique, le modèle biodynamique est le plus communément utilisé pour évaluer la bioaccumulation chez les organismes aquatiques (Luoma and Rainbow, 2005). Ainsi, il a été étudié pour divers métaux (Cr, Ag, Se, Cd, Zn, Co, Ni) chez de nombreux invertébrés aquatiques (marins et dulçaquicoles) parmi lesquels la moule marine et d'eau douce, la limnée, le gammare, le ver marin, la larve d'insecte *Chaoborus* (Bourgeault et al., 2010; Croteau and Luoma, 2007; Lebrun et al., 2011; Luoma and Rainbow, 2005; Ponton and Hare, 2010).

4.1. Modèle biodynamique

Le modèle biodynamique décrit la concentration de métal accumulé dans un organisme comme la résultante des flux entrants de métal par voie dissoute et trophique et d'un flux sortant (Figure I-7). Il permet également de prendre en compte le taux de croissance (conduisant à une biodilution des contaminants dans les tissus) des individus durant le temps d'exposition :

$$\frac{dC_{org}}{dt} = [(k_{in} \times C_w) + (AE \times IR \times C_f)] - [(k_{out} + g)(C_{org})] \quad \text{Eq. 1}$$

Où

C_{org} = concentration de métal dans l'organisme ($\mu\text{g/g}$)

t = le temps en jour (j)

k_{in} = constante cinétique d'accumulation par voie dissoute (L/g/j)

C_w = concentration métallique du milieu

AE = efficacité d'assimilation (%)

IR = taux d'ingestion ($\text{g}_{\text{(nourriture)}}/\text{g}_{\text{(organisme)}}/\text{j}$)

C_f = concentration métallique dans la nourriture ($\mu\text{g/g}$)

k_{out} = constante cinétique d'élimination (1/j)

g = taux de croissance (1/j)

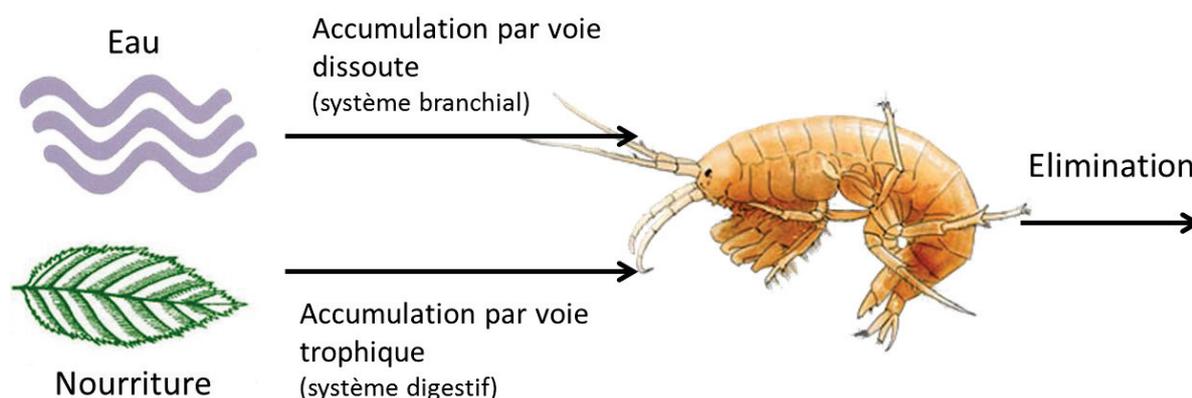


Figure I-7 : Représentation schématique des différentes sources et voies d'exposition pouvant contribuer à la bioaccumulation des contaminants chez les organismes aquatiques.

En considérant que les organismes atteignent un état stationnaire avec le milieu d'exposition ($t \rightarrow \infty$), la concentration de métal dans l'organisme (C_{ss} , $\mu\text{g/g}$) est exprimée par :

$$C_{ss} = \frac{k_{in} \times C_w + AE \times IR \times C_f}{k_{out} + g} \quad \text{Eq. 2}$$

Par ailleurs, l'approche biodynamique offre la possibilité d'intégrer au modèle certains facteurs influençant la biodisponibilité du métal tels que les paramètres physicochimiques du milieu. Ainsi, chez la moule zébrée, Bourgeault et al. (2010) ont rapporté un effet compétiteur entre le Ca^{2+} et le Cd, se traduisant par une diminution de l'accumulation du Cd (i.e. diminution de la constante k_{in}) qui a été intégrée au modèle en exprimant la constante k_{in} comme suit :

$$k_{in} = \frac{k_{in}(0)}{1 + \sum_i \frac{[C_i]}{K_{iC_i}}} \quad \text{Eq. 3}$$

Où

$k_{in}(0)$ = constante cinétique d'accumulation en absence de calcium dans le milieu (L/g/d)

C_i = concentration du cation i (mg/L)

K_{iC_i} = constante de demi-saturation, i.e. la concentration de cation i nécessaire pour diviser par deux la constante d'accumulation k_{in} du métal (mg/L)

Plus la constante de demi-saturation K_{iC_i} est faible, plus le pouvoir compétiteur du cation est fort.

4.2. Paramètres du modèle cinétique

La calibration du modèle s'effectue via la détermination de ses paramètres : k_{in} , k_{out} , AE, et IR. Pour cela, les flux de métal entrants et le flux sortant chez l'organisme sont établis grâce à la réalisation de cinétiques d'accumulation et de dépuration du métal en laboratoire dans des conditions contrôlées, i.e. où les concentrations métalliques d'exposition sont connues et constantes, ainsi que les tous les paramètres physicochimiques.

4.2.1. Constantes d'accumulation et de dépuraction : k_{in} et k_{out}

Lors d'une exposition par voie dissoute uniquement, les paramètres AE et IR ne sont pas pris en compte. Dans les cas où le taux de croissance (g) est négligeable, le modèle cinétique s'apparente alors à un modèle à compartiments (eau-organisme). Les paramètres cinétiques k_{in} et k_{out} sont alors déterminés respectivement à travers la phase d'accumulation et la phase de dépuraction.

Durant la phase d'accumulation, les organismes sont exposés à une concentration constante de métal ($C_w = \text{constante}$) et en absence de nourriture. Ainsi, la bioaccumulation par voie dissoute est exprimée par une relation du premier ordre :

$$\frac{dC_{org}}{dt} = (C_w \times k_{in}) - (k_{out} \times C_{org}) \quad \text{Eq. 4}$$

L'intégration de l'Eq. 4 permet de caractériser l'accumulation du métal dans l'organisme comme suit:

$$C_{org}(t) = \frac{k_{in}C_w}{k_{out}}(1 - e^{-k_{out}t}) \quad \text{Eq. 5}$$

Pendant la phase de dépuraction, les organismes préalablement exposés sont placés dans un milieu non contaminé où C_w est nul. L'équation (Eq. 4) est réduite à :

$$\frac{dC_{org}}{dt} = -k_{out} \cdot C_{org} \quad \text{Eq. 6}$$

L'intégration de l'Eq. 6 conduit à :

$$C_{org}(t) = C_{org}(0).e^{-k_{out}.t} \quad \text{Eq. 7}$$

Où

$C_{org}(0)$ = concentration de métal dans l'organisme au début de la phase de dépuraction ($\mu\text{g/g}$).

Ensuite, les constantes cinétiques, k_{in} et k_{out} , peuvent être déterminées par régression non-linéaire en ajustant le modèle (Eq. 4) à l'ensemble des données de bioaccumulation (Ritterhoff et al., 1996). La solution de l'Eq. 4 est de la forme (Figure I-8) :

$$\left\{ \begin{array}{l} \text{Pour } t < t^* \\ \text{Pour } t > t^* \end{array} \right. \quad \begin{array}{l} C_{org}(t) = \frac{k_{in}C_w}{k_{out}} (1 - e^{-k_{out}t}) \\ C_{org}(t) = C_{org}(t^*).e^{-k_{out}.t} \end{array}$$

t^* = fin de la phase d'accumulation

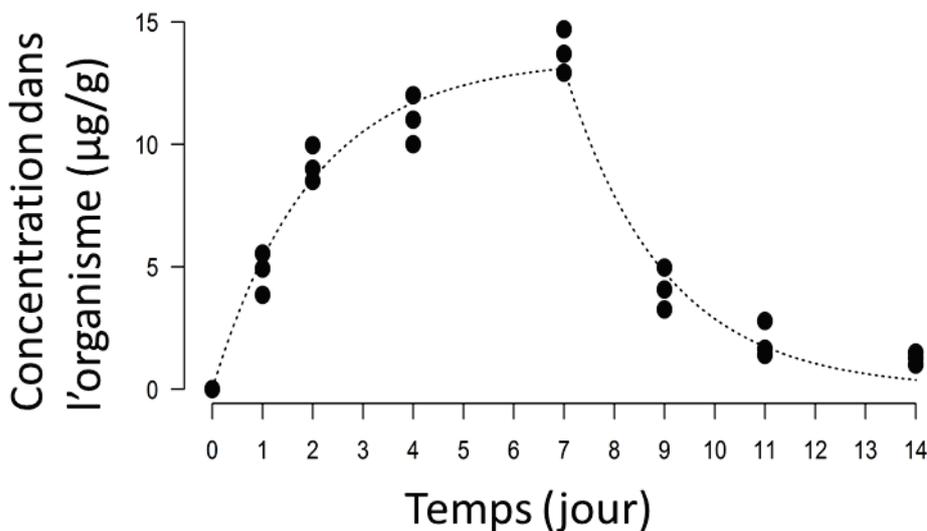


Figure I-8 : Schéma représentant l'ajustement du modèle cinétique de bioaccumulation par voie dissoute à l'ensemble des données de bioaccumulation pour la détermination des constantes cinétiques, k_{in} et k_{out} , par régression non-linéaire

4.2.2. Les paramètres de la voie trophique : AE et IR

L'efficacité d'assimilation (AE) désigne le pourcentage de métal ingéré qui va être assimilé par l'organisme. Elle est couramment déterminée par la méthode du pulse-chase feeding qui consiste à nourrir les organismes avec de la nourriture contaminée, dopée avec des traceurs de métaux (isotopes radioactifs ou isotopes stables). Ensuite, les organismes sont mis à dépurifier et la proportion de métal assimilée peut être déterminée (Croteau et al., 2007; Wang and Fisher, 1999).

Le taux d'ingestion, IR, correspond à la quantité de nourriture ingérée par l'organisme en un jour, ramené au poids sec de l'organisme.

4.3. Cas du cuivre : modèle de saturation

Dans certains cas, la bioaccumulation des métaux est mieux décrite par un modèle de saturation (Croteau and Luoma, 2007; Lebrun et al., 2012). En effet, pour certains métaux comme le cuivre, les mécanismes d'entrée du métal peuvent saturer, de telle sorte que l'influx par voie dissoute atteint un maximum (Borgmann et al., 2004). Dans ce cas, la constante d'accumulation, k_{in} , peut être exprimée de la manière suivante :

$$k_{in} = \frac{k_{in(max)}}{1 + (C_w/K)} \quad \text{Eq. 8}$$

Où

$k_{in(max)}$ = constante d'accumulation maximum de métal ($\mu\text{g/g/j}$)

K = constante de demi-saturation, qui correspond à la concentration de métal du milieu (C_w) nécessaire pour diminuer de moitié l'influx de métal ($\mu\text{g/L}$).

Finalement, la concentration métallique interne des organismes après une exposition par voie dissoute à l'état stationnaire avec le milieu est définie par :

$$C_{ss} = \frac{\frac{k_{in(max)}}{1 + (C_w/K)} \times C_w}{k_{out}} + C_{Bk} \quad \text{Eq. 9}$$

Où

C_{Bk} = concentration basale de métal dans l'organisme en absence de contamination ($\mu\text{g/g}$)

En effet, la concentration de métal initialement présente dans les organismes avant exposition (niveau basal) est souvent proche de zéro (notamment dans le cas des métaux non-essentiels) et peut être négligée ; mais dans le cas de métaux essentiels comme le Cu, ce niveau basal est particulièrement élevé et est donc ajouté au calcul de la concentration de métal accumulée après exposition (Borgmann et al., 2004).

4.4. Validation des modèles cinétiques *in situ*

À partir des données chimiques du milieu et des paramètres cinétiques déterminés en laboratoire, il est possible de prédire la bioaccumulation dans les organismes. La validation de la capacité prédictive des modèles *in situ* se fait alors par le biais de l'évaluation de l'adéquation entre la bioaccumulation prédite et la bioaccumulation observée *in situ* souvent obtenues à partir d'organismes autochtones. Ainsi, une étude de Luoma et Rainbow (2005) a montré que le modèle biodynamique permettait de prédire correctement la bioaccumulation *in situ* de certains métaux (Ag, Cd, Se, Zn et Co) chez des organismes marins pour l'essentiel, tels que des bivalves, du zooplancton, des amphipodes, ce qui a permis de valider les constantes du modèle dans des conditions environnementales. Contrairement au milieu marin, la littérature relative à la modélisation de la bioaccumulation des métaux chez des espèces d'eau douce est beaucoup moins abondante, et peu d'études sont allées jusqu'à tester *in situ* les modèles calibrés en laboratoire (Cooper et al., 2010; Ponton and Hare, 2010; Roditi et al., 2000). Pourtant, la validation *in situ* des modèles cinétiques développés en laboratoire est une étape cruciale pour l'évaluation de leur pertinence environnementale dans la mesure où, en conditions naturelles, l'influence des facteurs abiotiques et biotiques sur la biodisponibilité des métaux peut se traduire par des modulations des constantes d'accumulation et/ou d'élimination des métaux chez les organismes cibles. Différentes études concernant la bioaccumulation du Cd ont par exemple observé une diminution de la constante cinétique d'accumulation, k_{in} , lorsque les concentration en calcium du milieu augmentaient (Bourgeault et al., 2010; Pellet et al., 2009). De même, Shi et Wang (2004) ont mis en évidence que la pré-exposition au Cu, à l'Ag et au Zn, affectait les constantes k_{in} déterminées pour l'Ag, le Cd, le Hg et le Zn chez la moule marine, *Perna viridis*. Ainsi, la détermination fine des paramètres des modèles cinétiques de bioaccumulation et la prise en compte des facteurs environnementaux et de l'histoire de vie des organismes pouvant influencer ces paramètres semblent essentielles pour pouvoir établir correctement le lien entre la contamination du milieu et celle des organismes et ainsi améliorer l'interprétation de la bioaccumulation en matière de contamination biodisponible dans les milieux.

CHAPITRE II

II. Matériels et méthodes

1. Modèles biologiques : *Gammarus pulex* et *Gammarus fossarum*

1.1. Morphologie générale et identification

Gammarus pulex (Linnaeus, 1758) et *Gammarus fossarum* (Koch, 1835) sont des crustacés, appartenant à la sous-classe des Malacostracés, à l'ordre des Amphipodes, à la famille des Gammaridae et au genre *Gammarus*. Le corps d'un gammare est composé comme suit : le céphalon (la tête), le péréion (ou mésosome) constitué de 7 segments libres, chacun muni d'une paire de périopodes uniramés, le pléon (ou métasome) constitué de 3 segments libres chacun muni d'une paire de pléopodes biramés, et l'urosome composé de 3 segments libres chacun muni d'une paire d'uropodes biramés (Figure II-1). Le céphalon porte des yeux (ocelles), des pièces buccales et deux paires d'antennes (A1 et A2). Les antennes A2 présentent un pédoncule formé de 4 à 5 articles et d'un flagelle. Les deux premiers périopodes portent deux paires de gnathopodes préhenseurs permettant aux gammares de se fixer sur le substrat. Les autres périopodes servent à la locomotion.

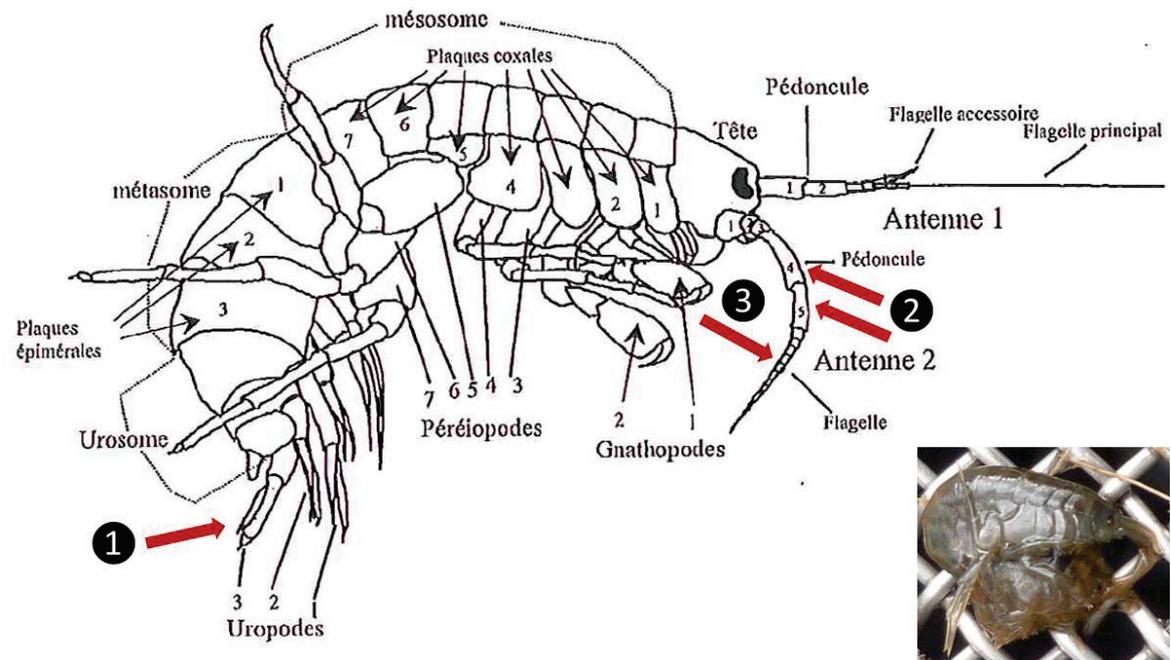


Figure II-1 : Morphologie de *Gammarus* sp. et photo d'un couple de *G. pulex* en pré-copulât (modifié d'après Roux 1970).

Au sein du genre *Gammarus*, les espèces *G. pulex* et *G. fossarum* sont les plus communément représentées dans les eaux douces d'Europe occidentale (Barnard et al. 1983; Peeters et Gardeniers, 1998; Živić et Marković, 2007). Leur différenciation morphologique repose principalement sur trois points :

- ❶ Le rapport endopodite/exopodite du troisième uropode, égal à $2/3$ chez *G. pulex*, et à $1/3$ chez *G. fossarum* (Figure II-1 et Figure II-2, a et b).
- ❷ La longueur des articles 4 et 5 de l'antenne 2, l'article 4 étant plus long que l'article 5 chez *G. pulex* (Figure II-1 et Figure II-2, c et d).
- ❸ La présence d'une brosse à soie insérée sur la face latérale interne du flagelle chez *G. pulex* mâle (Figure II-1 et Figure II-2, c et d).

En annexe, une clé de détermination de ces deux espèces est fournie.

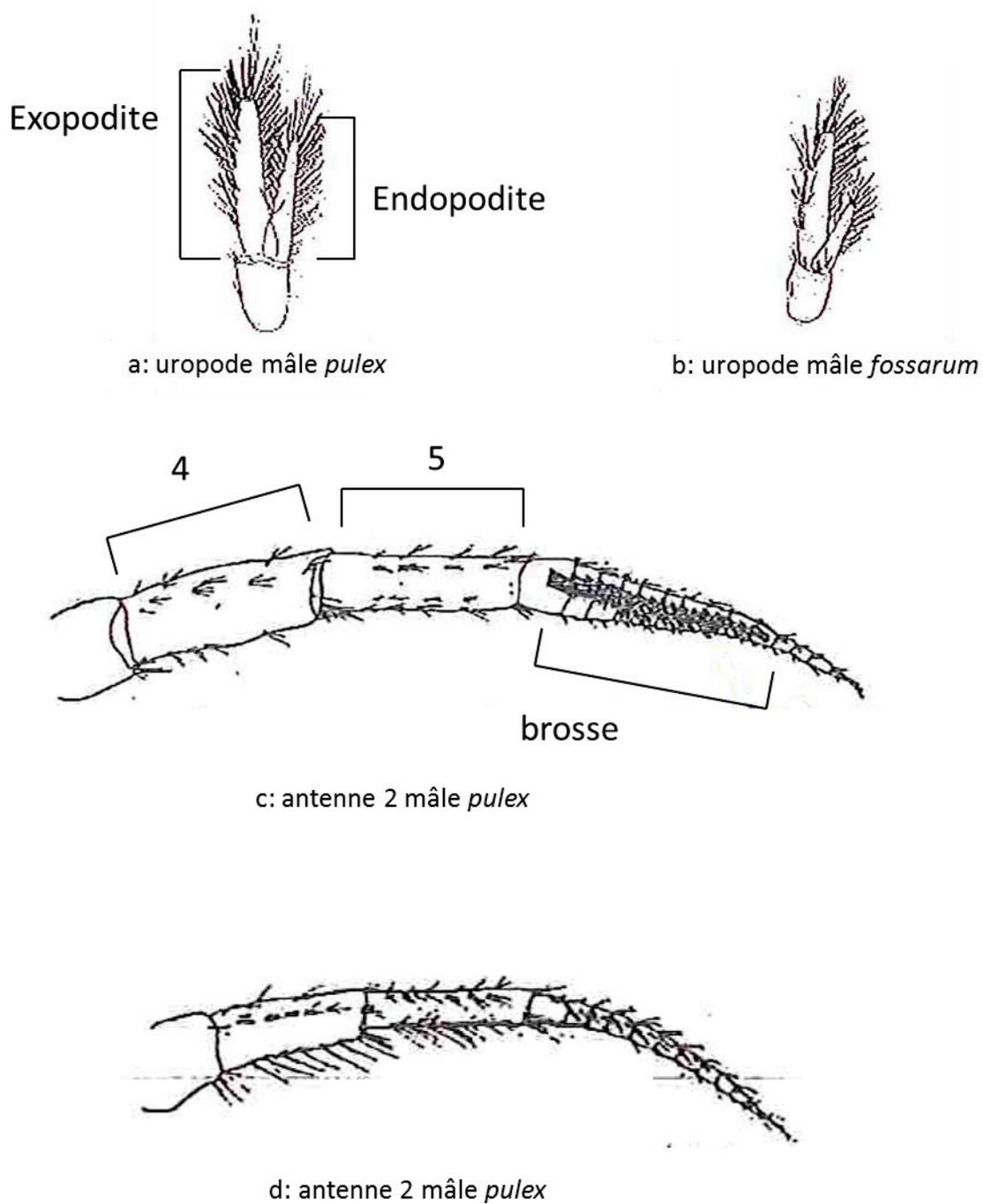


Figure II-2 : Dimorphisme entre *G. pulex* et *G. fossarum* (d'après Bollache, 2003).

1.2. Écologie du gammare

Les gammares sont des organismes épibenthiques, c'est-à-dire qu'ils vivent dans la zone de fond des milieux aquatiques, directement sur le substrat, et ont en moyenne une espérance de vie d'une à deux années (Tachet et al., 2000).

Les gammares résident dans les ruisseaux et les rivières de plaine et de montagne. Leur aire de répartition s'étend des Pyrénées à la Grèce à l'est et à la Pologne au nord, en incluant toute l'Europe centrale (Barnard et Barnard, 1983). *G. pulex* et *G. fossarum* peuvent vivre dans des eaux allant de 0° à 25°C, une température supérieure à 28°C leur étant létale (Wijnhoven et al., 2003). Généralement, *G. pulex* est d'avantage présent en plaine dans des rivières à faible débit tandis que *G. fossarum* affectionne les ruisseaux caractérisés par de forts débits et très oxygénés (Peeters et Gardeniers, 1998).

Les gammares se reproduisent plusieurs fois dans l'année, avec une activité maximale observée en avril-mai tandis que les périodes hivernales sont caractérisées par un ralentissement de la reproduction (Geffard et al., 2007). La croissance s'effectue par mues successives, ce qui induit une forte demande en calcium, car c'est un constituant majeur de la cuticule (Cairns et Yan, 2009).

Le régime alimentaire principal du gammare est détritivore, i.e. se nourrissant de matière organique végétale et animale morte. Le gammare peut également être un prédateur d'autres macroinvertébrés ou encore de poissons juvéniles (Macneil et al., 1997). Par ailleurs, des cas de cannibalisme ont déjà été observés. De par son activité de déchiqueteur, le gammare participe activement à la décomposition de la litière et contribue ainsi au cycle du carbone et des nutriments dans les écosystèmes aquatiques (Forrow and Maltby, 2000; Roussel et al., 2008).

Enfin, les gammares représentent une importante source de nourriture pour divers espèces parmi lesquelles des macroinvertébrés, des poissons, des amphibiens ou encore des oiseaux (Macneil et al., 2000). Pour ces raisons, le gammare est considéré comme essentiel au bon fonctionnement des écosystèmes aquatiques.

1.3. Utilisation des gammares en écotoxicologie et pour le suivi de la qualité chimique des milieux aquatiques

Les gammares ont fait l'objet de nombreuses études en écotoxicologie, car ils sont (i) abondamment retrouvés au sein d'habitats variés, (ii) faciles à prélever, identifier et manipuler, enfin (iii) sensibles à de nombreux stress (Kunz et al., 2010; Rinderhagen et al., 2000). Ainsi le genre *Gammarus*, et en particulier *G. fossarum* et *G. pulex*, a été utilisé pour étudier les effets de nombreux contaminants, ce qui a permis dans certains cas de développer des marqueurs à différentes échelles d'organisation biologique (sub-individuelle

comme des biomarqueurs, individuelle comme la reproduction et populationnelle comme la densité) (Dedourge-Geffard et al., 2009; Issartel et al., 2010; Lacaze et al., 2011).

Les gammares sont aussi des candidats intéressants dans la mise en œuvre de stratégie de suivi de la qualité chimique des milieux aquatiques car :

(i) ils sont communs dans les rivières d'Europe et présents toute l'année, ce qui facilite leur utilisation dans le cadre de la biosurveillance passive (prélèvement d'autochtones) ;

(ii) ils sont écologiquement pertinents (importante réserve de nourriture et rôle fondamental dans le processus de dégradation de la litière) ;

(iii) ils accumulent efficacement un grand nombre de contaminants, comme les métaux (Geffard et al., 2010; Lebrun et al., 2014, 2011) ;

(iv) leur petite taille et la facilité à les manipuler sont des critères appréciables pour leur utilisation dans le cadre de programmes de transplantation *in situ* (biosurveillance active).

Malgré ces nombreux avantages, l'utilisation du gammare pour la biosurveillance de la qualité chimique des cours d'eau reste peu documentée. Le Tableau II-I regroupe les différentes études utilisant *G. pulex* ou *G. fossarum* pour le suivi de la contamination métallique des cours d'eau. Ce tableau permet de constater qu'il n'existe pas de suivi de la contamination à large échelle comme cela peut exister en milieu marin avec l'utilisation des bivalves notamment (Andral et Tomasino, 2010).

Il est également à noter qu'une seule étude a comparé la bioaccumulation des métaux entre *G. pulex* et *G. fossarum* (Lebrun et al., 2015), montrant aucune différence significative.

Tableau II-1 : Revue des études portant sur le suivi de la contamination métallique en eau douce, basée sur l'utilisation de *G. pulex* et/ou *G. fossarum*.

Organisme	Approche	Métal	Nombre de sites	Lieu	Critères mesurés	Références
<i>G. fossarum</i>	Transplantés	Ag, As, Cd, Co, Cr, Cu, Hg, Ni, Pb, Se et Zn	27 sites	France	Bioaccumulation	(Besse et al., 2013)
<i>G. fossarum</i>	Transplantés	Cd et Zn	5 sites	France	Bioaccumulation Enzymes digestives Taux d'alimentation	(Dedouge-Geffard et al., 2013)
<i>G. fossarum</i>	Transplantés	As, Cd, Cu et Zn	4 sites	France	Bioaccumulation Taux d'alimentation Enzymes digestives survie	(Dedouge-Geffard et al., 2009)
<i>G. fossarum</i>	Autochtones	Cd, Cu, Fe, Pb, Zn	8 sites	Pologne	Bioaccumulation	(Fialkowski et al., 2003a)
<i>G. fossarum</i>	Autochtones	Cd, Cu, Fe, Pb, Zn	5 sites	Pologne	Bioaccumulation	(Fialkowski and Rainbow, 2006)
<i>G. pulex</i>	Autochtones	Cd, Cu et Zn	3 sites	France	Bioaccumulation Synthèse de MTPL	(Geffard et al., 2007)

Organisme	Approche	Métal	Nombre de sites	Lieu	Critères mesurés	Références
<i>G. pulex</i>	Autochtones et transplantés	Cu, Zn	5 sites	Royaume-Uni	Bioaccumulation Survie Stress oxydatif	(Khan et al., 2011)
<i>G. fossarum</i>	Transplantés	Cd et Zn	5 sites le long d'un axe fluvial	France	Bioaccumulation Génotoxicité	(Lacaze et al., 2011)
<i>G. pulex</i>	Autochtones	Cu, Mn, Zn	64 sites	France	Bioaccumulation	(Lebrun et al., 2014)
<i>G. fossarum</i> <i>G. pulex</i>	Transplantés	Ag, Cd, Co, Cu, Mn, Ni, Pb et Zn	3 sites le long d'un axe fluvial	France	Bioaccumulation Influence saisonnière	(Lebrun et al., 2015)

2. Expérimentations au laboratoire : cinétiques de bioaccumulation et modélisation

2.1. Résumé des expériences réalisées

Ce travail de thèse est centré sur l'étude des capacités de bioaccumulation des métaux par voie dissoute chez le gammare, en s'appuyant sur l'utilisation d'un modèle cinétique. Cette partie présente les différentes étapes ayant permis d'obtenir les données de bioaccumulation nécessaires pour calibrer le modèle cinétique, i.e. estimer les constantes d'accumulation (k_{in} , en L/g/j) et d'élimination (k_{out} , en 1/j) pour chaque métal (Cd, Cu, Ni et Pb) et chaque population de gammares étudiée. Ces étapes sont successivement (i) la pêche et le tri des organismes *in situ*, (ii) leur acclimatation aux conditions de laboratoire, (iii) leur exposition aux métaux en microcosmes et enfin (iv) le traitement et l'analyse des échantillons pour la mesure des teneurs en métaux dans les organismes. Le Tableau II-II résume les différentes expérimentations réalisées en conditions contrôlées de laboratoire et présentées dans les chapitres III.1, IV et V de ce travail de thèse.

Tableau II-II : Synthèse des conditions d'exposition pour l'ensemble des cinétiques de bioaccumulation des métaux réalisées en laboratoire.

Chapitre	Objectif	Population	Conditions d'exposition	Durée des phases (exposition et déuration)	Paramètres suivis
III.1	Modélisation de la bioaccumulation du Pb chez <i>G. pulex</i>	DOUE (<i>G. pulex</i>)	0.5 – 1 – 2.5 – 5 – 10 – 25 – 50 et 100 µg/L Pb	5 jours et 7 jours	<ul style="list-style-type: none"> • Bioaccumulation • mortalité
	Influence des facteurs physicochimiques		10 µg/L Pb + 25 mg/L Ca ²⁺ 10 µg/L Pb + 30 mg/L Na ⁺ 10 µg/L Pb + 50 mg/L Ca ²⁺ 10 µg/L Pb + 60 mg/L Na ⁺ 10 µg/L Pb + 100 mg/L Ca ²⁺ 10 µg/L Pb + 100 mg/L Na ⁺ 10 µg/L Pb + 150 mg/L Ca ²⁺ 10 µg/L Pb + 30 mg/L Mg ²⁺ 10 µg/L Pb + 60 mg/L Mg ²⁺ 10 µg/L Pb + 100 mg/L Mg ²⁺	2 jours d'exposition	

Chapitre IV	Objectif	Population	Conditions d'exposition		Durée des phases (exposition et déuration)	Paramètres suivis
<p>Variabilité naturelle inter-populations des capacités de bioaccumulation des métaux par voie dissoute chez le genre <i>Gammarus</i></p>		<p>BACU (<i>G. fossarum</i>)</p>	<p>0.5 µg/L Cd (BACU)</p>	<p>2.5 µg/L Cu (BACU)</p>	<p>7 jours et 7 jours</p>	<ul style="list-style-type: none"> Bioaccumulation mortalité
			<p>0.5 µg/L Cd (GUE)</p>	<p>2.5 µg/L Cu (GUE)</p>		
		<p>GUE (<i>G. fossarum</i>)</p>	<p>0.5 µg/L Cd (MENE)</p>	<p>2.5 µg/L Cu (MENE)</p>		
			<p>0.5 µg/L Cd (NEAU)</p>	<p>2.5 µg/L Cu (NEAU)</p>		
		<p>MENE (<i>G. pulex</i>)</p>	<p>0.5 µg/L Cd (TOUR)</p>	<p>2.5 µg/L Cu (TOUR)</p>		
			<p>40 µg/L Ni (BACU)</p>	<p>10 µg/L Pb (BACU)</p>		
		<p>NEAU (<i>G. pulex</i>)</p>	<p>40 µg/L Ni (GUE)</p>	<p>10 µg/L Pb (GUE)</p>		
			<p>40 µg/L Ni (MENE)</p>	<p>10 µg/L Pb (MENE)</p>		
		<p>TOUR (<i>G. fossarum</i>)</p>	<p>40 µg/L Ni (NEAU)</p>	<p>10 µg/L Pb (NEAU)</p>		
			<p>40 µg/L Ni (TOUR)</p>	<p>10 µg/L Pb (TOUR)</p>		

Chapitre	Objectif	Population	Conditions d'exposition	Durée des phases (exposition et dépuración)	Paramètres suivis
<p>V.1</p>	<p>Capacité de bioaccumulation des métaux chez des gammarés issus de milieux contaminés</p>	<p>ARDI (<i>G. fossarum</i>)</p> <p>BIE (<i>G. pulex</i>)</p> <p>GAL (<i>G. pulex</i>)</p> <p>GUE (témoin) (<i>G. fossarum</i>)</p>	<p>0.5 µg/L Cd (ARDI) 10 µg/L Pb (ARDI)</p> <p>0.5 µg/L Cd (BIE) 10 µg/L Pb (BIE)</p> <p>0.5 µg/L Cd (GAL) 10 µg/L Pb (GAL)</p> <p>0.5 µg/L Cd (GUE) 10 µg/L Pb (GUE)</p> <p>40 µg/L Ni (ARDI) 40 µg/L Ni (BIE) 40 µg/L Ni (GAL) 40 µg/L Ni (GUE)</p>	<p>7 jours et 7 jours</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Bioaccumulation • mortalité

Chapitre V.2	Objectif	Population	Conditions d'exposition	Durée des phases (exposition et dépuratation)	Paramètres suivis
	Capacité de bioaccumulation des métaux chez des gammares naïfs acclimatés à long terme en laboratoire	GUE (<i>G. fossarum</i>)	<p>0.25 µg/L Cd Condition : « Pré-exposée au Cd »</p> <p>5 µg/L Pb Condition : « Pré-exposée au Pb »</p> <p>0.5 µg/L Cd « Non pré-exposée »</p> <p>10 µg/L Pb « Non pré-exposée »</p> <p>0.5 µg/L Cd « Pré-exposée au Cd »</p> <p>10 µg/L Pb « Pré-exposée au Cd »</p> <p>0.5 µg/L Cd « Pré-exposée au Pb »</p> <p>10 µg/L Pb « Pré-exposée au Pb »</p> <p>40 µg/L Ni « Non pré-exposée »</p> <p>40 µg/L Ni « Pré-exposée au Cd »</p> <p>40 µg/L Ni « Pré-exposée au Pb »</p>	<p>Acclimatation au laboratoire au Cd ou au Pb pendant 10 semaines</p> <p>Cinétique : 6 jours + 7 jours</p>	<ul style="list-style-type: none"> • Bioaccumulation • mortalité

2.2. Choix des populations de gammares

La population de gammares – utilisée pour calibrer le modèle cinétique de bioaccumulation du Pb (population appelée DOUE, cf. Tableau II-II) et pour étudier l'influence des cations majeurs de l'eau sur la bioaccumulation dans le chapitre III.1 – est une population suivie depuis plusieurs années par l'équipe d'écotoxicologie d'Antony et est considérée comme non-contaminée. Cette population vit dans un ruisseau (Ru de l'Étang) situé dans une zone rurale (Doue, 77, France) à 2 km de sa source.

Pour répondre aux objectifs définis dans les chapitres IV et V.1 (cf. Tableau II-II), plusieurs populations de gammares ont été sélectionnées selon leur « statut de contamination » : non contaminé (population de référence) ou au contraire, contaminé (population pré-exposée). L'évaluation du statut de contamination des populations s'est basée sur une méthode développée par Irstea Lyon et décrite dans les travaux de Besse et al. (2013). Ces travaux, basés sur la transplantation *in situ* de *G. fossarum*, issus d'une population de référence, ont permis de déterminer des « valeurs seuils de contamination biodisponible » (BBAC). Une BBAC peut être définie comme toute valeur de concentration au-dessus de laquelle une concentration mesurée dans le gammare exposé (transplanté selon la méthode développée) peut être interprétée comme une contamination biodisponible dans le milieu, et en dessous de laquelle la contamination du milieu correspond au niveau bas national et sera interprétée comme une absence de contamination biodisponible.

Ainsi, dans ce travail de thèse, les concentrations en métaux mesurées dans *G. fossarum*, transplantés sur les sites d'intérêt, ont été comparées aux « valeurs seuils de contamination biodisponible ». Les valeurs seuils, établies pour chacun des métaux étudiés dans ce travail de thèse, sont présentées dans le Tableau II-III.

Tableau II-III : Valeurs seuils de contamination disponible pour les 4 métaux étudiés dans ce travail de thèse (d'après Besse et al., 2013).

Métal	Valeur seuil (µg/g)
Cd	0.3
Pb	0.4
Ni	0.7
Cu	73.9

2.2.1. Populations de référence (chapitre IV)

Pour réaliser l'étude présentée dans le chapitre IV, 5 populations provenant de sites non contaminés en France - appelées « populations de référence » - ont été sélectionnées (Figure II-3). Parmi elles, 3 sont situées dans le bassin de la Seine (populations notées GUE, MENE et NEAU par la suite) et 2 dans le bassin du Rhône (populations notées BACU et TOUR). MENE et NEAU ont été identifiées comme étant des *G. pulex* tandis que BACU, GUE et TOUR sont des *G. fossarum*.

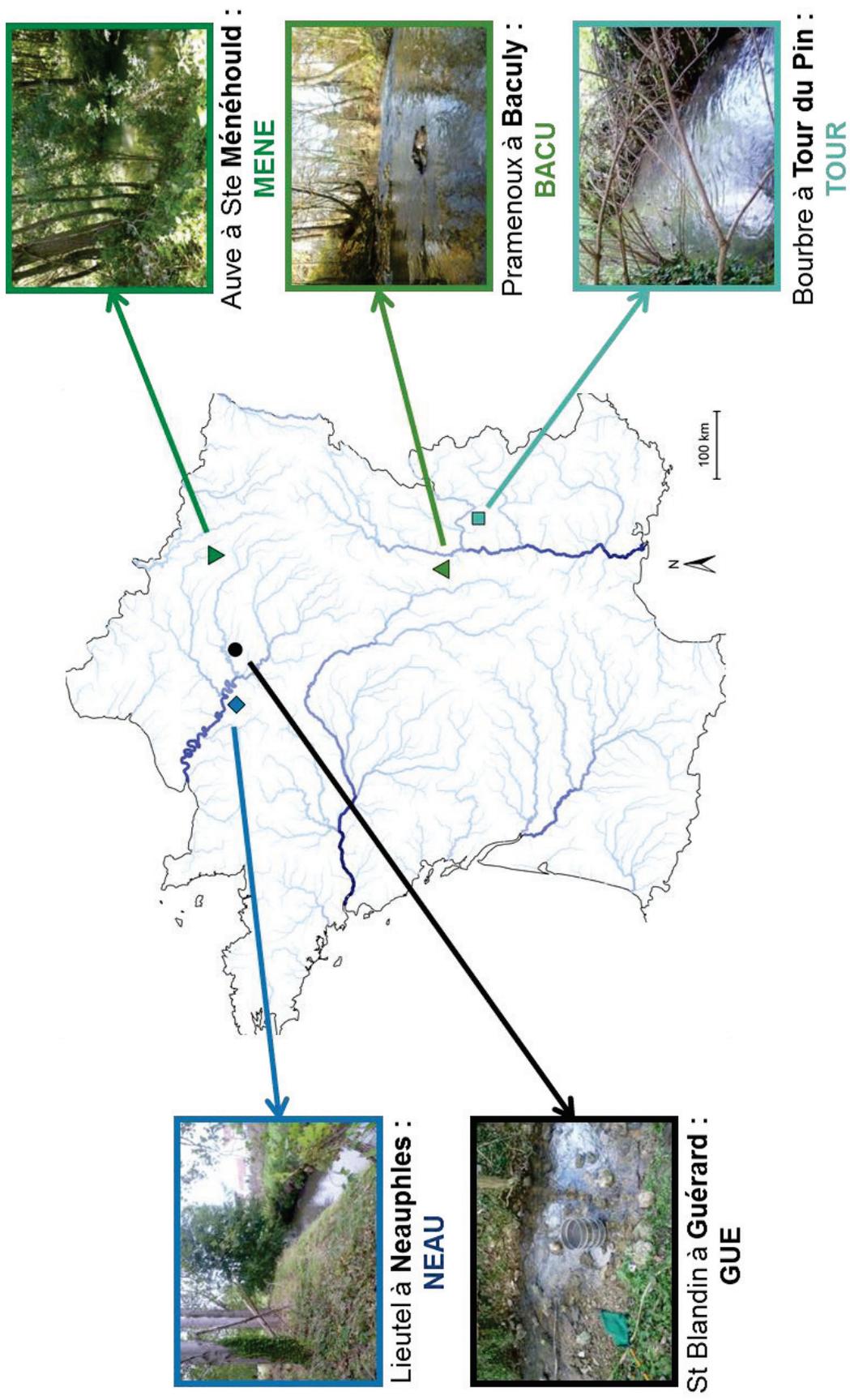


Figure II-3 : Cours d'eau, localisation et dénomination des 5 populations de référence sélectionnées pour l'étude présentée dans le chapitre IV.

2.2.2. Populations pré-exposées (chapitre V)

Pour réaliser l'étude présentée dans le chapitre V.1, 3 populations provenant de sites soumis à une contamination métallique chronique – appelées « populations pré-exposées » – ont été sélectionnées en France (Figure II-4). Parmi elles, 2 sont situées dans le bassin de la Seine (BIE et GAL) et 1 dans le bassin du Rhône (ARDI). BIE et GAL ont été identifiées comme étant des *G. pulex* et sont deux populations caractérisées par une exposition à une contamination en Pb et en Ni. ARDI est une population de *G. fossarum* caractérisée par une contamination en Cd, et dans une moindre mesure, de Pb.

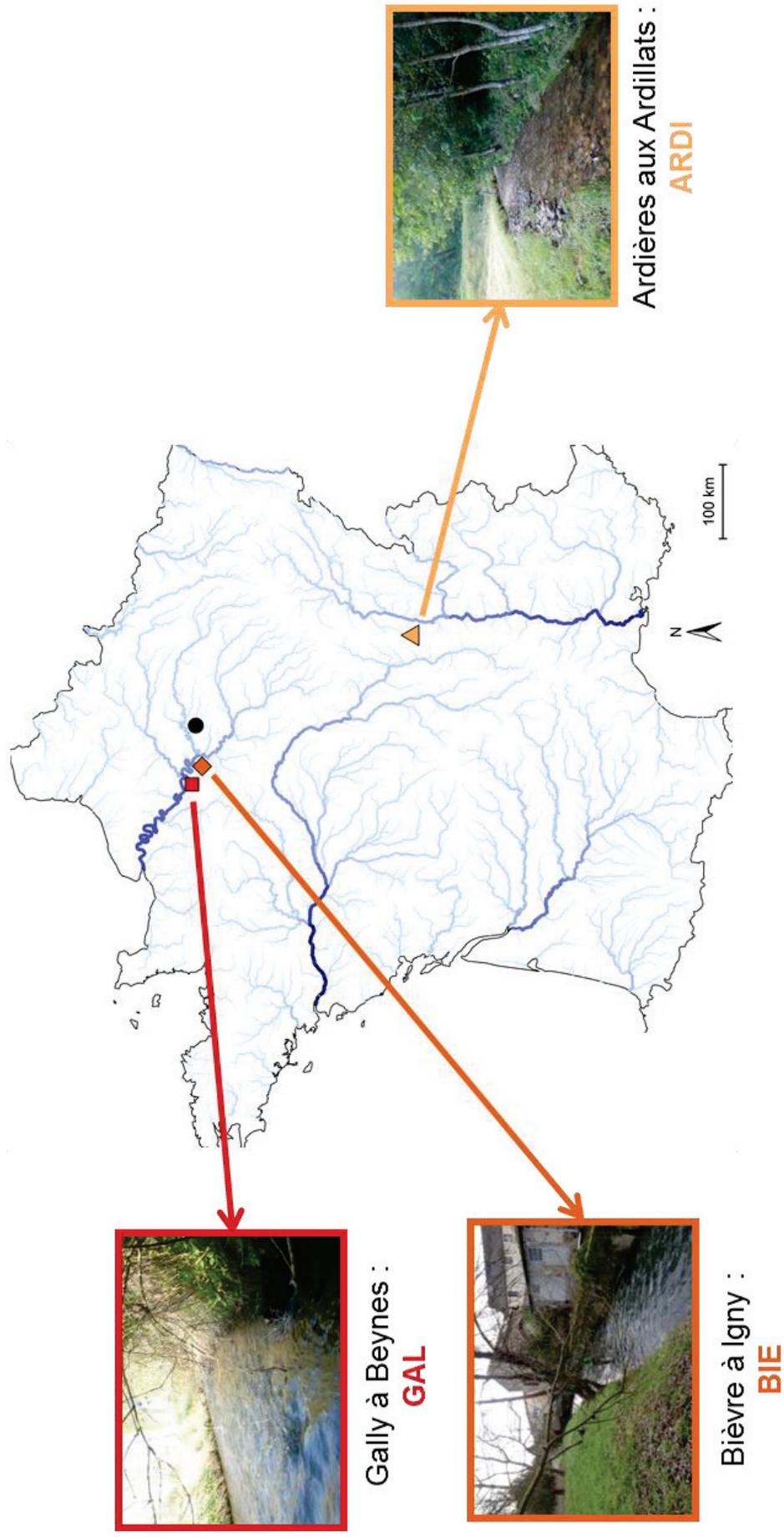


Figure II-4 : Cours d'eau, localisation et dénomination des 3 populations pré-exposées sélectionnées pour l'étude présentée dans le chapitre V.1. La population GUE a été utilisée comme population « témoin » non contaminée (cf. Figure II-3)

2.3. Pêche des individus

2.3.1. *Tri des gammares et transport au laboratoire*

Les gammares sont prélevés à l'aide d'une époussette en grattant le fond de la rivière et sous les pierres environnantes (Figure II-5 A et B). Ensuite, les gammares ainsi pêchés sont calibrés à l'aide d'une série de tamis (maille de 2 et de 2.5 mm) permettant de ne retenir que les individus adultes, c'est-à-dire d'environ 1 cm (Figure II-5 C, D et E). Puis, les gammares adultes sont comptés et conservés dans des bouteilles en plastique de 5 litres, contenant de l'eau du site et des feuilles prélevées dans le lit de la rivière. Enfin, les bouteilles sont placées dans une glacière, afin de maintenir l'eau à une température proche de celle du milieu, lors du transport jusqu'au laboratoire (Figure II-5 F).



A : Pêche à l'épuisette.



B : Gammarid sous une pierre retournée.



C : Tri des gammarid à l'aide d'une série de tamis.



D : Série de tamis et épuisette.



E : Gammarid sur les mailles du tamis.



F : Transport des gammarid dans une glacière.

Figure II-5 : Exemple d'une pêche de gammarid (ici la population DOUE).

2.3.2. Acclimatation des gammares aux conditions de laboratoire

Une fois au laboratoire, les gammares sont maintenues pendant 5 jours dans des aquariums en plastique de 5 litres (environ 500 individus par aquarium) dans une armoire thermostatée à 14°C, sous aération (pompe à air et bulleur pour aquarium) et avec une photopériode de 10 h de jour et 14 h de nuit. Pendant cette période, les gammares sont progressivement acclimatés aux conditions physicochimiques du milieu dans lequel ils seront exposés ultérieurement, en remplaçant progressivement l'eau de leur site d'origine par de la Volvic® (1/3 du bac tous les 2 jours puis 100 % de Volvic après 5 jours). Une eau faiblement minéralisée (Volvic®) a été choisie, afin de limiter le risque de précipitation des métaux lors des expositions, et ainsi favoriser la biodisponibilité de ces derniers. Parallèlement, les gammares sont nourris *ad libitum* avec des feuilles de charmes, *Carpinus caroliniana*, cueillies directement sur les branches des arbres d'un site de référence (GUE, cf. Figure II-3) et préalablement conditionnées dans de l'eau Volvic®. Enfin, des supports grillagés en plastique sont introduits dans les aquariums afin de servir de lieu de fixation pour les gammares durant les phases de repos (Figure II-6).

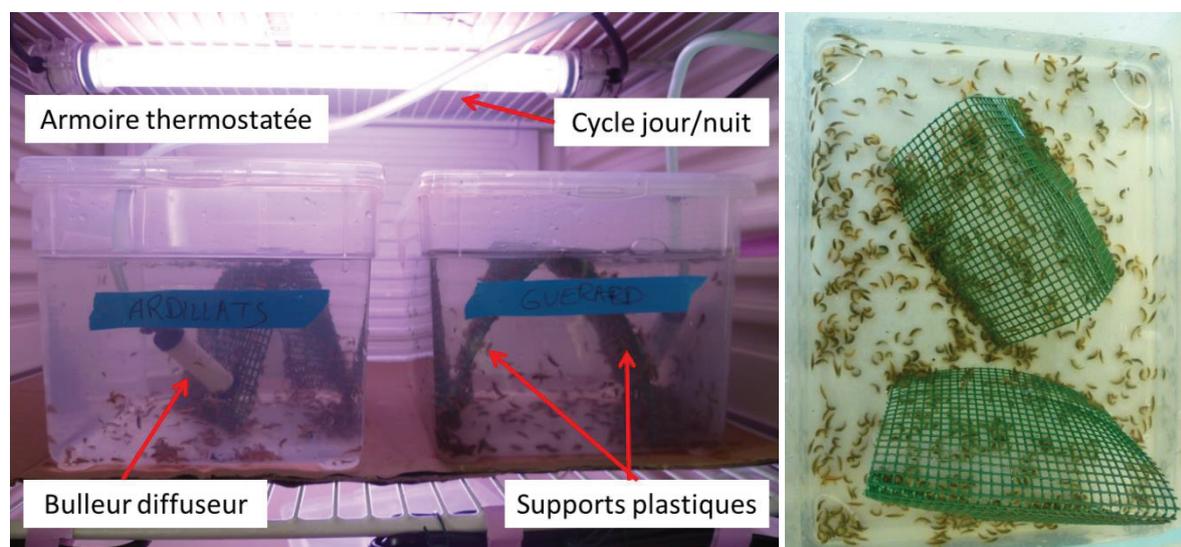


Figure II-6 : Bacs contenant les gammares pendant l'acclimatation et bac vu du dessus.

2.4. Cinétiques de bioaccumulation

2.4.1. Principe

La réalisation des cinétiques de bioaccumulation consiste à exposer pendant plusieurs jours des organismes à une concentration constante de métal, en triplicat, puis de les placer immédiatement dans un milieu non contaminé pour une phase de dépuración. Dans ce travail de thèse, seule la bioaccumulation par voie dissoute a été étudiée, les organismes ne sont donc pas nourris durant l'exposition. La nourriture n'est réintroduite que lors de la dépuración, afin de limiter la mortalité et le cannibalisme entre les individus.

Pendant les phases d'accumulation et la dépuración, des organismes sont prélevés à pas de temps régulier puis leurs teneurs en métaux sont analysées. Par ajustement du modèle cinétique (cf. Figure I-8) aux données de bioaccumulation obtenues, il est possible de déterminer les constantes d'accumulation et d'élimination pour chaque couple métal/population étudié (k_{in} et k_{out}). Enfin, il est important de noter que l'estimation des paramètres du modèle cinétique de bioaccumulation des métaux est réalisée sur des données de bioaccumulation nette, i.e. sur les concentrations de métal nouvellement accumulées par les organismes. Pour cela la concentration de métal mesurée avant le début de l'expérience (à $t = 0$) est retirée aux concentrations totales mesurées dans les organismes tout au long de la cinétique. De manière générale, pour le Cd, le Ni et le Pb, ces concentrations sont très souvent négligeables, voire inférieures à la limite de quantification (LoQ). Pour le Cu, qui est un métal essentiel, la concentration basale est particulièrement élevée, puisqu'elle participe aux fonctions vitales des organismes.

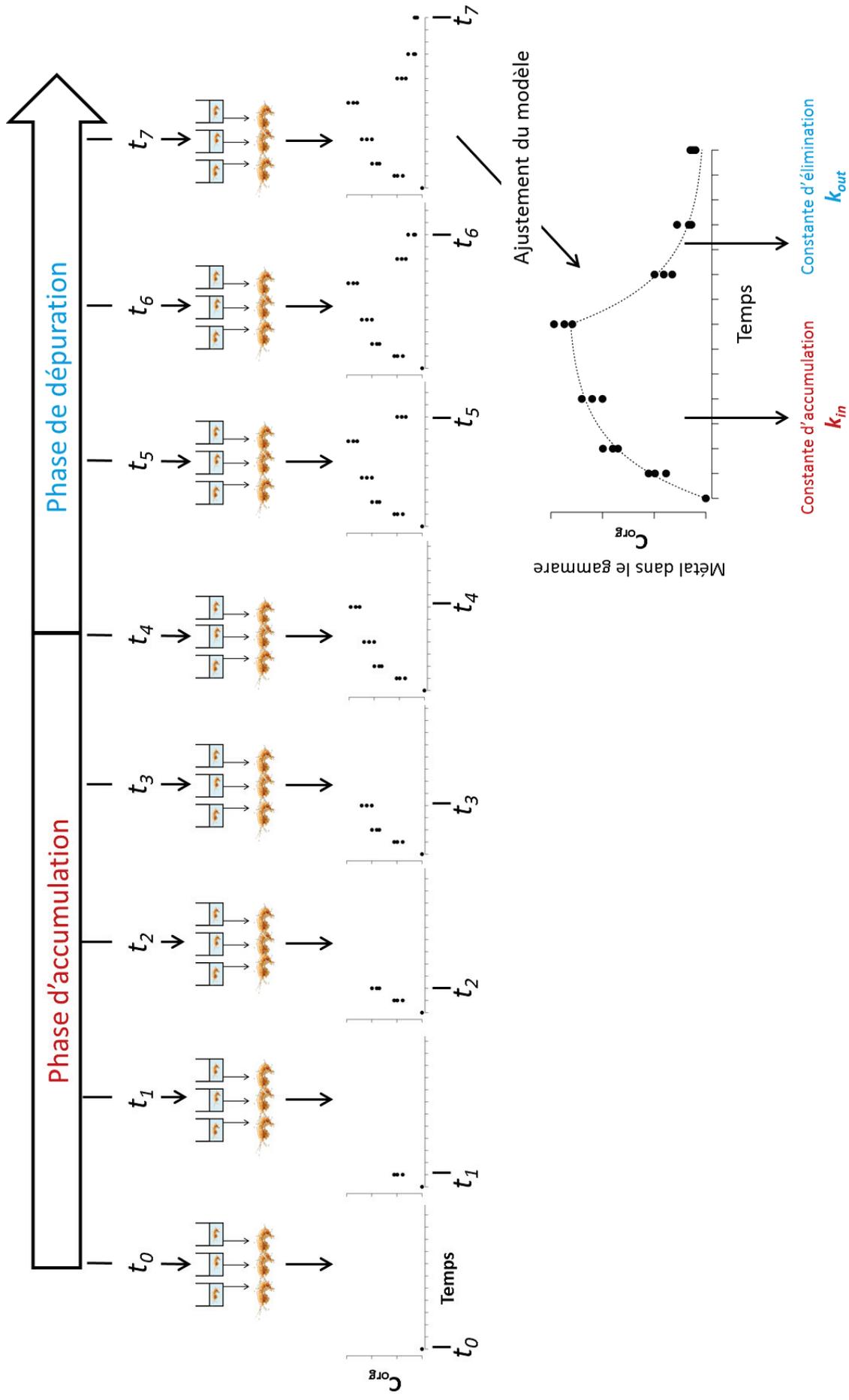


Figure II-7 : Schéma conceptuel du principe d'estimation des paramètres du modèle cinétique de bioaccumulation des métaux.

2.4.2. Avant l'exposition

(i) Préparation des solutions métalliques

Les solutions métalliques ont été réalisées à partir des sels métalliques suivants : $\text{Cd}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, $\text{NiSO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ et $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$. Ces sels ont été choisis afin que l'ion non métallique, une fois dissocié du métal en solution soit relativement inerte vis-à-vis du milieu d'exposition. Des solutions mères métalliques ont tout d'abord été préparées dans de l'eau ultra pure (résistivité 18.3 M Ω .cm, PURELAB UHQ ELGA) afin de favoriser la dissociation des sels. Puis, la préparation finale des solutions pour les expositions a été réalisée en enrichissant extemporanément, à partir des solutions mères, l'eau Volvic dans les microcosmes dans lesquels les gammars ont été exposés ; ou bien en enrichissant l'eau contenue dans des bouteilles de Volvic de 8 litres quelques heures auparavant et en la distribuant ensuite dans les différents microcosmes¹¹.

(ii) Préparation du matériel

Afin de travailler dans les conditions les plus propres possibles, tout le matériel utilisé est en plastique (polypropylène, PP) et a été préalablement rincé avec une solution d'acide à 10 % (HNO_3 >67 %, suprapur Sigma-Aldrich), puis rincé abondamment avec de l'eau ultra pure avant chaque expérience. Pour éviter les contaminations croisées, un jeu unique de matériel est attribué à chaque métal et ce durant toute la durée du travail de thèse.

Pendant les cinétiques de bioaccumulation, les gammars sont exposés aux métaux dans des microcosmes composés de béchers de 500 ml. Les béchers sont équilibrés avec la solution métallique finale 24 h avant l'exposition afin de permettre l'échange du métal entre la solution et les parois du bécher, lesquels peuvent comporter des sites de liaison pour le métal (Figure II-8 A). Cette étape favorise une exposition constante pendant la phase d'accumulation. Toutes les conditions d'exposition présentées dans le Tableau II-II sont réalisées en triplicat (à 14°C avec une photopériode de 10 h de jour et 14 h de nuit) (Figure II-8 B). Pour chaque métal et chaque population, un contrôle est également réalisé en triplicat, c'est-à-dire que les gammars sont placés dans de la Volvic® non-contaminée.

¹¹ Le dopage des bouteilles de 8 l de Volvic a été réalisé pour les études présentées dans les chapitre V.



A



B

Figure II-8 : (A) Équilibre entre les béchers et les différentes solutions métalliques 24 h avant l'exposition des gammars. (B) Gammars exposés dans des microcosmes, dans une armoire thermostatée à 14°C et avec une photopériode (ici étude du chapitre IV)

(iii) Jeûne des organismes

Afin de mesurer uniquement les concentrations métalliques dans les tissus des organismes, l'apport de nourriture est stoppé 48 h avant le début de l'exposition pour permettre une vidange du contenu intestinal.

(iv) Choix des concentrations d'exposition du Pb et des cations majeurs de l'eau : chapitre III

Le choix des concentrations d'exposition pour l'étude de la bioaccumulation du Pb par voie dissoute chez *G. pulex* et l'estimation des paramètres du modèle cinétique (k_{in} et k_{out}) a été motivé par le souhait de couvrir une large gamme de concentrations comprenant notamment des concentrations pertinentes d'un point de vue environnemental. Pour ce faire, le choix s'est basé sur la norme de qualité environnementale du Pb en vigueur à la date de la réalisation des cinétiques (i.e. NQE = 7.2 µg/L Pb, (DCE, 2008/105/EC)). Ainsi une gamme allant de NQE/10 à NQE*10 a été réalisée (cf. Tableau II-II)¹². Une large gamme était également nécessaire afin d'évaluer l'indépendance des constantes cinétique du modèle vis-à-vis de la concentration d'exposition

Dans une seconde partie, l'influence du Ca²⁺, Mg²⁺ et Na⁺ sur la bioaccumulation du Pb a été étudiée. Pour cela, des gammarses ont été exposés durant 2 jours à 10 µg/L de Pb pour différentes concentrations en cations (cf. Tableau II-II). Le choix de la concentration de Pb devait répondre à deux critères : (i) observer une accumulation significative à 2 jours d'exposition (phase durant laquelle la contribution de l'élimination est négligeable) et (ii) ne pas provoquer de mortalité. Le choix de la gamme de concentrations en cation visait à couvrir une gamme de concentrations observées dans les milieux aquatiques en France.

(v) Choix des concentrations d'exposition du Cd, du Cu, du Ni et du Pb : chapitres IV et V

Les études présentées dans les chapitres IV et V avaient pour but de déterminer les paramètres (k_{in} et k_{out}) du modèles cinétique pour le Cd, le Cu, le Ni et le Pb par voie dissoute pour 5 populations de référence dans le premier cas (chapitre IV) et 3 populations pré-exposées à une contamination multi-métallique dans le second (chapitre V.1). Les concentrations d'exposition sont renseignées dans le Tableau II-II. Elles se voulaient proches, sinon au maximum deux fois supérieures à la NQE (pour le Cd, le Ni et le Pb) ou à la PNEC (pour le Cu)¹³.

¹² La concentration 0.5 n'a pas été introduite dans la publication 1 en raison d'une trop grande variabilité entre les triplicats et l'incapacité à déterminer des paramètres cinétiques fiables.

¹³ NQE avant 2013 : Cd, 0.25 µg/L (classe 5), Pb, 7.2 µg/L et Ni, 20 µg/L (Directive 2008/105/EC) et PNEC : Cu, 1.6 µg/L (Bisson et al., 2005).

2.4.3. Phase d'accumulation

La phase d'accumulation consiste à exposer 50 gammares par béccher (sans nourriture) à une concentration constante de métal (détail des conditions d'exposition présenté dans le Tableau II-II) pendant une semaine¹⁴. Aux jours 0, 1, 2, 5 et 7¹⁵, 5 individus sont prélevés par béccher (Figure II-9 A et B) et sont rincés, afin de retirer le métal adsorbé sur leur cuticule et de ne quantifier par la suite que ce qui a été internalisé (Figure II-9 C et D). Le rinçage consiste à placer successivement les gammares prélevés dans 2 bains d'une solution d'EDTA¹⁶ (2 mM puis à 0,5 mM) d'une minute chacun, suivi de 2 bains d'une minute dans de l'eau ultra pure. Enfin les gammares sont séchés sur du papier absorbant (Figure II-9 E), puis conservés à -20°C dans des digitubes en polypropylène de 50 ml.

¹⁴ Ce temps d'exposition peut varier d'une étude à une autre, voir le détail dans le Tableau II-II.

¹⁵ La fréquence des prélèvements peut varier d'une étude à une autre et d'un métal à l'autre.

¹⁶ EDTA : acide éthylène diamine tétra acétique



A : Prélèvement des gammarex dans les microcosmes (bêchers).



B : Les gammarex sont placés dans une passoire pour le rinçage.



C : Bains successifs à l'EDTA puis d'eau ultra pure.



D : Séchage des gammarex sur du papier absorbant.

Figure II-9 : Étapes successives de prélèvement des gammarex lors des cinétiques de bioaccumulation.

À chaque pas de temps, le milieu d'exposition du microcosme est renouvelé afin d'assurer une exposition constante et d'oxygéner le milieu (Figure II-10). Pour ce faire, les gammares non prélevés sont stockés dans un filet en nylon, puis le béccher est vidé et de nouveau rempli avec la nouvelle solution métallique. Dans chaque béccher, de l'eau est prélevée et acidifiée à 1 % v/v (volume/volume, $\text{HNO}_3 > 67\%$, suprapur Sigma-Aldrich) pour l'analyse ultérieure des concentrations métalliques. Enfin, les gammares sont comptés (i.e. suivi de la mortalité), réintroduits dans leur béccher d'origine et replacés dans l'armoire thermostatée.



A : Vidange du microcosme et récupération des gammares dans un filet.



B : Renouvellement de la solution d'exposition du microcosme.



C : Prélèvement de la solution d'exposition pour mesure des métaux.



D : Comptage et réintroduction des gammares dans le microcosme d'origine.

Figure II-10 : Les différentes étapes du renouvellement des milieux d'exposition.

2.4.4. Phase de dépuraton

La phase d'accumulation a été immédiatement suivie d'une phase de dépuraton durant laquelle les gammares sont placés dans des microcosmes contenant de la Volvic® non contaminée et pour laquelle la nourriture est réintroduite (feuilles de charme ayant également servies à nourrir les gammares durant l'acclimatation). Aux jours 8, 9, 11 et 14¹⁷, 5 gammares ont été prélevés par béccher et traités comme décrit pour la phase d'accumulation (II.2.4.3). A chaque pas de temps, l'eau a été renouvelée afin d'assurer une oxygénation correcte du milieu. La mortalité a été suivie.

¹⁷ La fréquence de prélèvement peut varier d'une étude à une autre et d'un métal à l'autre.

2.5. Exposition long terme de gammare naïfs au Cd ou au Pb en laboratoire, puis suivi des cinétiques de bioaccumulation (chapitre V.2)

Le plan expérimental de cette expérience, réalisée entre mars et juin 2014, comportait 2 étapes : (i) exposition long terme de gammare naïfs à une faible concentration de Cd ou bien de Pb, puis (ii) réalisation de cinétiques d'accumulation et de dépuraction pour le Cd, le Ni, le Pb chez ces organismes pré-exposés, afin d'estimer les paramètres k_{in} et k_{out} du modèle cinétique.

2.5.1. Acclimatation long terme des gammare naïfs au Cd ou au Pb en laboratoire

Des gammare naïfs provenant de la population de référence GUE ont été prélevés *in situ* selon le protocole décrit dans la partie II.2.3, et acclimaté au laboratoire à la Volvic®. Puis, toujours au laboratoire, les individus ont été répartis dans trois mésocosmes de 8 l, chacun correspondant à une condition d'acclimatation long terme au Cd ou bien au Pb (du 31 mars au 28 mai 2014, i.e. 10 semaines) :

(i) la condition qui consiste à ne pas acclimater les gammare naïfs aux métaux et qui constitue la population « **témoin** »,

(ii) la condition qui consiste à acclimater les gammare naïfs à une concentration de Cd à 0.25 µg/L, afin d'obtenir des organismes qui seront nommés « **pré-exposés au Cd** »,

(iii) et la condition qui consiste à acclimater les gammare naïfs à une concentration de Pb à 5 µg/L, afin d'obtenir des organismes « **pré-exposés au Pb** ».

Pendant les 10 semaines d'acclimatation long terme, les organismes ont été nourris avec un mélange de feuilles d'aulne (*Alnus glutinosa*), de charme (*Carpinus caroliniana*) et de peuplier (*Populus*) préalablement contaminées avec du Cd ou bien avec du Pb (et non contaminé pour les témoins). Pour se faire, les feuilles ont été plongées durant deux jours dans des béciers, contenant de la Volvic® 5 fois concentrée en Cd ou en Pb par rapport à la concentration théorique d'exposition long terme. Puis, ces feuilles enrichies en métal ont été placées pendant 4 jours dans de la Volvic® à 1 fois la concentration théorique d'exposition long terme (solution renouvelée chaque jour), afin qu'elles atteignent un équilibre avec le milieu et ne relarguent plus de métal une fois introduite dans les mésocosmes contenant les gammare.

Tous les 2 jours, le milieu de chaque mésocosme a été renouvelé d'1/3 afin d'assurer une bonne oxygénation et une exposition constante. Lors de ces renouvellements, de l'eau a été

prélevée, filtrée à 0.45 µm puis acidifiée à 1 % v/v, afin de suivre les concentrations en métal dissous.

Tous les 15 jours, les mésocomes ont été renouvelés intégralement et un nouveau mélange de feuilles contaminées a été introduit dans le milieu d'exposition. Les gammares ont été également supplémentés en spiruline et en chironome séchés (Tubifex). Parallèlement, quatre réplicats de 5 gammares ont été prélevés pour chaque condition d'acclimatation long terme et traités comme décrit dans la partie II.2.4.3, afin de suivre les teneurs métalliques accumulées par les gammares dans le temps. La mortalité a été également suivie.

À la fin de l'exposition long terme, les organismes pré-exposés ont été placés durant 5 jours dans des bacs contenant de la Volvic® non contaminée pour qu'ils retrouvent une concentration métallique basale. Les gammares n'ont également plus été nourris 24 h avant le début de la cinétique décrite dans la partie suivante II.2.5.2.

2.5.2. Cinétiques de bioaccumulation en microcosmes

Les gammares « **témoins** », « **pré-exposés au Cd** » et « **pré-exposés au Pb** » ont été introduits dans des microcosmes (bêchers) et exposés pendant 6 jours, à 0.5 µg/L de Cd, 10 µg/L de Pb ou bien à 40 µg/L de Ni (cf. Tableau II-II). Cette phase d'accumulation a été immédiatement suivie d'une phase de 7 jours de dépuración durant laquelle les gammares n'ont plus été exposés aux métaux et où la nourriture a été réintroduite. Parallèlement, des gammares ont été placés dans des bêchers contenant de l'eau Volvic® non contaminée afin de constituer les « contrôles » de cette expérience. À pas de temps régulier, des gammares ont été prélevés et traités comme précédemment décrit dans la partie II.2.4.

3. Expérimentations *in situ* : Procédure de transplantation (encagement)

3.1. Principe

En vue de la validation *in situ* des modèles de bioaccumulation développés au laboratoire, des données de bioaccumulation ont été acquises sur le terrain, puis comparées à la bioaccumulation prédite par le modèle cinétique, à partir de la concentration en métal dissous du milieu (C_w) et des paramètres k_{in} et k_{out} estimés au laboratoire. Ainsi, des données de bioaccumulation ont été obtenues sur 141 sites en France, à partir du protocole de transplantation de gammares développée par l'équipe d'Irstea Lyon (Geffard et al., 2014) et décrite par Besse et al. (2013). Les différentes étapes de cette approche sont décrites ci-dessous.

3.2. Prélèvement de gammares issus d'une population de référence pour la transplantation

Des individus adultes, mâles, du genre *G. fossarum* ont été prélevés dans un cours d'eau (La Tour du Pin, en amont de la rivière de la Bourbre, bassin du Rhône) qui présente une bonne qualité de l'eau, selon les données du réseau de contrôle de surveillance national (RCS)¹⁸. Ce site présente également une forte densité de gammares. Ainsi, les gammares prélevés sont ensuite transportés au laboratoire puis acclimatés comme décrit dans la partie II.2.3.

3.3. Transplantation *in situ*

L'exposition *in situ* des gammares a été réalisée à l'aide de systèmes composés d'un cylindre (en PP, de longueur 10 cm et de diamètre 5.5 cm) fermés en ses extrémités par un filet de maille 1 mm, pour permettre l'écoulement de l'eau (Figure II-11 A). Les gammares sont introduits dans les systèmes (à hauteur de 20 individus par système) eux-mêmes placés, pour leur protection, dans une caisse (Figure II-11 B) ou dans un seau (Figure II-11 C) en plastique ajouré puis immergés dans le cours d'eau d'intérêt. Le choix entre la caisse ou le seau se fait en fonction de la typologie et de l'envasement du cours d'eau sur lequel est réalisée la transplantation. Les caisses sont de préférence utilisées pour des cours d'eau peu profonds (inférieurs à 50 cm) avec peu de sédiments et sont placées parallèlement au courant, puis maintenues avec des pierres (Figure II-11 D). Les seaux sont en revanche utilisés pour des cours d'eau plus profonds ou bien plus sédimenteux (risque d'envasement et de mort des organismes par asphyxie), et sont lestés afin d'éviter leur dérive et qu'ils ne

¹⁸ <http://sierm.eaurmc.fr/eaux-superficielles/index.php>, consulté en juin 2013.

soient partiellement émergés. Les seaux contenant le système à gammares sont placés au milieu de la colonne d'eau, généralement suspendus à une branche ou à un élément de construction (pont, lavoir, etc.) (Figure II-11 E). Les gammares sont exposés pendant 7 jours, durant lesquels ils sont nourris *ad libitum* avec des feuilles d'aulne (*Alnus glutinosa*). Ensuite, ils sont récupérés, séchés et introduits dans des tubes Digiprep (n = 3, de 5 individus si possible), puis transportés dans une glacière au laboratoire pour être conservés à -20°C. Dans le cas de longs trajets, les échantillons récupérés sur le terrain sont conservés dans de la carboglace, puis placés à -20°C une fois de retour au laboratoire (Figure II-11 F).



A : Éléments constituant le système destiné à recevoir les gammars (photo : J.P. Besse).



B : Caisse contenant des systèmes à gammars.



C : Seau lesté et ajouré contenant des systèmes à gammars.



E : Seau immergé.



D : Caisse recouverte de pierres.



F : Echantillons dans de la carboglace.

Figure II-11 : Les différentes étapes de la transplantation de gammars in situ.

3.4. Prélèvement dans le milieu

Afin de quantifier les concentrations de métal dissous sur chacun des sites étudiés, de l'eau a été prélevée en début et en fin de période de transplantation, filtrée à travers 0.45 μm et acidifiée à 1 % v/v (HNO_3 , TraceSELECT \geq 69 % Sigma-Aldrich) sur le terrain. Un blanc acide a également été réalisé afin de s'assurer de l'absence de contamination par inadvertance.

Des échantillons d'eau filtrée (0.45 μm), mais non acidifiée, ont également été prélevés pour une analyse en cations majeurs de l'eau.

Enfin, les paramètres physiques, tels que la température (sonde placée dans la caisse ou le seau contenant les gammars), le pH et la conductivité, ont été mesurés.

4. Analyses chimiques

4.1. Traitement des échantillons de gammares

Les échantillons de gammares collectés après transplantation, et conservés à -20°C en attendant l'analyse en métaux, ont été cryogénisés dans de l'azote liquide (environ -190°C) pour pouvoir être ensuite lyophilisés pendant 24 h (obtention de la masse sèche). Les lyophilisats ont ensuite subi une digestion acide par ajout de HNO_3 (TraceSELECT $\geq 69\%$ Sigma-Aldrich) puis de H_2O_2 (TraceSelect $\geq 30\%$ Sigma-Aldrich) (protocole détaillé en Annexe). Cette étape vise à digérer la matière organique et à ne laisser que les composés inorganiques (métaux). Afin de valider la conformité de l'étape de digestion acide, un matériau de référence a également été traité (CMR: Mussel Tissue ERM-CE278k, fiche conformité disponible en Annexe).

4.2. Physicochimie des milieux

L'analyse des anions et des cations a été réalisée par chromatographie ionique (Dionex DX120) utilisant une colonne analytique échangeuse d'ion de type IonPac CS16 Dionex N° 057573 (4X250 mm). Les analyses ont été réalisées par la plateforme chimie du centre Irstea Antony.

La chromatographie ionique permet de séparer et d'analyser quantitativement en solution aqueuse des anions ou des cations, en utilisant une phase mobile liquide. Elle repose d'une part sur les mécanismes d'échanges d'ions entre une résine et une solution (pour séparer les différents ions de la solution) et d'autre part sur la mesure de la conductivité de la solution (pour détecter et quantifier les ions présents). La séparation est fondée sur la différence de distribution des espèces entre deux phases, l'une stationnaire (résine échangeuse d'ions), l'autre mobile (phase liquide). Les ions ont des affinités différentes pour chacune des deux phases. Il en résulte des différences entre les vitesses de migration des ions, d'où la possibilité de les séparer. Cette affinité est liée, entre autres, à la charge et à la taille des ions.

4.3. Analyse des métaux

4.3.1. Analyse des échantillons acquis lors des cinétiques de bioaccumulation

(i) Métaux dans les milieux d'exposition au laboratoire

L'analyse des concentrations métalliques dans les milieux d'exposition des études présentées aux chapitres III.1, IV et V.1 a été réalisée par spectrométrie à absorption atomique à four graphite (GF-AAS, SpectrAA 220Z, Varian). La conformité de l'analyse a été vérifiée par le dosage de deux eaux certifiées comme matériel de référence : SPS-SW1, Spectrapure standard AS Oslo et EP-L-2CR, EnviroMAT.

La spectrométrie à absorption atomique permet de mesurer des concentrations monométalliques. Son principe consiste à vaporiser, calciner et atomiser l'échantillon liquide en le chauffant (à l'aide du four). Ensuite l'absorbance émise est mesurée à l'aide d'une lampe à cathode creuse de longueur d'onde spécifique à l'élément à doser.

La limite de détection du GF-AAS à four graphite est de l'ordre du ppb (ou µg/L).

L'analyse des concentrations métalliques des milieux d'exposition de l'étude présentée chapitre V.2 a été réalisée par spectrométrie de masse par induction à torche plasma (ICP-MS). Les échantillons ont été analysés au Laboratoire des sciences du climat et de l'environnement (LSCE, Gif-sur-Yvette, ICP-MS, X series 2, Thermo Fisher Scientific). La conformité de l'analyse a été vérifiée par trois eaux de référence : SPS-SW1, EP-L-2CR et NIST 1640.

Cette méthode permet une analyse multi-métallique des échantillons. Son principe repose sur le couplage d'une torche à plasma générant des ions et d'un spectromètre de masse quadripolaire qui sépare ces ions en masse. La détection s'effectue grâce à un multiplicateur d'électrons à dynodes discrètes, sur lequel les ions vont venir se heurter. Le signal se traduit en nombre d'impulsions (nombre de coups), une interface informatique assure le transfert des données afin qu'elles soient traitées.

Dans le cas du Ni, les analyses sont effectuées par ICP-MS-CCT (chambre à collision) en raison d'interférences spectroscopiques polyatomiques entre le métal et les cations présents dans l'eau à analyser.

(ii) Métaux dans les gammars

Les concentrations métalliques des minéralisats de gammars obtenus dans les études présentées aux chapitres III.1, IV et V.1 ont été mesurées par GF-AAS à four graphite pour le Pb, le Cd et le Ni. Les concentrations de Cu, plus élevées ont été mesurées par spectrométrie d'absorption atomique à flamme (SpectrAA, 220 FS, Varian) dont la limite de détection est de l'ordre du ppm (ou mg/L).

Dans le cas du Pb, les analyses ont été effectuées par ajouts dosés en raison de fortes interférences de la matrice. Par cette méthode, un nouvel étalonnage est réalisé après chaque triplicat d'échantillon ce qui augmente considérablement le temps d'analyse mais permet une quantification fiable des métaux.

La conformité de l'analyse a été vérifiée par les deux eaux de référence (SPS-SW1 et EP-L-2CR) et celle de la digestion acide a été vérifiée en dosant le matériau de référence (ERM-CE278k). Le calcul de la pente de la droite d'étalonnage (appelé repentage) est réitérée tous les 20 échantillons et un réétalonnage est effectué tous les 50 échantillons.

Les concentrations métalliques des minéralisats de gammars obtenus dans de l'étude présentée dans le chapitre V.2 ont été mesurées par ICP-MS (LSCE, Gif-sur-Yvette). La conformité de l'analyse est vérifiée par les trois eaux de référence (SPS-SW1, EP-L-2CR et NIST 1640) et le matériau de référence (ERM-CE278).

4.3.2. Analyse des métaux dans la colonne d'eau et dans les gammars transplantés

Les concentrations métalliques dans la colonne d'eau et dans les gammars ont été mesurées par ICP-MS. Les échantillons d'eau ont été analysés au LSCE (Gif-sur-Yvette) et les échantillons de gammars ont été analysés au laboratoire de chimie d'Irstea Lyon. La conformité de l'analyse a été vérifiée par les trois eaux de référence (SPS-SW1, EP-L-2CR et NIST 1640) et le matériau de référence (ERM-CE278k).

CHAPITRE III

III. Modélisation de la bioaccumulation des métaux par voie dissoute chez le gammare : influence des facteurs physicochimiques et validation des modèles *in situ*

Partie III.1 : Modélisation de la bioaccumulation du Pb chez *Gammarus pulex* et influence des facteurs physicochimiques.

(Publication 1 : *A biodynamic model predicting waterborne lead bioaccumulation in Gammarus pulex: Influence of water chemistry and in situ validation.* Publiée dans le journal « Environmental pollution »)

Partie III.2 : Validation *in situ* des modèles cinétiques de bioaccumulation du Cd, du Cu, du Ni et du Pb : expérimentations à large échelle (France).

(Publication 2 : *Environmental relevance of laboratory-derived kinetic models to predict metal bioaccumulation in gammarids: field experimentation at the national scale (France).* Soumis au journal « Water research »)

1. Modélisation de la bioaccumulation du Pb chez *Gammarus pulex* et influence des facteurs physicochimiques.

PUBLICATION 1

A biodynamic model predicting waterborne lead bioaccumulation in *Gammarus pulex*: Influence of water chemistry and *in situ* validation.

Publiée dans le journal « Environmental pollution »

Résumé

La bioaccumulation, c'est-à-dire la mesure des concentrations en contaminants dans un organisme, permet d'intégrer les fluctuations temporelles de la contamination et peut être considérée comme le reflet de la contamination biodisponible du milieu. Toutefois, le lien entre la contamination du milieu et celle des organismes n'est pas direct, car il dépend de paramètres biotiques et abiotiques tels que les concentrations en cations majeurs de l'eau, lesquels sont susceptibles d'influencer la biodisponibilité des métaux. En laboratoire, des modèles cinétiques de bioaccumulation ont été développés afin de décrire les processus de bioaccumulation chez les organismes aquatiques et de faire le lien entre la contamination du milieu et celle des organismes. Parmi les modèles cinétiques de bioaccumulation, le modèle biodynamique considère que la bioaccumulation résulte d'une différence entre les flux entrants (par voie dissoute et trophique) et sortants de métal. Lors d'une exposition par voie dissoute, ces flux sont fonctions de paramètres cinétiques : les constantes d'accumulation et d'élimination (k_{in} et k_{out}), qui peuvent être déterminées en conditions contrôlées de laboratoire. De tels modèles ont été développés avec succès pour de nombreuses espèces d'invertébrés marines et dulçaquicoles, et certains ont également permis de prédire la bioaccumulation *in situ*. À notre connaissance, peu de modèles ont été consacrés au genre *Gammarus*, et aucun n'est actuellement disponible pour le Pb. Cette étude comprend trois objectifs ; (i) déterminer les constantes du modèle cinétique de bioaccumulation du Pb par voie dissoute chez *G. pulex*, (ii) évaluer les effets du Ca^{2+} , du Mg^{2+} ou du Na^+ sur l'accumulation du Pb, et (iii) évaluer la capacité du modèle à prédire la bioaccumulation du Pb *in situ*. Pour atteindre ces trois objectifs, des individus provenant d'un site de référence ont été exposés au laboratoire à différentes concentrations de Pb, ceci dans le but de calibrer le modèle cinétique (déterminer les constantes k_{in} et k_{out}). Puis des gammarus ont été exposés à une concentration constante de Pb, tout en faisant varier les concentrations de Ca^{2+} , Mg^{2+} ou Na^+ , afin de tester l'influence de la composition de l'eau sur la

bioaccumulation. Enfin, la validité *in situ* du modèle cinétique a été évaluée par le biais d'une comparaison entre la bioaccumulation observée chez des gammares autochtones et la bioaccumulation prédite par le modèle, en considérant comme entrées du modèle : les constantes du modèle cinétique déterminées en laboratoire et la concentration en métal dissous du milieu étudié. La comparaison a été réalisée sur 21 sites sur le bassin de la Seine.

Cette étude a tout d'abord permis de déterminer les constantes d'accumulation et d'élimination du modèle cinétique de bioaccumulation du Pb chez *G. pulex*. Au laboratoire, il a été observé qu'une augmentation croissante des teneurs calciques dans le milieu d'exposition réduisait significativement l'accumulation du Pb chez le gammare, suggérant un effet compétiteur entre le Ca^{2+} et le Pb. Cet effet a été formalisé et intégré au modèle cinétique de bioaccumulation. La validation du modèle *in situ* a montré que la prise en compte des teneurs calciques dans le milieu naturel permettait d'améliorer la prédiction de la bioaccumulation de 44 %, par rapport au modèle ne tenant pas compte de l'effet du calcium. Ces résultats montrent que la considération de la composition physicochimique du milieu est cruciale pour une interprétation fiable des données de bioaccumulation, en termes de contamination biodisponible des milieux. Finalement, les paramètres du modèle cinétique déterminés au laboratoire sont applicables en conditions environnementales, même si, toutefois, le modèle tend à sous-estimer la bioaccumulation observée *in situ*. Les explications possibles de cette sous-estimation ont été discutées.

Mots-clés:

Pb, gammare, voie dissoute, chimie de l'eau, biodisponibilité des métaux, toxico-cinétique



Contents lists available at ScienceDirect

Environmental Pollution

journal homepage: www.elsevier.com/locate/envpol

A biodynamic model predicting waterborne lead bioaccumulation in *Gammarus pulex*: Influence of water chemistry and *in situ* validation



N. Urien ^{a, b, *}, E. Uher ^a, E. Billoir ^c, O. Geffard ^d, L.C. Fechner ^{a, b, e}, J.D. Lebrun ^{a, b}

^a Irstea, UR HBAN – Ecotoxicology, 1 rue Pierre-Gilles de Gennes, CS 10030, F-92761 Antony Cedex, France

^b FIRE FR-3020, 4 place Jussieu, 75005 Paris, France

^c Université de Lorraine, CNRS UMR 7360, Laboratoire Interdisciplinaire des Environnements Continentaux (LIEC), Metz, France

^d Irstea, UR MAEP, Freshwater Systems, Ecology and Pollution, 5 rue de la Doua, CS 70077, F-69626 Villeurbanne Cedex, France

^e AgroParisTech, 19 Avenue du Maine, F-75732 Paris Cedex 15, France

ARTICLE INFO

Article history:

Received 8 December 2014

Received in revised form

23 March 2015

Accepted 25 March 2015

Available online

Keywords:

Pb

Gammarid

Waterborne exposure

Water chemistry

Metal bioavailability

Toxicokinetics

ABSTRACT

Metals bioaccumulated in aquatic organisms are considered to be a good indicator of bioavailable metal contamination levels in freshwaters. However, bioaccumulation depends on the metal, the species, and the water chemistry that influences metal bioavailability. In the laboratory, a kinetic model was used to describe waterborne Pb bioaccumulated in *Gammarus pulex*. Uptake and elimination rate constants were successfully determined and the effect of Ca²⁺ on Pb uptake was integrated into the model. Thereafter, accumulated Pb concentrations in organisms were predicted with the model and compared with those measured in native populations from the Seine watershed (France). The predictions had a good agreement with the bioaccumulation levels observed in native gammarids and particularly when the effect of calcium was considered. To conclude, kinetic parameters experimentally derived for Pb in *G. pulex* are applicable in environmental conditions. Moreover, the consideration of the water's chemistry is crucial for a reliable interpretation of bioaccumulation.

© 2015 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Trace metals naturally occur in the environment but human activities have largely contributed to their release in continental waters. Among trace metals, lead (Pb) is rightly considered within the European Water Framework Directive (WFD) as a priority substance (Directive, 2000/60/EC). Indeed, this metal is one of the most important trace metal contaminants occurring in the aquatic environment as a consequence of both natural and anthropogenic processes, i.e. mining, coal burning, cement manufacturing, and traffic (Kutlu et al., 2002; WHO, 1995). Moreover, Pb is nonessential for biological processes and may cause damage to aquatic organisms even at very low concentrations. For example, studies reported reproductive effects in rainbow trout and *Daphnia magna*, or behavioural disorders in fish and snails after chronic exposure to Pb (Berglin et al., 1985; Holcombe et al., 1976; Pyatt et al., 2002; Ruby et al., 2000).

Chemical analyses of dissolved metal concentrations are recommended by the WFD to monitor metal contamination in river water. Nevertheless, this approach gives a pointwise picture of the metal contamination in the environment and does not give information on bioavailable metals, which are the fraction of metals able to interact with organisms and potentially exert toxicity. Moreover, bioavailability is strongly affected by the geochemistry conditions. As a consequence, chemical analyses of environmental compartments, such as the water, sediment, are not sufficient for diagnosing the impact of metallic contamination on aquatic biota. Alternatively, the quantification of metal concentrations accumulated in aquatic organisms gives an integrated measure of their exposure and includes the effect of water chemistry on dissolved metal bioavailability. Thus, bioaccumulation of metals in aquatic species has been successfully used to assess spatial and temporal trends of bioavailable metals in continental waters (Baudrimont et al., 1999; Besse et al., 2012; Chevreuil et al., 1996).

Among the aquatic organisms predisposed to monitor trends of bioavailable metal contamination in the freshwaters, the amphipods of the genus *Gammarus* arouse interest as they are widespread and ubiquitous in rivers and streams of Europe, where they are often present in high density. Gammarids are also of ecological

* Corresponding author. Irstea, UR HBAN – Ecotoxicology, 1 rue Pierre-Gilles de Gennes, CS 10030, F-92761 Antony Cedex, France.

E-mail address: nastassia.uri@irstea.fr (N. Urien).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.envpol.2015.03.045>

0269-7491/© 2015 Elsevier Ltd. All rights reserved.

relevance as they actively contribute to the leaf litter breakdown and represent a good source of food for predators like birds, fish, amphibians (Forrow and Maltby, 2000; Graça et al., 2001; Welton, 1979). Moreover, gammarids are known to be net accumulators of various metals, essential or not, and are therefore considered as promising species to monitor metal bioavailability in freshwaters (Felten et al., 2008; Fialkowski and Rainbow, 2006; Lebrun et al., 2012, 2014).

The link between metal contamination in the water and bioaccumulation in organisms is not straightforward. Today, biodynamic modelling is a common approach used to describe metal bioaccumulation in aquatic organisms (Bourgeault et al., 2010; Casado-Martinez et al., 2009; Cresswell et al., 2014; Kalman et al., 2010; Lebrun et al., 2012; Luoma and Rainbow, 2005). The biodynamic model assumes that bioaccumulation is the result of a balance between the uptake rates, from aqueous and dietary routes, and loss rates (Luoma and Rainbow, 2005). While it is likely to be significant, the relative importance of the diet to total metal uptake is still to be determined for many freshwater invertebrates under specific exposure conditions, including the case of Pb accumulation by *Gammarus pulex*. It is still relevant, therefore, to investigate Pb accumulation by this amphipod after uptake from solution alone, in order to assess the significance of this waterborne source to total lead accumulation. During waterborne exposures, metal fluxes depend on kinetic parameters, the uptake and the elimination rate constants, which are specific to the metal/organism couple and which can be determined under laboratory conditions. Nonetheless, studies about kinetics of Pb uptake are limited unlike Cd, Zn, Cu or Ni, which have been widely investigated in freshwater invertebrates, including *Gammarus* species (Lebrun et al., 2012, 2011; Pellet et al., 2009; Xu and Pascoe, 1993). Indeed, in freshwater macroinvertebrates, bioaccumulation kinetic parameters of Pb have been determined for *D. magna* (Komjarova and Blust, 2009) or the amphipod *Hyalella azteca* (MacLean et al., 1996). To our knowledge no kinetic models have been developed for Pb in gammarids (Lebrun et al., 2011, 2012; Pellet et al., 2009, 2014). Furthermore, there is a relative lack of information on the modelling of Pb bioaccumulation by freshwater invertebrates, especially because of the lack of suitable radioisotopes for Pb, and because of limited access to suitable alternative stable isotope measurement facilities.

Water chemistry has often been pointed out as influencing the bioavailability of metals. In the literature, it is well accepted that the main soluble metal forms suggested as bioavailable are free ions (Di Toro et al., 2001; Morel, 1983). Indeed, metallic ions can directly interact with the biological binding sites of aquatic organisms (Niyogi and Wood, 2004). Major ions present in the water, such as calcium (Ca^{2+}), magnesium (Mg^{2+}) or sodium (Na^+), have the potential to interact with free metal ions on biological surfaces and consequently modulate metal bioavailability. For example, different studies have reported the decrease of Pb accumulation with increasing Ca^{2+} in many species including crustaceans (Besser et al., 2005; Komjarova and Blust, 2009), fish (Grosell et al., 2006; Macdonald et al., 2002) or algae (Slaveykova and Wilkinson, 2002). Such an effect of Ca^{2+} on Cd and Ni uptake has also been reported in various aquatic species (Croteau and Luoma, 2007; Keithly et al., 2004; Kienle et al., 2009; Tan and Wang, 2008) including *G. pulex* (Lebrun et al., 2011; Pellet et al., 2009). Taking into account water's cationic composition could be a way to improve metal bioaccumulation modelling and to better interpret bioaccumulation in terms of bioavailable contamination (Bourgeault et al., 2010; Pellet et al., 2009).

The aim of this study was to calibrate, under laboratory conditions, a kinetic model predicting waterborne metal bioaccumulation in *G. pulex*. The influence of water's cationic composition on Pb uptake was also investigated. Finally, the

question of the applicability of the model to estimate bioaccumulation of Pb *in situ* was addressed. To this end, calibrated *G. pulex* were independently exposed to different Pb concentrations in controlled conditions (from $1 \mu\text{g L}^{-1}$ to $100 \mu\text{g L}^{-1}$). The concentration of Pb in organisms was measured over time for the determination of kinetic parameters. Then, gammarids were exposed to Pb in media exhibiting different concentrations of Ca^{2+} , Na^+ , or Mg^{2+} in order to evaluate their influence on Pb uptake. Finally, predictions made by the model taking into account the effect of calcium or not were compared to the contamination levels of native *G. pulex* collected at the Seine watershed (France).

2. Materials and methods

2.1. Experimental design

2.1.1. Collection and maintenance of *G. pulex*

Adult *G. pulex* were collected in February 2012 in a river (Ru de l'Etang, Doue, France) where the dissolved concentrations for several metals were overall below world average values in uncontaminated rivers (Gaillardet et al., 2003) and below the Environmental Quality Standard (EQS) recommended by the WFD for metals belonging to the list of priority substances (Directive, 2013/39/EC). Gammarids were sieved (between mesh-size of 2 and 2.5 mm) to collect only adult individuals (length of about 1 cm for a width between 2 and 2.5 mm), transported to the laboratory, and then acclimatised for 7 days at 14°C in aerated mineral water (Volvic® Ca^{2+} 11.5, Na^+ 11.6, Mg^{2+} 8.0, K^+ 6.2, Cl^- 13.5, SO_4^{2-} 8.1 mg L^{-1} and pH 7) with a 10:14-h light:dark photoperiod. Organisms were fed *ad libitum* with hornbeam leaves (*Carpinus betulus*) from the same sampling site.

2.1.2. Kinetics of bioaccumulation

Aquatic microcosms created in plastic beakers were filled with 500 mL of Volvic® mineral water and spiked with $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ so as to obtain final Pb exposure concentrations of 1, 2.5, 5, 10, 25, 50, and $100 \mu\text{g L}^{-1}$. The range of Pb concentrations chosen for the exposures was made to be approximately between EQS/10 and EQS*10 i.e. from 1 to $100 \mu\text{g L}^{-1}$ (EQS = $7.2 \mu\text{g L}^{-1}$ (Directive, 2008/105/EC)). Each condition was performed in triplicates of microcosms, which were pre-equilibrated for 48 h to saturate the potential adsorption sites before performing the experiment in order to ensure a constant metal exposure. Then, fifty 24-h-starved *G. pulex* were introduced in each beaker without food for 5 days of exposure followed by a 7-day depuration period. During the exposure phase, each medium was renewed every day to ensure a constant exposure and a correct oxygenation rate. During the depuration period, each beaker was renewed only with uncontaminated Volvic® mineral water and gammarids could feed *ad libitum* on hornbeam leaves. A pool of five gammarids per beaker was sampled on day 0, 0.5, 1, 2, and 5 for the exposure phase and on day 7, 9, and 12 for the depuration phase. Each time, gammarids were rinsed in a solution of 2 and then 0.5 mM EDTA, and then rinsed twice with ultrapure water to remove metal potentially adsorbed on their cuticle (Lebrun et al., 2011) and stored at -20°C . At the same time, dead gammarids were counted and removed. At each sampling time, renewed water was sampled and the water contamination level was checked for Pb using a graphite furnace atomic absorption spectrophotometer (AAS; SpectrAA 220Z Varian with Zeeman background correction).

For analysis, gammarids were freeze-dried (Christ Alpha 2-4 LD plus), weighed, and digested at 95°C (Digiprep Jr, SCP Science) with HNO_3 (65% suprapur, Merck), H_2O_2 (suprapur, Merck), and finally diluted with ultrapure water. Pb analysis in gammarids was performed by AAS in standard addition to limit matrix effects.

Calibration was performed after every three samples. The quality of the analysis of waters has been checked by analysing two natural water certified reference materials every 20 samples (SPS-SW1, Spectrapure standard AS Oslo and EP-L-2CR, EnviroMAT). The quality of the whole analysis process of gammarids including digestion has been checked by analysing the two natural water certified reference materials cited above every 20 samples, and a certified reference material of biological tissue (CMR: Mussel Tissue ERM-CE278). The mean of every certified material was consistently within the certified 95% confidence limit range for Pb.

In this study, every unit related to the mass of gammarids is expressed in dry weight.

The background Pb concentration in control organisms was determined to be $0.64 \pm 0.23 \mu\text{g g}^{-1}$ ($n = 12$). This value was subtracted from all subsequent tissue Pb measurements to determine the net accumulated Pb from the exposure.

2.1.3. Influence of major ions on Pb uptake

To assess the influence of major cations on metal uptake, gammarids were exposed for 2 days to $10 \mu\text{g L}^{-1}$ of Pb in Volvic® microcosms (plastic beakers of 500 mL) containing 30, 60, and 100 mg L^{-1} of Na^+ or Mg^{2+} or 25, 50, 75, 100, and 150 mg L^{-1} of Ca^{2+} obtained by adding solutions of NaNO_3 , $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ or CaCl_2 to the starting Volvic® medium. The ranges of cation concentrations are of environmental relevance since they have been

chosen in accordance with the ranges found in the Seine watershed from the Agence de l'Eau de Seine-Normandie public database (<http://www.eau-seine-normandie.fr/>). Each condition was performed in triplicate and all microcosms were pre-equilibrated for 48 h before the experiment. Then, ten 24-h-starved *G. pulex* were introduced in each beaker without food for 2 days of exposure. Each medium was renewed on day 1 to ensure a constant exposure. After 2 days, a pool of five gammarids per beaker was sampled, rinsed, digested, and analysed for Pb by AAS as described in Section 2.1.2. Cationic concentrations in media were determined via chromatographic analysis [Dionex DX120, column IonPac CS16 Dionex N° 057573 ($4 \times 250 \text{ mm}$)] and Pb exposure was analysed by AAS.

An exposure concentration equal to $10 \mu\text{g L}^{-1}$ of Pb was chosen because it was the most appropriate concentration to observe a significant accumulation after 2 days of exposure and to stay in agreement with the EQS defined by the WDF before 2013 (EQS = $7.2 \mu\text{g L}^{-1}$ (Directive, 2008/105/EC)).

2.2. Field data

Sampling of native *G. pulex* from 21 sites from the Seine watershed was performed, among which 14 were sampled in 2008, three in 2009, two in 2012, and two in 2013 (Fig. 1). Collection sites are characterised by various anthropogenic pressures and contrasted water chemistry (Lebrun et al., 2014; Tusseau-Vuillemin

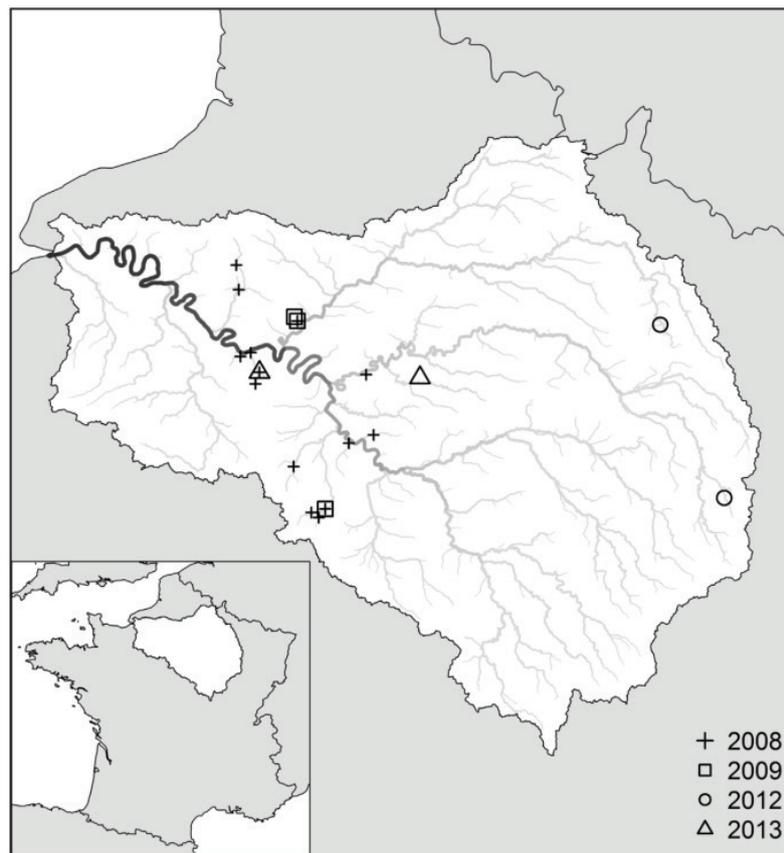


Fig. 1. Twenty one sites at the Seine watershed in France where native gammarids were collected for Pb contents analyses. Sampling consisted in collecting three replicates of five calibrated adult individuals ($n = 3$). Each symbol corresponds to a sampling year.

et al., 2007). At each site, 50 adult gammarids were collected (for a resulting length of 1 cm, as described in 2.1.1), transported to the laboratory in plastic bottles containing river water, and identified according to a reference taxonomic determination. Then, collected gammarids were distributed in triplicates of 10 individuals in 50-mL polypropylene tubes (SCP Science), treated as described in Section 2.1.2, and analysed by inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS, X series 2, Thermo Fisher Scientific) to determine their Pb content in tissues.

River water was sampled, filtered through a 0.45- μm PES syringe filter (Millipore), and then acidified with HNO_3 sp at 1% v/v for dissolved Pb concentrations analysis (ICP-MS). Physicochemical characteristics of river water were taken from the Agence de l'Eau de Seine-Normandie public database for sites sampled in 2008 and 2009 (<http://www.eau-seine-normandie.fr/>). For the other sites, 1 mL of raw water was sampled and analysed by chromatographic analysis [Dionex DX120, column IonPac CS16 Dionex N° 057573 (4×250 mm)] for Ca^{2+} , Na^+ and Mg^{2+} concentrations determination. The digestion method and analysis of the organisms were successfully validated by the reference material (CMR Mussel Tissue ERM-CE278) and the analysis of the media waters was validated with natural water certified reference material (NIST 1640). Reference materials results were within the certified 95% confidence limit range for Pb.

2.3. Kinetic modelling and parameter estimation

2.3.1. Theory and assumptions

In the present study, we only focused on Pb uptake and accumulation from solution, ignoring any trophic uptake of Pb by the amphipods.

Since no significant growth of organisms has been observed during the 12-d of experiment, metal bioaccumulation from solution can be expressed according to the first-order kinetic model as follows:

$$\frac{dC_{\text{metal}}}{dt} = k_{\text{in}} \cdot C_w - k_{\text{out}} \cdot C_{\text{metal}} \quad (1)$$

where C_{metal} is the metal concentration accumulated in organisms ($\mu\text{g g}^{-1}$), C_w is the dissolved concentration of Pb in the column water ($\mu\text{g L}^{-1}$), and k_{in} and k_{out} the kinetic parameters that are, respectively, the uptake rate constant ($\text{L g}^{-1} \text{d}^{-1}$) and the elimination rate constant (d^{-1}). These kinetic parameters are specific to each metal/organism couple and they are generally assumed to be independent of C_w (Luoma and Rainbow, 2005). Moreover, C_w is assumed to be constant during the exposure.

The integration of Eq. (1) characterises metal accumulation as follows:

$$C_{\text{metal}} = \frac{k_{\text{in}} \cdot C_w}{k_{\text{out}}} (1 - e^{-k_{\text{out}} t}) \quad (2)$$

Under the assumption of steady-state achievement at the end of the exposure, metal bioaccumulation from the solution ($t \rightarrow \infty$) is expressed as follows:

$$C_{\text{ss}} = \frac{k_{\text{in}} \cdot C_w}{k_{\text{out}}} \quad (3)$$

with C_{ss} , the concentration of metal in organisms in the steady state ($\mu\text{g g}^{-1}$).

At the end of the exposure phase, organisms are introduced for the depuration phase into uncontaminated microcosms where C_w is null. In these conditions, Eq. (1) is reduced to:

$$\frac{dC_{\text{metal}}}{dt} = -k_{\text{out}} \cdot C_{\text{metal}} \quad (4)$$

The integration of Eq. (4) characterises metal elimination as follows:

$$C_{\text{metal}} = C_{\text{metal}}(0) \cdot e^{-k_{\text{out}} \cdot t} \quad (5)$$

where $C_{\text{metal}}(0)$ is the concentration of metal in organisms at the beginning of the depuration phase ($\mu\text{g g}^{-1}$).

2.3.2. Fitting to laboratory data

The kinetic model was fitted to Pb concentrations in organisms for both the exposure and the depuration phases together, since Eq. (2) (exposure) and Eq. (5) (depuration) share the parameter k_{out} . All the Pb exposure conditions (1, 2.5, 5, 10, 25, 50, and 100 $\mu\text{g L}^{-1}$) were considered simultaneously, and to check the independence of k_{in} and k_{out} from C_w , two models were built: one model where kinetic parameters k_{in} and k_{out} were concentration-specific (model #1, $2 \cdot 7 = 14$ parameters in total), and one simpler model where k_{in} and k_{out} were concentration-independent, i.e., kinetic parameters are common to all exposure conditions (model #2, two parameters in total). Model #1 and model #2 were compared based on their AIC (Akaike (1981) information criterion), which provides a means for model selection by the trade-off between the goodness of fit and the complexity of the model. This enabled us to determine whether kinetic parameters are concentration-specific (model #1) or can be considered as concentration-independent (model #2). Models were fitted to the data by nonlinear least square regression. Data were scaled (divided by the exposure concentration) to ensure a constant variance of data across exposure concentrations.

2.3.3. Modelling the influence of major ions on Pb uptake

According to Bourgeault et al. (2010), the effects of ions on metal uptake can be explicitly taken into account with the model. This requires the use of a competition model in which the uptake rate constant is related to the concentrations of the ions considered and the affinity constants of the ions for their biological binding sites and is expressed as follows:

$$k_{\text{in}} = k_{\text{in max}} / \left(1 + \sum_i \frac{C_i}{K_{iC_i}} \right) \quad (6)$$

where $k_{\text{in max}}$ is the uptake rate constant of the metal in the absence of the considered ions in water, C_i is the concentrations of ions in the media water, and K_{iC_i} is the affinity constant that represents the ion concentration required to divide by two the metal uptake rate constant. The weaker the affinity constant, the stronger the competition effect.

The fit by nonlinear regression of Eq. (6) on the k_{in} dataset given by varying ionic concentrations in the water enables us to estimate the parameters $k_{\text{in max}}$ and K_{iC_i} . Then, considering Eq. (3) and Eq. (6), we obtain:

$$C_{\text{ss}} = \frac{k_{\text{in max}}}{k_{\text{out}}} \cdot \frac{C_w}{\left(1 + \sum_i \frac{C_i}{K_{iC_i}} \right)} \quad (7)$$

2.3.4. Estimations toward *in situ* conditions

In this study, the suitability of the model to estimate bioaccumulation of Pb in gammarids under realistic environmental conditions was investigated. To this end, bioaccumulation was predicted with (1) the bioaccumulation model expressed by Eq. (3)

using the experimentally determined k_{in} and k_{out} and the dissolved Pb concentrations (C_w) measured *in situ* and (2) the bioaccumulation model integrating additionally the effect of cations (Eq. (7)) using the experimentally determined $k_{in\ max}$, Ki_{Ca} and k_{out} and the dissolved Pb concentrations (C_w) and ion concentrations (C_i) measured *in situ*. Then predictions were compared with bioaccumulations observed in collected native gammarids. The match of the predictions with the observations was calculated using an indicator of goodness of fit, the scaled root mean square error:

$$SRMSE = \frac{100}{\overline{observations}} \times \sqrt{\frac{1}{n} \times \sum_{i=1}^n (estimation_i - observation_i)^2} \quad (8)$$

where $observation_i$ = observed internal Pb concentrations at site i , $estimation_i$ = modelled Pb contents in gammarids at site i , n = total number of observations, and $\overline{observations}$ = mean of all the observed Pb contents in gammarids. The lower the SRMSE, the better the model estimation.

2.3.5. Statistical analysis

Nonlinear regressions and AIC calculations were performed using R (R Core Team, 2012) and the 'nlstools' package (Baty et al., Accepted). Estimates of parameters k_{in} , $k_{in\ max}$, Ki_{Ca} and k_{out} are given with a confidence interval of 95%. Nonparametric Kruskal–Wallis tests were used to compare Pb concentrations after 5 days in exposed versus control gammarids as well as Pb concentrations after 2 days in gammarids exposed to Pb with versus without Ca^{2+} , Na^+ or Mg^{2+} . The background level of Pb in gammarids at the beginning of the exposure phase is given as mean \pm standard deviation.

3. Results and discussion

3.1. Kinetic parameters

After five days of experiment, exposed gammarids significantly accumulated Pb compared to the control gammarids (Kruskal–Wallis, $p < 0.05$). The accumulation and depuration kinetics obtained for each group of exposed gammarids are depicted in Fig. 2. Pb accumulation increased linearly in the first 24 h and started to slow down from the second day, finally tending towards the achievement of a steady-state until the end of the exposure phase. These results are in agreement with the efficient metal accumulation capacities of *G. pulex* already observed for Cd, Ni, Cu, and Zn (Lebrun et al., 2011, 2012; Pellet et al., 2009; Vellinger et al., 2012; Xu and Pascoe, 1993). Dedourge-Geffard et al. (2009) and Besse et al. (2013) also reported the ability of another closely related species, *Gammarus fossarum*, to accumulate metals during *in situ* experiments. Thus, the genus *Gammarus* is currently proposed as a promising candidate for monitoring water quality (Besse et al., 2013; Clason et al., 2004; Fialkowski et al., 2003; Xu and Pascoe, 1994).

During the depuration phase, Pb was exponentially excreted leading to body concentrations in gammarids reaching the background level within 9 days, which showed that excretion mechanisms are favoured rather than storage strategies.

The kinetic model was fitted to Pb concentrations in organisms for both exposure and depuration phases together in order to estimate the kinetic parameters k_{in} and k_{out} . The results of the AIC score calculation showed that the AIC score for model #1 was greater than the AIC score for model #2, which confirms that kinetic parameters were concentration-independent leading to the following global kinetic parameters: $k_{in} = 1.01\ L\ g^{-1}\ d^{-1}$ [0.88; 1.14]

and $k_{out} = 0.33\ d^{-1}$ [0.28; 0.38].

The uptake rate constant for Pb (k_{in}) was similar to the uptake rate constants reported in *H. azteca* and *D. magna*, equal to $1.5\ L\ g^{-1}\ d^{-1}$ and $1.2\ L\ g^{-1}\ d^{-1}$ respectively (Komjarova and Blust, 2008; MacLean et al., 1996). The k_{in} value was also in the same order of magnitude as the k_{in} value reported in *G. pulex* for Cd ($0.46\ L\ g^{-1}\ d^{-1}$) by Pellet et al. (2009), which suggests that Pb and Cd have similar affinity to biological binding sites. This analogy may be justified by the implication of similar biological pathways as reported by Macdonald et al. (2002).

The elimination rate constant of Pb determined in *G. pulex* was close to the one established in another freshwater amphipod *H. azteca*, with a value of $0.52\ d^{-1}$ (MacLean et al., 1996), suggesting a similar Pb excretion capacities. Moreover, *G. pulex* seems to have similar abilities to excrete Pb and Ni since their k_{out} values are in the same order of magnitude, respectively 0.33 and $0.13\ d^{-1}$ (Lebrun et al., 2011). On the contrary, the elimination rate constant of Pb was about 10 times higher than the one of Cd of $0.032\ d^{-1}$ (Pellet et al., 2009), which suggests that different excretion mechanisms occurred.

3.2. Influence of water cationic composition on Pb uptake

Neither Mg^{2+} nor Na^+ had a significant effect on Pb uptake ($p = 0.92$ and 0.74 , respectively, Kruskal–Wallis, data not shown). Inversely, the k_{in} value for Pb decreased from 1.25 to $0.34\ L\ g^{-1}\ d^{-1}$ with increasing Ca^{2+} concentrations from 11.5 (initial content in the mineral water) to $154\ mg\ L^{-1}$ (Fig. 3). In *D. magna*, Komjarova and Blust (2009) showed that the Pb uptake doubled with high sodium content ($184\ mg\ L^{-1}$) and sharply decreased with a high Ca^{2+} concentration ($100\ mg\ L^{-1}$) (Komjarova and Blust, 2009). It is well known that some trace metals are able to enter cells via routes for the uptake of major metal ions (Rainbow, 1997). Previous studies in fish have demonstrated that Pb is preferentially taken up via Ca^{2+} channels and consequently competes with Ca^{2+} for penetration into organisms (Macdonald et al., 2002; Niyogi and Wood, 2004; Rogers et al., 2003; Rogers and Wood, 2004).

Derived from Eq. (6), the effect of Ca^{2+} concentration observed on k_{in} value is given by:

$$k_{in} = k_{in\ max} / \left(1 + \frac{C_{Ca}}{Ki_{Ca}} \right) \quad (9)$$

where the model parameters were estimated at the following values: $k_{in\ max} = 1.38\ L\ g^{-1}\ d^{-1}$ [1.00; 1.76] and $Ki_{Ca} = 60\ mg\ L^{-1}$ [18; 101]. The model is shown in Fig. 3.

Thus, accounting for the effect of only Ca^{2+} , bioaccumulation of metal from the solution in the steady-state ($t \rightarrow \infty$) (Eq. (7)) is expressed as follows:

$$C_{ss} = \frac{k_{in\ max}}{k_{out}} \left(1 + \frac{C_{Ca}}{Ki_{Ca}} \right) \cdot C_w \quad (10)$$

In *G. pulex*, the effect of Ca^{2+} has also been observed for Cd with a $Ki_{Ca} = 66.4\ mg\ L^{-1}$ and for Ni with an affinity constant equal to $181.5\ mg\ L^{-1}$ (Lebrun et al., 2011; Pellet et al., 2009). The similarity between the affinity constants of Pb and Cd underlined the comparable behaviour of these two metals to enter biological surfaces and especially the use of the same entry pathway via Ca^{2+} channels as reported for Cd in bivalves or in freshwater snails (Croteau and Luoma, 2007; Qiu et al., 2005). Moreover, Pb uptake in *G. pulex* probably does not involve Na^+ or Mg^{2+} channels, as indicated by the Na^+ and Mg^{2+} concentrations having no effect on the k_{in} value.

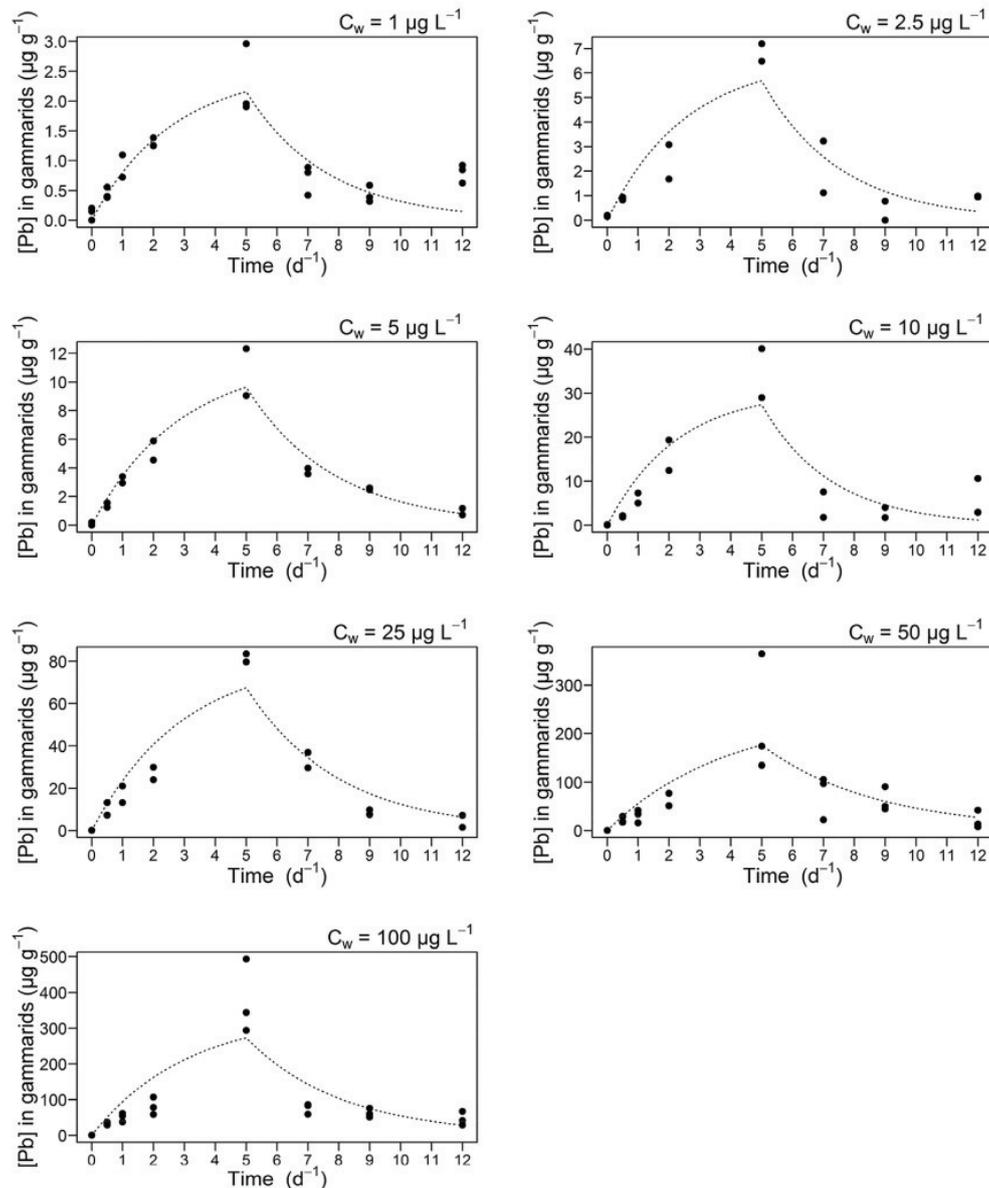


Fig. 2. Accumulation and depuration kinetics of Pb in *G. pulex* for each exposure condition (C_w). Black points are replicates each composed by a pool of 5 gammarids and dotted lines represent the best model fit of Eq. (2) (exposure phase) and Eq. (5) (depuration phase) on the Pb contents in gammarids.

3.3. *In situ* model validation

Our field study aimed to assess whether experimentally-derived kinetic parameters could be suitable to estimate Pb contents in native gammarids. Samples of native gammarids in 21 sites were collected from the Seine watershed on which Pb contents were measured. Assuming that *in situ* organisms are in equilibrium with their medium, waterborne Pb bioaccumulation at steady state was calculated with a kinetic model calibrated in the laboratory taking into account or not the effect of calcium. As presented in Table 1, concentrations of dissolved Pb in the 21 sites ranged between 0.03

and $1.60 \mu\text{g L}^{-1}$, only two sites exhibited Pb concentrations higher than the related recent EQS ($1.2 \mu\text{g L}^{-1}$ (Directive, 2013/39/EC)). Pb contents in native gammarids ranged between 0.84 and $3.43 \mu\text{g g}^{-1}$, i.e., above the background concentration observed in *G. pulex* used to calibrate the model in the laboratory ($0.64 \mu\text{g g}^{-1}$) (Table 1). Clason et al. (2004) reported comparable Pb concentrations measured in *Gammarus oceanicus* of up to $2 \mu\text{g g}^{-1}$ in northern Norway. Calcium profiles were contrasted with a minimum concentration of 47 mg L^{-1} and a maximum of 159 mg L^{-1} (Table 1), which is consistent with the limestone geology of the Seine watershed.

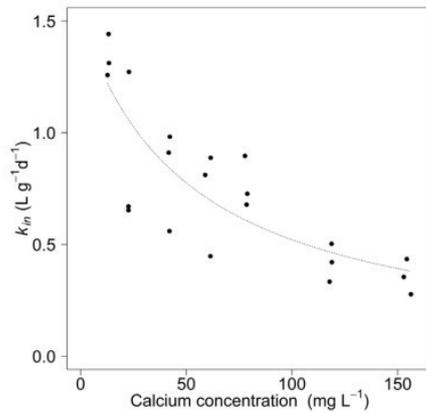


Fig. 3. Inhibition of the Pb uptake by increasing Ca^{2+} concentrations in *G. pulex* exposed to $10 \mu\text{g L}^{-1}$ Pb. The dashed line represents the best fit of a competitive model (Eq. (6)) to data. Points are replicates each composed by a pool of 5 gammarids.

Fig. 4A displays the observed bioaccumulation levels compared with the estimated bioaccumulation levels calculated with Eq. (3) using k_{in} and k_{out} of $1.01 \text{ L g}^{-1} \text{ d}^{-1}$ and 0.33 d^{-1} . Results show a good agreement between observations and estimations, with 85% of the estimations between the dashed lines representing a twofold deviation above or below the theoretical 1:1 relationship. The calculated SRMSE was equal to 71%. Overall, 15% of the points were above the dashed line, which means that bioaccumulated concentrations were overestimated at those sites. These results suggest that other factors could influence the metal uptake, typically calcium concentrations. Besides, the kinetic model assumes that the concentrations to which organisms are exposed are constant. However, although the metal exposure can be easily verified in the laboratory, it is sometimes not certain *in situ* because of the temporal fluctuations of the contamination that may occur during particular incidents such as accidental discharge, floods or flushing. Thus, a single measure of the dissolved metal concentration *in situ*

could introduce a bias in the estimated bioaccumulation and may explain some discrepancies between predictions and observations.

Fig. 4B depicts the observed bioaccumulation levels compared with the estimated bioaccumulation levels taking into account the effect of Ca^{2+} . Bioaccumulated concentration was calculated with Eq. (10) with $k_{in \text{ max}} = 1.38 \text{ L g}^{-1} \text{ d}^{-1}$, $k_{out} = 0.33 \text{ d}^{-1}$, $Ki_{Ca} = 60 \text{ mg L}^{-1}$, experimentally derived in the laboratory for this study and the lead concentration C_w and the calcium concentration C_{Ca} measured at the sampling site. The consideration of Ca^{2+} resulted in a tightening of the plot around the theoretical 1:1 relationship. The calculated SRMSE was equal to 40%, which means that the consideration of Ca^{2+} improves the estimation accuracy by about 44%. Thus, calcium concentrations in the ambient water seem to be an important factor influencing bioaccumulation of Pb since the consideration of the effect of calcium has permitted to improve bioaccumulation modelling.

As presented in Fig. 4B, the model taking into account Ca^{2+} concentrations under-estimates the bioaccumulation in 14% of the cases. The sites for which the bioaccumulation was underestimated were not geographically close and no other factors than those given in Table 1 were available to support any explanation. These observations may be related to a lower impact of Ca^{2+} concentrations under field conditions as compared with observed effects under laboratory conditions. Another explanation could be the contribution of the trophic route at these sites. In the literature, an increasing number of studies have found that, for particular metal/species combinations, diet is an important contributory factor in metal bioaccumulation, and the contribution of the trophic route needs to be integrated to improve the accuracy of any biodynamic model. This is, for example, the case of Cd, Zn or Ag in the marine lugworm, *Arenicola marina* (Casado-Martinez et al., 2009) or in marine and freshwater bivalves (Luoma and Rainbow, 2005). To date, bioaccumulation data of Pb are limited in freshwater species and the question of the contribution of the trophic route is yet not univocal. Thus, studies assessing the dietary route of Pb in gammarids will bring complementary information to the limited body of literature concerning dietary route of Pb in aquatic organisms.

In this study, the experimentally derived kinetic parameters were highly applicable to environmental conditions encountered in the Seine watershed, in spite of ignoring the dietary route of

Table 1

Summary of the dissolved contamination levels of Pb in waters ($\mu\text{g L}^{-1}$), Pb concentrations in native gammarids ($\mu\text{g g}^{-1}$) and concentrations of the major cations Ca^{2+} , Mg^{2+} and Na^{+} (mg L^{-1}) at the 21 sampling sites for which bioaccumulation was predicted by the kinetic model.

Sampling sites		Measured concentrations				
Year	River	Pb in gammarids ($\mu\text{g g}^{-1}$)	Dissolved Pb ($\mu\text{g L}^{-1}$)	Ca^{2+} (mg L^{-1})	Mg^{2+} (mg L^{-1})	Na^{+} (mg L^{-1})
2008	Le Lieutel	1.21	0.64	119	23	34
2008	L'Esnonne	3.12	0.51	117	5	47
2008	La Sausseron	1.49	0.29	116	20	12
2008	La Juine	1.96	0.11	104	4	9
2008	La Gondoire	1.75	0.12	114	10	21
2008	La Rimarde	0.84	0.06	113	4	13
2008	L'Ecole	1.05	0.08	114	4	17
2008	Ru de Senneville	0.90	0.47	120	17	15
2008	La Mauldre	2.93	0.83	116	18	63
2008	Ru d'Ancueil	1.03	0.08	153	8	75
2008	Ru de Gally	3.43	1.60	118	12	61
2008	L'Oeuf	0.98	0.03	120	5	8
2008	L'Epte	1.60	0.15	120	5	20
2008	La Levrière	2.06	1.10	122	8	10
2009	L'Esnonne	2.31	1.60	124	7	47
2009	Ru de Fourville	1.19	0.37	120	20	14
2009	La Sausseron	1.14	0.53	120	20	14
2012	Le Rognon	0.92	0.06	47	3	4
2012	L' Auve	0.84	0.05	130	2	8
2013	Ru de Gally	1.64	0.51	159	19	77
2013	Le Rognon	1.10	0.26	98	8	16

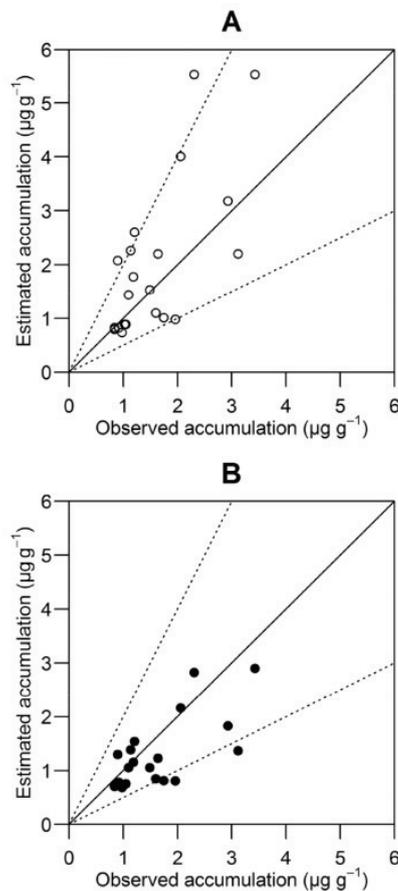


Fig. 4. Observed bioaccumulation levels of Pb in native gammarids against estimated bioaccumulation levels by the kinetic model using Eq. (3) ($k_{in} = 1.01 \text{ L g}^{-1} \text{ d}^{-1}$ and $k_{out} = 0.33 \text{ d}^{-1}$, established in the Volvic® mineral water containing a basal Ca^{2+} concentration of 11.5 mg L^{-1}) for the plot A and using Eq. (10) ($k_{in \text{ max}} = 1.38 \text{ L g}^{-1} \text{ d}^{-1}$ and $k_{out} = 0.33 \text{ d}^{-1}$ and $Ki_{\text{Ca}} = 60 \text{ mg L}^{-1}$) for the plot B (white and black symbols are mean values, $n = 3$ pools of 5 gammarids). The solid line represents the theoretical model fit 1:1 and dashed lines display a deviation of 2-fold above and below the relationship 1:1.

uptake. In the perspective to tend towards the use of a generalised model to predict Pb bioaccumulation, it could be opportune to validate the kinetic parameters over a larger geographical scale and in contrasted hydrosystems (variability of size, metal contamination, geochemical parameters ...). However, the validation of the model can be limited because they cannot be tested if native gammarids are absent. To overcome this issue, the use of transplanted organisms can be relevant. Indeed, this approach allows for studies at sites devoid of native gammarids. Moreover, the use of transplanted organisms limits biological variability, which can hinder the interpretation of bioaccumulation, as organisms are collected from the same population (Besse et al., 2012, 2013; Bourgeault et al., 2010; Mersch et al., 1996). This approach also enables control of the exposure during the transplantation period, and facilitates robust inter-site comparisons (Besse et al., 2012). Therefore, in further studies, the use of transplanted gammarids could be an interesting approach to assess the performances of the model at large spatial scales.

4. Conclusion

An experimentally-derived kinetic model was used to predict waterborne bioaccumulation of Pb in native populations of *G. pulex* from the Seine watershed. Results showed a relatively robust agreement between the predicted and measured bioaccumulation levels, highlighting the applicability of the kinetic parameters for *G. pulex* to environmental conditions. The results of the present study also demonstrate that the use of dissolved metal concentrations allows for accurate predictions of Pb accumulation in *G. pulex*. Moreover, the consideration of the effect of calcium concentrations into the model has improved Pb bioaccumulation modelling. This supports that water chemistry needs to be taken into account when interpreting field data of bioaccumulation in this species. Finally, the relevance of the model was successful in the environmental conditions presented in this study. Through the use of transplanted gammarids in large geographical scale, the application of a generalised predictive model will be assessed in further investigations.

Acknowledgments

The authors are sincerely grateful to Adeline Francois, Aurélie Germain and Pauline Robert-Sainte for their active contribution and to the DRIEE ILE-DE-FRANCE (Direction Régionale et Inter-départementale de l'Environnement et de l'Energie) for its involvement during the sampling campaigns. We also wish to thank Sophie Ayrault for providing access to the ICP-MS platform at LSCE. We thank the PIREN-Seine research program, the AESN (BioMarquindic program) and the Ile-de-France Regional Council (R2DS program) for its financial support.

The authors wish to thank Pierre Brigode for his help to produce map and figures with the R software. We are grateful to the anonymous reviewers for their constructive comments.

References

- Akaike, H., 1981. Likelihood of a model and information criteria. *J. Econom.* 1, 3–14.
- Baty, F., Ritz, C., Charles, S., Brutsche, M., Flandrois, J.P., Delignette-Muller, M.-L. A Toolbox for Nonlinear Regression in R: the Package nlstools. Accepted for Publication at the Journal of Statistical Software.
- Baudrimont, M., Andrés, S., Metivaud, J., Lapaquellerie, Y., Ribeyre, F., Maillet, N., Latouche, C., Boudou, A., 1999. Field transplantation of the freshwater bivalve *Corbicula fluminea* along a polymetallic contamination gradient (river Lot, France): II. Metallothionein response to metal exposure. *Environ. Toxicol. Chem.* 18, 2472–2477.
- Berglin, R., Dave, G., Sjöbeck, M.-L., 1985. The effects of lead on δ -aminolevulinic acid dehydratase activity, growth, hemoglobin content, and reproduction in *Daphnia magna*. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 9, 216–229.
- Besse, J.-P., Coquery, M., Lopes, C., Chaumot, A., Budzinski, H., Labadie, P., Geffard, O., 2013. Caged *Gammarus fossarum* (Crustacea) as a robust tool for the characterization of bioavailable contamination levels in continental waters: towards the determination of threshold values. *Water Res.* 47, 650–660. <http://dx.doi.org/10.1016/j.watres.2012.10.024>.
- Besse, J.-P., Geffard, O., Coquery, M., 2012. Relevance and applicability of active biomonitoring in continental waters under the Water Framework Directive. *Trac. Trends Anal. Chem.* 36, 113–127.
- Besser, J.M., Brumbaugh, W.G., Brunson, E.L., Ingersoll, C.G., 2005. Acute and chronic toxicity of lead in water and diet to the amphipod *Hyaella azteca*. *Environ. Toxicol. Chem.* SETAC 24, 1807–1815.
- Bourgeault, A., Gourlay-Francé, C., Tusseau-Vuillemin, M.-H., 2010. Modeling the effect of water chemistry on the bioaccumulation of waterborne cadmium in zebra mussels. *Environ. Toxicol. Chem.* 29, 2182–2189.
- Casado-Martinez, M.C., Smith, B.D., DelValls, T.A., Luoma, S.N., Rainbow, P.S., 2009. Biodynamic modelling and the prediction of accumulated trace metal concentrations in the polychaete *Arenicola marina*. *Environ. Pollut.* 157, 2743–2750. <http://dx.doi.org/10.1016/j.envpol.2009.04.032>.
- Chevreuil, M., Blanchard, M., Teil, M.-J., Carru, A.-M., Testard, P., Chesterikoff, A., 1996. Evaluation of the pollution by organochlorinated compounds (polychlorobiphenyls and pesticides) and metals (Cd, Cr, Cu and Pb) in the water and in the zebra mussel (*Dreissena polymorpha pallas*) of the river Seine. *Water. Air. Soil Pollut.* 88, 371–381. <http://dx.doi.org/10.1007/BF00294112>.
- Clason, B., Gulliksen, B., Zauke, G.-P., 2004. Assessment of two-compartment models as predictive tools for the bioaccumulation of trace metals in the amphipod *Gammarus oceanicus* Segerstrale, 1947 from Grunnfjord (Northern

- Norway). *Sci. Total Environ.* 323, 227–241.
- Cresswell, T., Simpson, S.L., Smith, R.E.W., Nugegoda, D., Mazumder, D., Twining, J., 2014. Bioaccumulation and retention kinetics of cadmium in the freshwater decapod *Macrobrachium australiense*. *Aquat. Toxicol.* 148, 174–183. <http://dx.doi.org/10.1016/j.aquatox.2014.01.006>.
- Croteau, M.-N., Luoma, S.N., 2007. Characterizing dissolved Cu and Cd uptake in terms of the biotic ligand and biodynamics using enriched stable isotopes. *Environ. Sci. Technol.* 41, 3140–3145.
- Dedouge-Geffard, O., Palais, F., Biagiatti-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, 1569–1576. <http://dx.doi.org/10.1016/j.chemosphere.2009.09.042>.
- Directive, 2000/60/EC of the European parliament and of the council of 23 October 2000 establishing a framework for Community action in the field of water policy, Official Journal of European Communities.
- Directive, 2008/105/EC of the European parliament and of the council of 16 December 2008 on environmental quality standards in the field of water policy, amending and subsequently repealing Council Directives 82/176/EEC, 83/513/EEC, 84/156/EEC, 84/491/EEC, 86/280/EEC and amending Directive 2000/60/EC of the European Parliament and of the Council, Official Journal of European Communities.
- Directive, 2013/39/EC of the European parliament and of the council of 12 August 2013 amending Directives 2000/60/EC and 2008/105/EC as regards priority substances in the field of water policy, Official Journal of European Communities.
- Di Toro, D.M., Allen, H.E., Bergman, H.L., Meyer, J.S., Paquin, P.R., Santore, R.C., 2001. Biotic ligand model of the acute toxicity of metals. 1. Technical basis. *Environ. Toxicol. Chem.* 20, 2383–2396.
- Felten, V., Charmantier, G., Mons, R., Geffard, A., Rousselle, P., Coquery, M., Garric, J., Geffard, O., 2008. Physiological and behavioural responses of *Gammarus pulex* (Crustacea: Amphipoda) exposed to cadmium. *Aquat. Toxicol.* 86, 413–425. <http://dx.doi.org/10.1016/j.aquatox.2007.12.002>.
- Fialkowski, W., Fialkowska, E., Smith, B.D., Rainbow, P.S., 2003. Biomonitoring survey of trace metal pollution in streams of a catchment draining a zinc and lead mining area of Upper Silesia, Poland using the amphipod *Gammarus fossarum*. *Int. Rev. Hydrobiol.* 88, 187–200.
- Fialkowski, W., Rainbow, P.S., 2006. The discriminatory power of two biomonitors of trace metal bioavailabilities in freshwater streams. *Water Res.* 40, 1805–1810.
- Forrow, D.M., Maltby, L., 2000. Toward a mechanistic understanding of contaminant-induced changes in detritus processing in streams: direct and indirect effects on detritivore feeding. *Environ. Toxicol. Chem.* 19, 2100–2106.
- Gaillardet, J., Viers, J., Dupré, B., 2003. Trace elements in river waters. *Treatise Geochem.* 5, 225–272.
- Graça, M.A.S., Cressa, C., Gessner, T.M.O., Feio, M.J., Callies, K.A., Barrios, C., 2001. Food quality, feeding preferences, survival and growth of shredders from temperate and tropical streams. *Freshw. Biol.* 46, 947–957.
- Grosell, M., Gerdes, R., Brix, K.V., 2006. Influence of Ca, humic acid and pH on lead accumulation and toxicity in the fathead minnow during prolonged waterborne lead exposure. *Comp. Biochem. Physiol. Part C Toxicol. Pharmacol.* 143, 473–483.
- Holcombe, G.W., Benoit, D.A., Leonard, E.N., McKim, J.M., 1976. Long-term effects of lead exposure on three generations of brook trout (*Salvelinus fontinalis*). *J. Fish. Board Can.* 33, 1731–1741.
- Kalman, J., Smith, B.D., Riba, I., Blasco, J., Rainbow, P.S., 2010. Biodynamic modelling of the accumulation of Ag, Cd and Zn by the deposit-feeding polychaete *Nereis diversicolor*: inter-population variability and a generalised predictive model. *Mar. Environ. Res.* 69, 363–373. <http://dx.doi.org/10.1016/j.marenvres.2010.01.001>.
- Keithly, J., Brooker, J.A., Deforest, D.K., Wu, B.K., Brix, K.V., 2004. Acute and chronic toxicity of nickel to a cladoceran (*Ceriodaphnia dubia*) and an amphipod (*Hyalella azteca*). *Environ. Toxicol. Chem.* 23, 691–696.
- Kienle, C., Köhler, H.-R., Gerhardt, A., 2009. Behavioural and developmental toxicity of chlorpyrifos and nickel chloride to zebrafish (*Danio rerio*) embryos and larvae. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 72, 1740–1747.
- Komjarova, I., Blust, R., 2009. Effect of Na, Ca and pH on simultaneous uptake of Cd, Cu, Ni, Pb, and Zn in the water flea *Daphnia magna* measured using stable isotopes. *Aquat. Toxicol.* 94, 81–86. <http://dx.doi.org/10.1016/j.aquatox.2009.05.018>.
- Komjarova, I., Blust, R., 2008. Multi-metal interactions between Cd, Cu, Ni, Pb and Zn in water flea *Daphnia magna*, a stable isotope experiment. *Aquat. Toxicol.* 90, 138–144. <http://dx.doi.org/10.1016/j.aquatox.2008.08.007>.
- Kutlu, M., Düzen, A., Baycu, C., Özata, A., 2002. A transmission electron microscope investigation of the effect of lead acetate on the hepatopancreatic ceca of *Gammarus pulex*. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 12, 181–187.
- Lebrun, J.D., Perret, M., Geffard, A., Gourlay-Francé, C., 2012. Modelling copper bioaccumulation in *Gammarus pulex* and alterations of digestive metabolism. *Ecotoxicology* 21, 2022–2030.
- Lebrun, J.D., Perret, M., Uher, E., Tusseau-Vuillemin, M.-H., Gourlay-Francé, C., 2011. Waterborne nickel bioaccumulation in *Gammarus pulex*: comparison of mechanistic models and influence of water cationic composition. *Aquat. Toxicol.* 104, 161–167. <http://dx.doi.org/10.1016/j.aquatox.2011.04.011>.
- Lebrun, J.D., Uher, E., Tusseau-Vuillemin, M.-H., Gourlay-Francé, C., 2014. Essential metal contents in indigenous gammarids related to exposure levels at the river basin scale: metal-dependent models of bioaccumulation and geochemical correlations. *Sci. Total Environ.* 466, 100–108.
- Luoma, S.N., Rainbow, P.S., 2005. Why is metal bioaccumulation so variable? biodynamics as a unifying concept. *Environ. Sci. Technol.* 39, 1921–1931. <http://dx.doi.org/10.1021/es048947e>.
- Macdonald, A., Silk, L., Schwartz, M., Playle, R.C., 2002. A lead–gill binding model to predict acute lead toxicity to rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Comp. Biochem. Physiol. Part C Toxicol. Pharmacol.* 133, 227–242. [http://dx.doi.org/10.1016/S1532-0456\(02\)00107-2](http://dx.doi.org/10.1016/S1532-0456(02)00107-2).
- MacLean, R.S., Borgmann, U., Dixon, D.G., 1996. Bioaccumulation kinetics and toxicity of lead in (*Hyalella azteca*)(Crustacea, Amphipoda). *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 53, 2212–2220.
- Mersch, J., Wagner, P., Pihan, J.-C., 1996. Copper in indigenous and transplanted zebra mussels in relation to changing water concentrations and body weight. *Environ. Toxicol. Chem.* 15, 886–893. <http://dx.doi.org/10.1002/etc.5620150610>.
- Morel, F.M.M., 1983. *Principles of Aquatic Chemistry*. Wiley, New York.
- Niyogi, S., Wood, C.M., 2004. Biotic ligand model, a flexible tool for developing site-specific water quality guidelines for metals. *Environ. Sci. Technol.* 38, 6177–6192.
- Pellet, B., Ayrault, S., Tusseau-Vuillemin, M.-H., Gourlay-Francé, C., 2014. Quantifying diet-borne metal uptake in *Gammarus pulex* using stable isotope tracers. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 110, 182–189. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ecoenv.2014.09.001>.
- Pellet, B., Geffard, O., Lacour, C., Kermaol, T., Gourlay-Francé, C., Tusseau-Vuillemin, M.-H., 2009. A model predicting waterborne cadmium bioaccumulation in *Gammarus pulex*: the effects of dissolved organic ligands, calcium, and temperature. *Environ. Toxicol. Chem.* 28, 2434–2442.
- Pyatt, A., Pyatt, F., Pentreath, V., 2002. Lead toxicity, locomotion and feeding in the freshwater snail, *Lymnaea stagnalis* (L.). *Invert. Neurosci.* 4, 135–140.
- Qiu, J.-W., Xie, Z.-C., Wang, W.-X., 2005. Effects of calcium on the uptake and elimination of cadmium and zinc in Asiatic clams. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 48, 278–287.
- R Core Team, 2012. *R: a Language and Environment for Statistical Computing*. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria, ISBN 3-900051-07-0. URL: <http://www.R-project.org/>.
- Rainbow, P.S., 1997. *Ecophysiology of trace metal uptake in crustaceans*. *Estuar. Coast. Shelf Sci.* 44, 169–175.
- Rogers, J.T., Richards, J.G., Wood, C.M., 2003. Ionoregulatory disruption as the acute toxic mechanism for lead in the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquat. Toxicol.* 64, 215–234.
- Rogers, J.T., Wood, C.M., 2004. Characterization of branchial lead–calcium interaction in the freshwater rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. *J. Exp. Biol.* 207, 813–825.
- Ruby, S.M., Hull, R., Anderson, P., 2000. Sublethal lead affects pituitary function of rainbow trout during exogenous vitellogenesis. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 38, 46–51.
- Slaveykova, V.I., Wilkinson, K.J., 2002. Physicochemical aspects of lead bioaccumulation by *Chlorella vulgaris*. *Environ. Sci. Technol.* 36, 969–975.
- Tan, Q.-G., Wang, W.-X., 2008. The influences of ambient and body calcium on cadmium and zinc accumulation in *Daphnia magna*. *Environ. Toxicol. Chem.* SETAC 27, 1605–1613.
- Tusseau-Vuillemin, M.-H., Gourlay, C., Lorgeoux, C., Mouchel, J.-M., Buzier, R., Gilbin, R., Seidel, J.-L., Elbaz-Poulichet, F., 2007. Dissolved and bioavailable contaminants in the Seine river basin. *Sci. Total Environ.* 375, 244–256.
- Vellinger, C., Parant, M., Rousselle, P., Immel, F., Wagner, P., Usseglio-Polatera, P., 2012. Comparison of arsenate and cadmium toxicity in a freshwater amphipod (*Gammarus pulex*). *Environ. Pollut.* 160, 66–73. <http://dx.doi.org/10.1016/j.envpol.2011.09.002>.
- Welton, J.S., 1979. Life-history and production of the amphipod *Gammarus pulex* in a Dorset chalk stream. *Freshw. Biol.* 9, 263–275.
- WHO, 1995. WHO, International Programme on Chemical Safety, Environmental Health Criteria. Genève.
- Xu, Q., Pascoe, D., 1994. The importance of food and water as sources of zinc during exposure of *Gammarus pulex* (Amphipoda). *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 26, 459–465.
- Xu, Q., Pascoe, D., 1993. The bioconcentration of zinc by *Gammarus pulex* (L.) and the application of a kinetic model to determine bioconcentration factors. *Water Res.* 27, 1683–1688. [http://dx.doi.org/10.1016/0043-1354\(93\)90132-2](http://dx.doi.org/10.1016/0043-1354(93)90132-2).

2. Validation *in situ* des modèles cinétiques de bioaccumulation du Cd, du Cu, du Ni et du Pb chez le gammare : expérimentation à l'échelle de la France.

PUBLICATION 2

Environmental relevance of laboratory-derived kinetic models to predict metal bioaccumulation in gammarids: field experimentation at the national scale (France).

En préparation pour le journal « Water research »

Résumé

Les modèles cinétiques permettent de décrire les processus de bioaccumulation des métaux dans les organismes aquatiques, et offrent la possibilité de faire le lien entre la contamination du milieu et la bioaccumulation. Toutefois, ces modèles sont calibrés en conditions contrôlées de laboratoire, ce qui interroge quant à leur pertinence en milieux naturels. À ce jour, peu d'études ont confronté les modèles cinétiques de bioaccumulation des métaux aux conditions naturelles du milieu. Pourtant, cette étape est indispensable pour évaluer leur pertinence environnementale, i.e. leur capacité à prédire la bioaccumulation *in situ*, et ainsi à rendre compte de la contamination biodisponible du milieu. L'objectif de cette étude a été d'évaluer la capacité de quatre modèles cinétiques, développés (Pb) ou disponibles dans la littérature (Cd, Ni et Cu) chez le gammare, à prédire la bioaccumulation *in situ*. Afin d'obtenir des données comparables à large échelle, des suivis de la contamination de gammares transplantés sur 141 sites de toute la France ont été réalisés. Ensuite la bioaccumulation observée a été comparée à la bioaccumulation prédite par les modèles, en utilisant comme entrées du modèle, les constantes k_{in} et k_{out} propres à chaque métal ainsi que la concentration en métal dissous, mesurées dans le milieu. Dans le cas du Pb et du Cd, les teneurs calciques des milieux ont été prises en compte pour générer les prédictions. La méthode de transplantation a été choisie, car elle a l'avantage, par rapport à l'utilisation d'organismes autochtones, de ne pas être limitée par la présence d'organismes sur le site d'intérêt. De plus, elle limite également l'influence d'un certain nombre de facteurs biotiques sur la bioaccumulation, dans la mesure où elle se base sur l'utilisation d'organismes homogènes par la taille, le sexe et le cycle de reproduction, et qui sont issus d'une seule population, dont l'histoire de vie est connue.

Les résultats de cette étude ont montré que les gammares étaient capables d'accumuler efficacement le Cd, le Ni, le Pb, pour une large gamme de concentrations ; ce qui confirme

leur intérêt pour la biosurveillance des milieux à large échelle. Les résultats ont également montré que la pertinence du gammare était faible dans le suivi de la contamination du Cu, en raison de sa forte capacité à réguler ce métal. Les meilleurs ajustements entre la bioaccumulation observée et prédite ont été attribués au modèle du Cd, avec 71 % de la bioaccumulation prédite dans un facteur 2 de la bioaccumulation observée. Ces résultats montrent le potentiel du modèle du Cd, calibré en laboratoire, à rendre compte de la contamination biodisponible dans les milieux naturels. En revanche, pour le Ni et le Pb, un bon ajustement entre les observations et les prédictions a été enregistré pour seulement 39 % et 48 % des observations, respectivement. De manière générale, les modèles tendent à sous-estimer la bioaccumulation ; ce qui a mis en évidence leurs limites d'utilisation *in situ* et ce qui suggère d'approfondir les connaissances sur l'influence d'autres facteurs confondants, vis-à-vis de la biodisponibilité des métaux, comme par exemple la température et la contribution de la voie trophique.

Mots-clés:

Eau douce, métaux traces, gammares, validation *in situ*, modèle prédictif

Environmental relevance of laboratory-derived kinetic models to predict metal bioaccumulation in gammarids: field experimentation at the national scale (France)

N. Urien,^{a,b} J. D. Lebrun,^{a,b} L.C. Fechner,^{a,b,c} E. Uher,^a A. François,^d H. Quéau,^d M. Coquery,^d A. Chaumot,^d O. Geffard^d

^a Irstea, UR HBAN Hydrosystems and Bioprocesses, 1 rue Pierre-Gilles de Gennes, F-92761 Antony Cedex, France

^b FIRE FR-3020, 4 place Jussieu, 75005 Paris, France

^c AgroParisTech, 19 Avenue du Maine, F-75732 Paris Cedex 15, France

^d Irstea, UR MAEP Freshwater Systems, Ecology and Pollution, F-69626 Villeurbanne Cedex, France

Abstract

Kinetic models have become established tools for describing metal bioaccumulation in aquatic organisms and offer a promising approach for linking water contamination to metal bioaccumulation in biota. Nevertheless, models are based on laboratory-derived kinetic parameters, and the question on their relevance to predict metal bioaccumulation in the field is rarely addressed. In the present study, we propose to assess the capacity of kinetic models of metal bioaccumulation in gammarids to predict metal bioaccumulation in the field at a wide scale. The field validation consisted of measuring dissolved Cu, Pb, Ni and Cd concentrations in the water column at 141 sites in France, running the models with laboratory-derived kinetic parameters, and comparing model predictions and measurements for metal concentrations in gammarids transplanted to the same locations. As the kinetic models of Pb and Cd bioaccumulation were calcium-dependent, calcium concentration was also measured at each sampling site and considered to generate predictions. After a 7d-transplantation period in the field, we observed that gammarids poorly accumulated Cu showing their limited relevance to monitor Cu contamination. In contrast, gammarids significantly accumulate Pb, Cd, and Ni in their tissues which underlined that transplanted gammarids enable time-integrated measures over the exposure period which highlights their suitability as biomonitor species for detecting spatial and temporal trends of Pb, Cd, and Ni contaminations. The best agreements between model predictions and field measurements were observed for Cd (71 % of the field measurements were predicted within a factor of two, respectively), which highlighted the potential for kinetic models to link metal contamination to bioaccumulation in the field. The poorest agreements were observed for

Ni and Pb (39 % and 48 % of the field measurements were predicted within a factor of two, respectively). Overall, model predictions underestimated field measurements in gammarids. These results show that although laboratory-derived kinetic models have the potential to predict metal bioaccumulation in transplanted gammarids, the link between metal concentration in water and in biota remains complex. We suggest that biotic and abiotic parameters likely to influence metal bioavailability and uptake in gammarid species need to be further investigated.

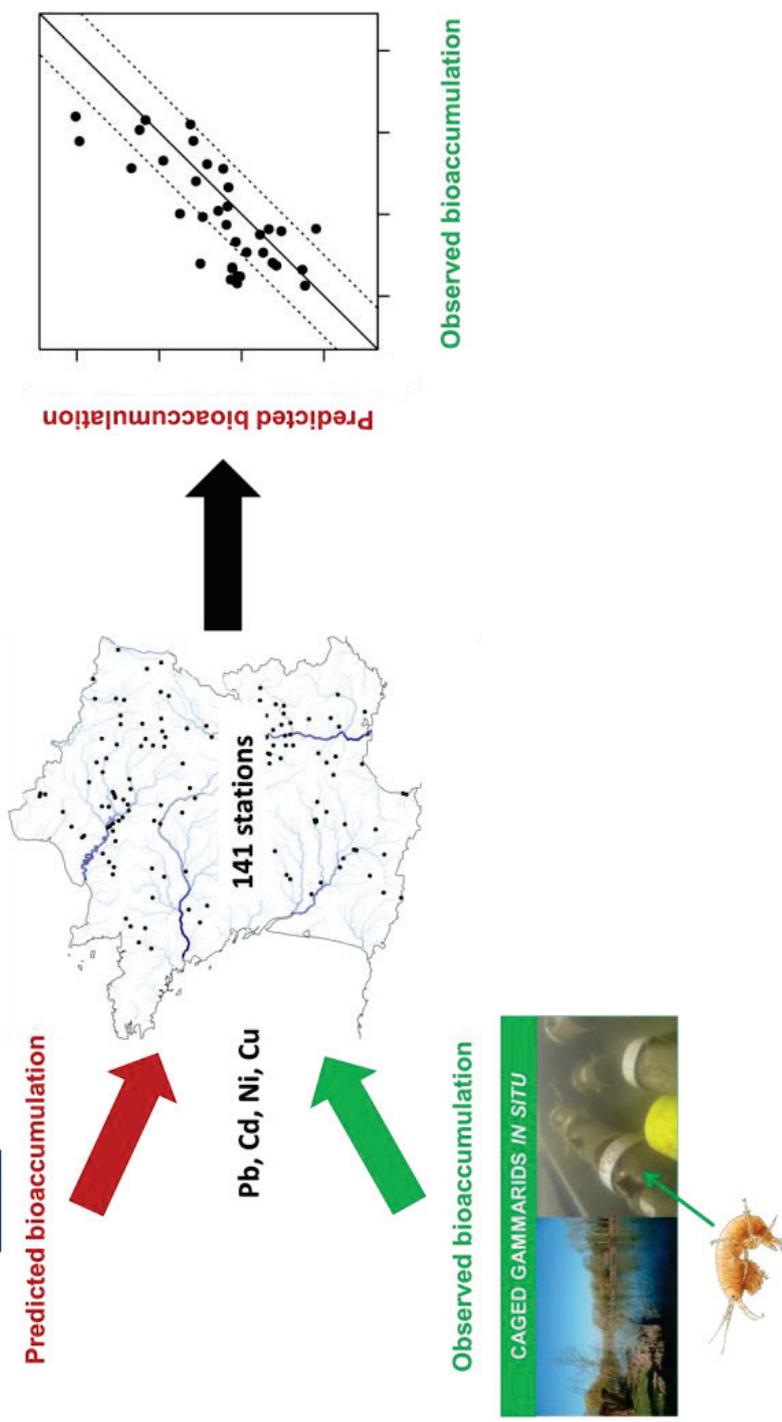
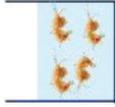
Keywords

Freshwater; trace metal; gammarids; field test; predictive model

Graphical Abstract

MODEL CALIBRATED IN LABORATORY

$$\frac{dC_{org}}{dt} = k_{in} \cdot C_{water} - k_{out} \cdot C_{org}$$



2.1. Introduction

Unlike direct measurements in water column, the determination of metal concentrations in aquatic organisms, or bioaccumulation, enables time-integrated measurements over the exposure period. Moreover, bioaccumulated metal concentrations in aquatic organisms are considered to be directly linked to the bioavailable contamination which is potentially toxic for biota (Rainbow, 1995). However, bioaccumulation depends on the organisms considered, the metal of interest, and the physicochemical water composition likely to influence metal bioavailability (Luoma and Rainbow, 2005). For example, calcium concentrations have often been pointed out as reducing metal bioavailability and bioaccumulation in aquatic organisms because of the competition between calcium and metal for binding to biological sites (Bourgeault et al., 2010; Croteau and Luoma, 2007; Grosell et al., 2006; Urien et al., 2015). This competitive effect is particularly well documented for both Cd and Pb as they act as calcium analogues (partly because of their similar radius with calcium) and have been shown to be preferentially accumulated by animals via calcium channels (Macdonald et al., 2002; Markich et al., 2006; Rainbow et al., 1993; Verbost et al., 1989).

To link metal concentrations in water and bioaccumulation measured in aquatic organisms, kinetic models of trace metal bioaccumulation have been proposed. Among kinetic models, the biodynamic model is the most commonly used to describe bioaccumulation in aquatic organisms. This model considers net bioaccumulation of metal in an organism as the result of a balance between the metal uptake rate from the dissolved and diet phases and the loss rate of metal (Luoma and Rainbow, 2005). During waterborne exposures, uptake and loss rates depend on kinetic parameters, i.e., the uptake and elimination rate constants, which are determined in the laboratory through simple controlled exposures for a range of metal concentrations. For essential metals, such as Cu, a saturation of the metal uptake may occur because of the limited number of biological binding sites. Thus, many studies have reported that bioaccumulation was better described by a saturation model than a biodynamic model, as observed in the amphipod, *Hyallela azteca*, or in the freshwater snail, *Lymnaea stagnali* (Borgmann and Norwood, 1995a; Croteau and Luoma, 2007). Besides, recent studies quantified the effect of major ions found in freshwaters (i.e. calcium, sodium and magnesium) on metal bioaccumulation and integrated it into the kinetic models (Bourgeault et al., 2010; Urien et al., 2015).

More recently, attention has focused on modeling metal bioaccumulation in the freshwater amphipods of gammarid species (Lebrun et al., 2012, 2011; Pellet et al., 2009; Urien et al., 2015) and studies have also shown interest in gammarids species for biomonitoring freshwater metal contamination (e.g., Besse et al., 2013; Fialkowski et al., 2003). Indeed, gammarids are widely present in temperate European freshwaters and are known to significantly accumulate metals, essential or not, at environmental concentrations (Felten et al., 2008; Geffard et al., 2010; Lebrun et al., 2014). Furthermore, in addition to being of

ecological interest for the functioning of aquatic ecosystems because they are strongly involved in leaf litter breakdown processes and play a major role in the food web (Dedourge-Geffard et al., 2013; Zubrod et al., 2015), gammarids are easy to identify, collect and manipulate in the laboratory, and have consequently been widely used as test organisms for ecotoxicological studies (Kunz et al., 2010; Lacaze et al., 2011; Vellinger et al., 2012).

However, although kinetic models of metal bioaccumulation have been successfully developed in gammarid species for Cu, Ni, Cd and Pb in laboratory, the question of their environmental relevance to predict metal bioaccumulation in the freshwaters is rarely assessed. In a previous study, we calibrated, in the laboratory, a kinetic model of Pb bioaccumulation in *Gammarus pulex* and we found that model predictions had a good agreement with field measurements in native gammarids and particularly when calcium concentrations were considered. For other freshwater organisms, studies are also limited. For example, Roditi et al. (2000) tested in the field a biodynamic model of metal bioaccumulation in zebra mussels in three rivers and two lakes. Globally, the authors found a good agreement between predicted Ag, Cr, Hg and Se bioaccumulation and field measurements but Cd bioaccumulation was only accurately predicted in the two lakes. Moreover, regarding the two studies cited above and more generally all the studies that have tested kinetic models in the field (marine, estuary or freshwater species), model validation was based on the use of native organisms. However, this passive approach may limit the number of sampling sites insofar as the acquisition of bioaccumulation data depends on the effective presence of native individuals at the site of interest. Nevertheless, to strengthen the significance of model validation in the field, it is necessary to increase the number of observations and to work in contrasting environments in terms of water chemistry and contamination, which is not necessarily guaranteed when working on a unique watershed. Alternatively, the use of an active approach based on transplanted organisms enables water quality monitoring of sites devoid of native organisms and offers more flexibility to choose sampling sites even at a wide spatial scale. In addition, by using transplanted organisms, the influence of biological factors on metal bioaccumulation will be limited insofar as transplanted organisms are collected from the same reference population and their exposure time and food access is controlled. Finally, the active approach enables a robust inter-site comparison of bioaccumulation data at wide spatial scale (Besse et al., 2012).

The aim of the present study was to assess the environmental relevance of kinetic models of metal bioaccumulation, developed in the laboratory for Cd, Cu, Ni and Pb in gammarids, and to predict metal bioaccumulation in the field, at the national scale (France). The kinetic models we tested arose from the literature and are based on laboratory-determined kinetic parameters including the uptake rate constant (k_{in}) and the elimination rate constant (k_{out}). In the case of Cd and Pb, the affinity constant of calcium for biological binding sites, expressing the inhibitive effect of calcium on metal bioaccumulation, was also included, as for these two metals calcium-dependent kinetic models were proposed in the literature. To

confront model predictions to field measurements, we selected 141 sites, homogeneously spread out in France, where calibrated gammarids were transplanted for 7 days for Cd, Cu, Ni and Pb accumulated metal concentration analysis. The site-specific metal bioaccumulation was predicted considering laboratory-determined kinetic parameters and the dissolved metal concentrations in the water measured at each sampling site as model inputs, and the calcium concentration in the case of Pb and Cd. To our knowledge, this study is the first to undertake model validation in the field with such numerous bioaccumulation data and at such a wide scale.

2.2. Materials and methods

2.2.1. Field data

(i) Collection of test organisms and caging procedure

Adult male *Gammarus fossarum* (average body length of 9 ± 1 mm) from a reference population were collected using a hand-held net at “La Tour du pin” (Bourbre River, France, Figure III-1) known as an unpolluted site. Gammarids were acclimated in the laboratory for 15 days to groundwater mixed with osmosis water at two different final hardness conditions: 112 or 223 mg/L of CaCO₃, depending on the hardness level at the subsequent transplantation site. A 10/14 h light/dark photoperiod was maintained and the temperature was kept at $12 \pm 1^\circ\text{C}$. Organisms were fed *ad libitum* with alder leaves (*Alnus glutinosa*), previously conditioned by immersion in groundwater for 6 days. Freeze-dried Tubifex worms were added as a dietary supplement.

The caging procedure, based on the methodology proposed by Besse et al.(2013), consisted of introducing 20 gammarids in openwork polypropylene cylinders (one cylinder per site, length, 10 cm; diameter, 5.5 cm) closed in their extremities by nets (1-mm mesh). Each cylinder was stored in a rigid plastic case for protection and placed in the streambed, parallel to the direction of water flow and immobilized with natural rocks. Transplanted gammarids were fed *ad libitum* with alder leaves (*Alnus glutinosa*) previously conditioned in groundwater so as to ensure an optimal survival rate. Before and after 7 days of transplantation, either one or three replicates of five gammarids were collected (depending on the need of other outcomes not presented in this study), stored frozen at -80°C , and then freeze-dried just before metal analyses.

(ii) Study sites

In situ transplantation of gammarids was performed in 141 sampling sites in France between 2009 and 2013 (Figure III-1). Sampling sites were chosen in collaboration with the regional public water agencies (<http://sierm.eaurmc.fr/eaux-superficielles>) with the aim of covering a wide range of geographical locations, contamination conditions, and levels of geochemical parameters. As some sites were sampled several times at different dates, the final number of in situ bioaccumulation data for each metal was: 167 for Cd, 142 for Pb and Cu, and 133 for Ni.

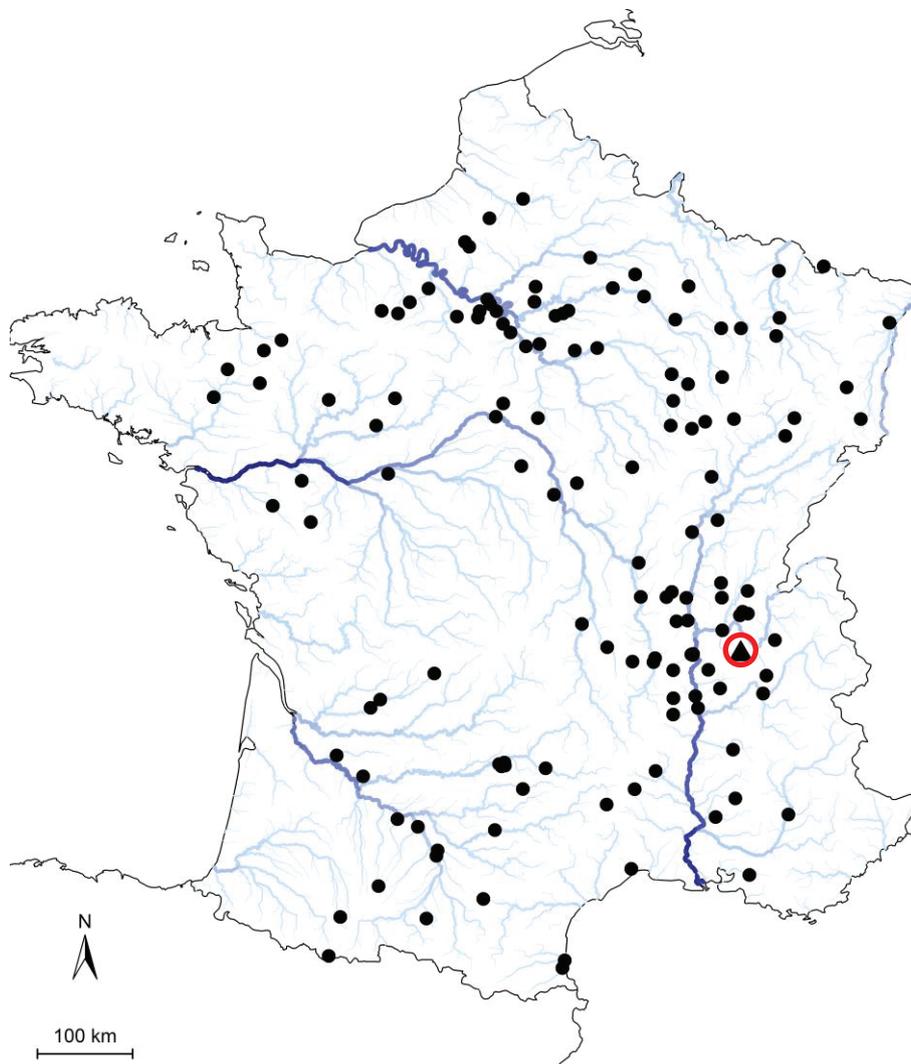


Figure III-1: Location of the 141 sampling sites (France). The location of the reference population used for the transplantation experiment is indicated by the black triangle in the red circle.

(iii) Water sampling and analyses

Water samples, collected at the beginning ($t = 0$) and at the end ($t = 1$) of the transplantation period, were filtered through a 0.45- μm polyethersulfone (PES) syringe filter (Millipore), and then acidified with HNO_3 *sp* at 1 % v/v for dissolved metal concentration analyses by inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS, X series 2, Thermo Fisher Scientific). Analysis conformity was controlled using two certified reference materials (natural water SPS-SW1 and NIST-1640). The reference material results were within the certified 95 % confidence limit range for Cd, Cu, Ni and Pb. Raw water samples, filtered through a 0.45- μm PES syringe filter (Millipore), were also collected to measure the calcium concentrations by chromatographic analysis [Dionex DX120, column IonPac CS16 Dionex No 057573 (4 \times 250 mm)].

(iv) Metal bioaccumulation

Metal concentrations (Cd, Cu, Ni and Pb) in transplanted gammarids were analyzed after digestion with HNO_3 by ICP-MS. Analytical quality control was ensured by routine analyses of two certified reference materials [National Research Council Canada (NRCC) TORT-2, lobster hepatopancreas, and International Atomic Energy Agency IAEA-407, fish].

Sampling site information, *i.e.*, location, transplantation period, calcium and dissolved metal concentrations in water, and metal concentrations in gammarids for Pb, Cd, Ni and Cu are given in Table S III-1 in the supporting information (SI).

2.2.2. *Predictions of waterborne metal bioaccumulation in gammarids*

(i) Kinetic model bioaccumulation for trace metals

According to the kinetic model, bioaccumulation of metal in an organism after a waterborne exposure is given by the following equation:

Eq. 1

$$\frac{dC_{org}(t)}{dt} = k_{in} \cdot C_w - k_{out} \cdot C_{org}$$

where $C_{org}(t)$ is the concentration of metal in the organism ($\mu\text{g/g}$) at time t (d), k_{in} is the uptake rate constant from the dissolved phase (L/g/d), k_{out} is the elimination rate constant (1/d) and C_w is the dissolved metal concentration in the column water ($\mu\text{g/L}$).

After seven days of exposure, to predict bioaccumulation in gammarids we applied the following equation, considering the time exposure:

Eq. 2

$$C_{org}(t_i) = C_{org}(t_{i-1}) \cdot \exp^{-k_{out} \cdot (t_i - t_{i-1})} + \frac{k_{in}}{k_{out}} \cdot C_w \cdot (1 - \exp^{-k_{out} \cdot (t_i - t_{i-1})})$$

where C_w is the dissolved metal concentration between t_{i-1} and t_i ($\mu\text{g/L}$), corresponding to the mean concentration between the dissolved metal concentration measured before the transplantation ($t = 0$) and measured at the end of the transplantation period ($t = 7$). When, both measurements were below the limit of quantification (LoQ, Table S III-2, SI), the mean dissolved metal concentration (C_w) was considered below the LoQ. When, one measurement was below the LoQ and the other measurement was quantified, the mean dissolved metal concentration was calculated by considering the quantified value and the $\text{LoQ}/2$, as recommended by the US EPA (2000).

Considering the characteristics of each metal-specific kinetic model given in the literature for Cd, Cu, Ni and Pb in gammarids, the following equations were used to predict bioaccumulation of metals in the transplanted gammarids between $t = 0$ and $t = 7$:

Metal	Equation
	Eq. 3
Cu ⁽¹⁾	$C_{org}(7) = C_{org}(0) \cdot \exp^{-k_{out} \cdot (7)}$ $+ \frac{k_{in}}{1 + C_w/K} \cdot \frac{C_w}{k_{out}} \cdot (1 - \exp^{-k_{out} \cdot (7)}) + C_{Bk}$
	Eq. 4
Ni ⁽²⁾	$C_{org}(7) = C_{org}(0) \cdot \exp^{-k_{out} \cdot (7)} + k_{in} \cdot \frac{C_w}{k_{out}} \cdot (1 - \exp^{-k_{out} \cdot (7)})$
	Eq. 5
Pb and Cd ^(3,4)	$C_{org}(7) = C_{org}(0) \cdot \exp^{-k_{out} \cdot (7)}$ $+ \frac{k_{in}}{1 + Ca^{2+}/K_{i,Ca}} \cdot \frac{C_w}{k_{out}} \cdot (1 - \exp^{-k_{out} \cdot (7)})$
⁽¹⁾ Lebrun et al. (2012), ⁽²⁾ Lebrun et al. (2011), ⁽³⁾ Urien et al. (2015) and ⁽⁴⁾ Pellet et al. (2009).	

where $C_{org}(0)$ is the initial body metal concentration measured in gammarids before the transplantation (at $t = 0$, $\mu\text{g/g}$) and equal to 0.17, 0.23 and 0.39 $\mu\text{g/g}$ for Cd, Pb and Ni, respectively.

In the case of Cu, a background concentration in gammarids (C_{Bk} , in $\mu\text{g/g}$), assumed to represent the metal bound to the animal, was considered insofar as Cu is an essential metal and background metal is integrally incorporated in essential biochemical components

(Borgmann and Norwood, 1995b). The C_{bk} value is particularly high for essential metal such as Cu and, from the literature it has been found to be equal to $55.6 \pm 7.3 \mu\text{g/g}$ in *G. pulex* (Lebrun et al., 2014). From this statement, $C_{org}(0)$ for Cu was the concentration of Cu above C_{Bk} , i.e., $14.1 \mu\text{g/g}$. Furthermore, a saturation model was used to predict Cu bioaccumulation in gammarids due to a maximal capacity of animals to accumulate the metal. K is the half-saturation constant ($\mu\text{g/L}$) which is defined as the metal concentration in the water at which the metal uptake rate is half of the maximum.

In the case of Pb and Cd, the effect of calcium on metal bioaccumulation was integrated into the kinetic model. Thus, Ca^{2+} is the concentration of calcium measured in the column water (mg/L) and K_{i_Ca} is the half-saturation constant of calcium for binding sites which is defined as the concentration of calcium required to divide by 2 the k_{in} value. The weaker the half-saturation constant, the stronger the effect of calcium on metal uptake.

The kinetic parameters from the literature used to generate model predictions are given in Table III-1.

Table III-1: Parameters k_{in} , k_{out} , K , and K_{i_Ca} from the literature used to predict metal bioaccumulation in the field. Values are given with their 95 % confidence interval (95 % CI) or their standard error (\pm SE).

	k_{in} (L/g/d)	(95% CI) or (\pm SE)	k_{out} (1/d)	(95% CI) or (\pm SE)	K_{i_Ca} (mg/L)	(95% CI)	K (μ g/L)	(\pm SE)	References
Pb	1.38	(1.00 - 1.76)	0.33	(0.28 - 0.38)	60	(18 - 101)	-	-	Urien <i>et al.</i> , 2015
Cd	1.05	(0.95-1.15)	0.032	(0.022 - 0.042)	66.4	(45.2 - 87.6)	-	-	Pellet <i>et al.</i> , 2009
Ni	0.032	(\pm 0.005)	0.126	(\pm 0.052)	-	-	-	-	Lebrun <i>et al.</i> ., 2011
Cu	17.3	(\pm 1.3)	1.17	(\pm 0.15)	-	-	5.9	(\pm 0.4)	Lebrun <i>et al.</i> ., 2010

2.2.3. Model validation

As commonly used in the literature for metals (Landrum et al., 1992; Luoma and Rainbow, 2005), the kinetic model of metal bioaccumulation was assumed to accurately predict bioaccumulation when the predictions were within a two-fold deviation from the observed values.

2.3. Results and discussion

2.3.1. Metal concentrations in water and 7d-transplanted gammarids

Concentrations of Pb, Cd, Ni, and Cu measured in water and gammarids for the first twenty sampling sites are presented in Table III-2. The limits of quantification (LoQ) are detailed in Table S III-2 (SI). All samples are detailed in Table S III-1 (SI).

Table III-2: The dissolved Pb, Cd, Ni, and Cu concentrations ($\mu\text{g/L}$) and the concentrations of calcium in the water (mg/L), as well as the metal concentrations in the 7d-transplanted gammarids ($\mu\text{g/g}$) at the first twenty sampling sites. For all sample details, see supporting information (Table S III-1).

Transplantation information			Dissolved metal concentrations in water ($\mu\text{g/L}$)					Concentrations in transplanted gammarids ($\mu\text{g/g}$)				
code	River	Site	date (dd.mm.yy)	Pb	Cd	Ni	Cu	Pb	Cd	Ni	Cu	Ca^{2+} (mg/L)
1	Doux	Labatie_d_Andaure	30.09.09 - 07.10.09	<LoQ	0.083	0.21	0.49	<LoQ	0.83	0.53	69.1	4
2	Cance	St_Julien_Vocance	30.09.09 - 07.10.09	<LoQ	0.050	0.42	0.56	0.40	0.33	1.27	82.7	40
3	Gier	La_Valla_en_gier	30.09.09 - 07.10.09	<LoQ	0.063	0.37	0.45	0.30	1.27	0.43	72.1	5
4	Ain	St_Maurice_de_Gourdans	30.09.09 - 07.10.09	<LoQ	<LoQ	0.91	0.58	0.22	0.18	0.60	72.7	61
5	Albarine	Chaley	30.09.09 - 07.10.09	<LoQ	<LoQ	0.87	0.41	0.16	0.15	0.68	52.1	73
6	Mandorne	Oncieux	30.09.09 - 07.10.09	<LoQ	<LoQ	0.76	0.25	0.14	0.15	0.33	50.7	58
7	Vareze	Cours_et_Buis	01.10.09 - 08.10.09	<LoQ	<LoQ	0.80	0.20	0.14	0.18	0.27	51.0	67
8	Galaveyson	St_Clair_sur_Galaure	01.10.09 - 08.10.09	<LoQ	<LoQ	0.83	0.30	0.43	0.23	<LoQ	74.8	64
10	Guiers_Mort	St_Laurent_du_Pont	01.10.09 - 08.10.09	<LoQ	<LoQ	0.61	0.32	0.27	0.22	0.49	71.3	63
11	Ardieres	Les_ardillats	02.10.09 - 09.10.09	0.251	0.200	0.29	0.86	0.46	0.63	0.35	66.9	12
12	Egues	Poule_les_Echarmeaux	02.10.09 - 09.10.09	0.226	0.011	0.34	0.89	0.85	0.20	0.45	63.8	15
13	Doux	Saint_Jean_de_Muzols	30.09.09 - 07.10.09	0.193	<LoQ	0.27	2.32	<LoQ	0.45	0.48	75.7	11
14	Cance	Sarras	30.09.09 - 07.10.09	0.486	0.066	4.10	5.41	0.40	0.33	1.27	82.7	40
15	Albarine	Saint_Rambert	30.09.09 - 07.10.09	0.072	<LoQ	0.60	0.67	0.28	0.22	0.37	85.3	56
16	Veyre	Lent	30.09.09 - 07.10.09	<LoQ	<LoQ	0.60	0.19	0.20	0.19	0.37	75.8	89
18	Ange	Brion	30.09.09 - 07.10.09	0.118	0.021	1.33	1.78	0.17	0.15	0.59	74.7	82
19	Drac	Fontaine	01.10.09 - 08.10.09	0.080	0.011	0.65	0.42	0.28	0.28	0.89	71.4	49
21	Azergues	Legny	01.10.09 - 08.10.09	0.150	0.014	0.50	1.22	0.82	0.30	<LoQ	73.8	40
22	Azergues	Lucenay	01.10.09 - 08.10.09	0.281	0.105	1.26	3.62	0.89	0.92	<LoQ	79.6	83
23	Gier	Givors	02.10.09 - 09.10.09	0.238	0.038	3.23	3.10	0.95	0.22	1.01	82.7	50

LoQ means the concentration was below the limit of quantification (detailed LoQ are given in Table S III-2).

In the water column, Cu was detected (>LoQ) for 99.7 % of the sampling sites (141/142 sites), Pb for 63 % (89/142 sites), Ni for 59 % (78/133 sites), and Cd for 55 % (92/167 sites). By contrast, metal concentrations in transplanted *G. fossarum* were detected for 100 % of the sites for Cu, 98 % for Pb, 84 % for Ni and 100 % for Cd. The significant portion of sites where dissolved metal concentrations in the column water were not detected (except for Cu) indicates the difficulty of measuring metals directly in grab water samples and consequently to accurately monitor water quality over time. On the contrary, gammarids concentrate metals in their tissue on a relatively short exposure period, which facilitates measurements for trace metal. The results are in accordance with the growing body of literature encouraging the use of time-integrated matrices, such as biota, for monitoring chemical contamination in freshwaters (Andral et al., 2004; Besse et al., 2012; Rainbow, 2002).

Considering dissolved metal concentrations above the LoQ, we observed that metal contamination in the column water ranged from 0.12 to 7.07 µg/L for Cu, from 0.06 to 2.11 µg/L for Pb, from 0.21 to 10.96 µg/L for Ni, i.e., variations of more than one order of magnitude, and from 0.01 to 6.87 µg/L for Cd, i.e., a variation of more than two orders of magnitude. Concerning the 7d-transplanted *G. fossarum*, metal concentrations ranged from 41.3 to 92.7 µg/g for Cu, from 0.17 to 7.43 µg/g for Pb, from 0.27 to 4.42 µg/g for Ni and from 0.07 to 15.84 µg/g for Cd. By calculating the ratio maximal concentration in gammarids/minimal concentration in gammarids, we observed that transplanted gammarids accumulated metal by more than a factor of 200, 40, 15 and 2 for Cd, Pb, Ni and Cu, respectively. These results show the high abilities of gammarids to accumulate Cd, Pb and Ni for a wide range of dissolved concentrations which support their use as biomonitors for these metals in freshwaters. Nevertheless, in comparison with other freshwater macroinvertebrates, such as the bivalve *Dreissena polymorpha*, studies using gammarids for freshwater quality monitoring are scarce. Recently, Urien et al. (2015) and Lebrun et al. (2014) used native *G. pulex* to monitor trends of metal contamination in the Seine watershed (France). Some studies used also transplanted gammarids to monitor water quality but these studies did not involve a high number of sampling sites in comparison to the present study (27 sites in Besse et al., 2013; 4 sites in Khan et al., 2012; 3 sites in Lebrun et al., 2015). Concerning Cu, results showed that *G. fossarum* was less efficient to accumulate this metal limiting thus its use to monitor this specific metal in the field. These results are in agreement with other studies conducted with gammarids in the laboratory and in the field that reported the abilities of gammarids to regulate their internal Cu concentrations (Besse et al., 2013; Dedourge-Geffard et al., 2009; Lebrun et al., 2012). Indeed, Cu is an essential metal, known to be involved in numerous physiological functions in aquatic organisms and thus regulated to maintain concentrations for their physiological needs (Ahearn et al., 2004; Atli and Canli, 2011; Rainbow, 2002; Taylor and Anstiss, 1999).

2.3.2. Kinetic model performances for predicting metal bioaccumulation in the field

Metal concentrations in transplanted gammarids were predicted with the Eq. 4 and Eq. 5 using kinetic parameters from the literature (k_{in} , k_{out} and K_{i_Ca} , see Table III-1) coupled with site-specific geochemical measurements (dissolved metal concentration (C_w), and calcium concentrations (Ca^{2+}) in the case of Pb and Cd). The specific case of Cu was not exploited as gammarids have previously been shown to be poor indicator for Cu contamination. Model predictions were generated at the sites where the metals in water were detected, *i.e.* dissolved metal concentrations above the LoQ. From that statement, the model validation in the field was based on 72 for Ni, 87 for Pb and 93 for Cd, which is a large dataset compared to previous biomonitoring studies concerning metals and gammarids (a maximum of 27 sites was recorded in the study of Besse et al. (2013)). Detailed data of model predictions and field measurements of metal concentration in transplanted gammarids are given in supporting information (Table S III-3 for Cd, Table S III-4 for Ni and Table S III-5 for Pb).

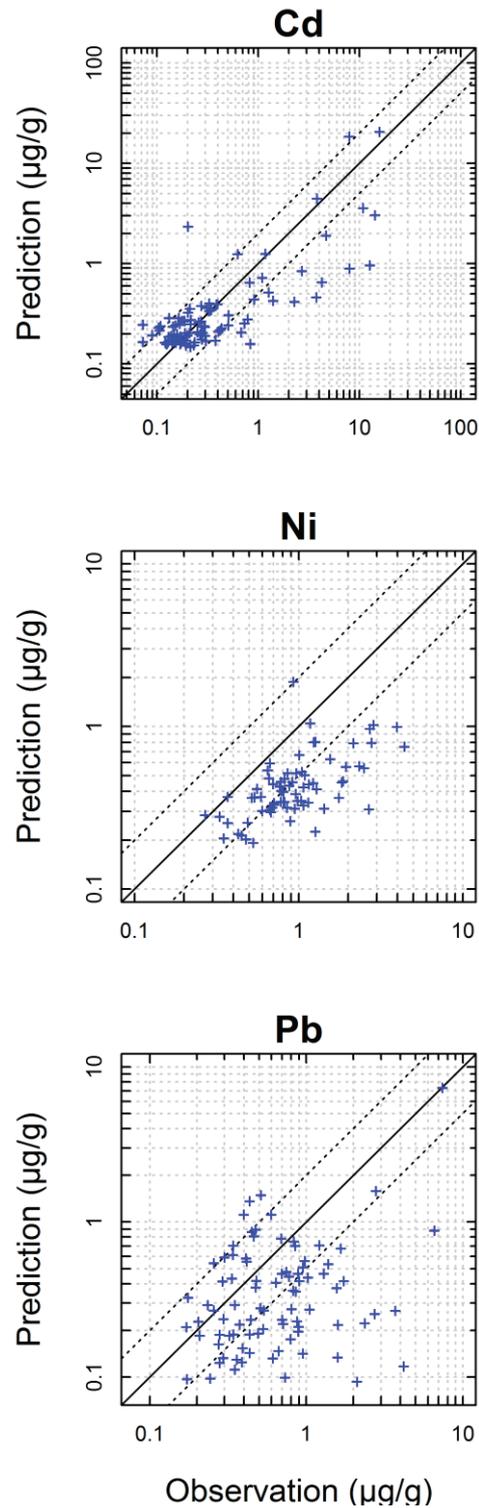


Figure III-2: Predictions of Cd, Ni, and Pb bioaccumulation by the kinetic model (Eq. 4 for Ni and Eq. 5 for Cd and Pb) versus field measurements of Cd, Ni, and Pb concentrations in the 7d-transplanted gammarids. The black line represents the theoretical perfect model fit (1:1 relationship) and the dashed lines represent error within a factor of 2. Concentrations are expressed in $\mu\text{g/g}$ dry weight.

Among the three metals presented Figure III-2, the best agreement between model predictions and field measurements was observed for Cd, with 71 % (66/93) of the bioaccumulation accurately predicted, i.e., prediction within a factor of two of the field measurement. 19.3 % (18/93) of the bioaccumulation was under-estimated and 9.7 % (9/93) was overestimated. The kinetic model developed for Cd in *G. pulex* was considered good because, in addition to its 71 % accuracy, it was able to predict the bioaccumulation in a range of concentrations of two orders of magnitude (from 0.07 µg/g to 15.8 µg/g). These results show that the laboratory-derived kinetic parameters used to predict Cd bioaccumulation in gammarids were tenable in environmental conditions. In contrast, the kinetic model poorly predicted Ni and Pb bioaccumulation in the field. Indeed, model predictions for Ni and Pb matched field measurements in only 39 % (28/72) and 48 % (42/87) of the cases, respectively. For Ni, 60 % of the field measurements were under-estimated by the kinetic model. For Pb, 46 % of the field measurements were under-predicted and 6% were over-predicted by the kinetic model. These last results indicate that kinetic models of Ni and Pb bioaccumulation in gammarids, developed in the laboratory, are not relevant in their present form to predict bioaccumulation in the field.

Globally, the two kinetic models developed in gammarids for Pb, Ni and to a lesser extent the model developed for Cd under-estimated metal bioaccumulation. In the light of this result, two hypotheses, probably compatible, can be developed: (i) bioaccumulation processes description is incomplete suggesting the contribution of another source of bioavailable contamination, such as the trophic route, (ii) laboratory-derived kinetic parameters (k_{in} and k_{out}) incorrectly describe bioaccumulation processes because in environmental conditions, further biotic and/or abiotic factors might affect metal bioavailability and thus k_{in} and/or k_{out} .

(i) Trophic route hypothesis

First, the contribution of the trophic route in the contamination of transplanted gammarids seems tenable insofar as transplanted gammarids could feed *ad libitum* during the exposure period (so as to limit mortality). Nevertheless, transplanted gammarids were supplied with leaves initially conditioned in groundwater in the laboratory and free of metal contamination, but it is possible that during transplantation, the leaves were contaminated with metals from the water column and then passed on to gammarids feeding on them. In the literature, an increasing number of studies have found that the diet route can be a key component in metal bioaccumulation, and needs to be integrated into bioaccumulation models (Kalman et al., 2010; Luoma and Rainbow, 2005). Nonetheless, the contribution of the trophic route in metal bioaccumulation is not univocal. For example, according to Borgmann et al. (2007), among 27 metals tested, the contribution of food to metal bioaccumulation in the amphipod *H. azteca* after 17 days of transplantation in two rivers was only significant for Cd, Cu and Se, but despite that, water was still a major source for

these three metals as well. In the laboratory, Xu and Pascoe (1994) showed that *G. pulex* accumulated most Zn from water rather than from its food. However, Pellet et al. (2014) reported that the contribution of the trophic route significantly contributes to the uptake of Cd in *G. pulex* fed with alder leaves in the laboratory (66–95 %). More generally, studies about the contribution of the diet route in metal bioaccumulation in amphipods are scarce and to our knowledge, the dietborne uptake of Ni, Pb or Cu in gammarids is not documented and needs to be tested. Besides, it is also suggested to repeat the *in situ* transplantation of gammarids but without feeding organisms during the exposure period.

(ii) *Environmental factors hypothesis*

A second hypothesis was to consider that kinetic parameters, determined in the laboratory and used to generate predictions, are not tenable under environmental conditions. Indeed, in contrast to the laboratory, where water chemistry is controlled, thus limiting thus metal bioavailability issues, in natural freshwaters, the physicochemical composition varies from one site to another and may influence site-specific metal bioavailability and uptake rate of metals. Among these physicochemical parameters, other ions (apart from calcium) may influence metal bioaccumulation. For example, it has been shown that the ions H^+ may compete with metals for entering organisms and consequently inhibit metal bioaccumulation, as observed between H^+ and Cd in the insect *Chaoborus* and between H^+ and Cd and Ni in *Daphnia magna* (Croteau and Luoma, 2007; Komjarova and Blust, 2009). Concerning Pb, in zebra fish, the lowest uptakes were observed at acidic pH compared to neutral conditions (Komjarova and Blust, 2009). Otherwise, it has been reported that temperature may change organism physiology, which may lead to the modulation of their abilities to accumulate and/or eliminate metals. Indeed, in the laboratory, it has been reported that an increase of temperature emphasized Cd bioaccumulation in the freshwater isopod *Asellus aquaticus* and the midge larvae *Chironomus riparius* (Bervoets et al., 1996; Van Hattum et al., 1993). Similar results have been observed for Cd in *G. pulex* after an 8°C-increased temperature, although the effect on Cd bioaccumulation was negligible compared to the significant effect of Ca^{2+} on Cd uptake (Pellet et al., 2009). Fialkowski et al. (2003a, 2003b) observed a higher metabolic activity in *G. fossarum* and in three talitrid amphipods during warm seasons compared to cold seasons, leading to higher metal uptake (Cd, Cu, Fe, Mn, Ni, Pb and Zn). Similarly, Lebrun et al. (2015) reported a temperature effect on Cu and Ni bioaccumulation in *G. pulex* and *G. fossarum*, transplanted along a river axis at four seasons. On the contrary, Besse et al. (2013) did not observe any influence of temperature on metal bioaccumulation in transplanted *G. fossarum* for a range of temperature from 8.6°C to 19.7°C. According to the authors, an explanation could be that temperatures remain in the tolerance range for *G. fossarum*, which range from 0°C to 25°C, with an optimum value of 12°C (Wijnhoven et al., 2003). In our study, however, since the *in situ* experimentation took place over more than one year, at some sites, gammarids might be

exposed to extreme temperatures, affecting their bioaccumulation abilities. More generally, the fact that such influencing factors in metal uptakes may occur at low metal concentrations increases the need to further investigate their effect on bioaccumulation processes and particularly on kinetic parameters (k_{in} and k_{out}) in gammarids.

In the present study, the kinetic models used to predict bioaccumulation were calibrated in the laboratory on *G. pulex*, whereas bioaccumulation data in the field were obtained from one population of *G. fossarum*. Although the two species, *G. pulex* and *G. fossarum*, are considered as closely related, the degree to which their uptake and loss rates of metals may differ from one to another is nowadays not documented. In a recent study, Lebrun et al. (2015) showed that *G. pulex* and *G. fossarum*, coming from different watersheds and transplanted for a week at three sites along a river axis had similar abilities to internalize Ag, Co, Cu, Mn, Pb and Zn. Nonetheless, in order to refine the link between metal contamination in the water and in gammarids, the uncertainties linked to the use of different reference population should be investigated.

2.4. Conclusion

The findings of the present study showed the high abilities of transplanted gammarids to concentrate contaminants in their tissues at low exposures (except for Cu) highlighting their suitability to monitor spatial trends of metal contamination in freshwaters. The best agreements between model predictions and field measurements for metal concentrations in transplanted gammarids were observed for Cd (71 % of good prediction) indicating their relative environmental relevance to report spatial variation of metal bioavailability among sites. The poorest agreements were observed for Ni and Pb (39 % and 48 % of good prediction) highlighting that these laboratory-derived kinetic models are not tenable under environmental conditions in their present form. Globally, we observed that field measurements were under-predicted by the kinetic models (Ni, Pb and to a lesser extent Cd). Therefore, to improve model predictions, kinetic models need to be further adjusted, particularly by further assessing the influence of physicochemical parameters on metal uptake or/and the relative contribution of the trophic route in metal bioaccumulation, which should be then integrated into the kinetic model.

Acknowledgements

The authors thank the Onema (the French National Agency for Water and Aquatic Ecosystems), the Water Agency Seine Normandie and the Piren-Seine program for its financial support. We sincerely thank Jean-Philippe Besse for his involvement in this work. We are grateful to the people who assisted with the sampling campaigns and chemical

analyses, particularly Josiane Gahou. We would like to thank Sophie Ayrault for providing access to the ICP-MS platform at LSCE (joint research unit 8212 CEA-CNRS-UVSQ).

2.5. Supporting information (SI)

Sampling sites information: Location, transplantation period, dissolved metal concentrations and calcium concentrations in water, and metal concentrations in gammarids for Pb, Cd, Ni, and Cu, performed at a national scale (France) (Table S III-1). Limit of quantifications (Table S III-2). Model predictions and field measurements of metal concentration in transplanted gammarids for Cd (Table S III-3), Ni (Table S III-4), and Pb (Table S III-5).

Table S III-1: Code, name of the river, name of the site, date of transplantation, dissolved metal concentrations ($\mu\text{g/L}$) and calcium concentrations in water (mg/L), and metal concentrations in the 7d-transplanted gammarids ($\mu\text{g/g}$) of all the sampling site in France (total number of sites = 141, one code per site). The data annotated with ⁽¹⁾ come from Lacaze et al. (2011).

Transplantation information				Dissolved metal concentrations in water ($\mu\text{g/L}$)							Concentrations in transplanted gammarids ($\mu\text{g/g}$)						
code	River	Site	date (dd.mm.yy)	Pb	Cd	Ni	Cu	Pb	Cd	Ni	Cu	Ca ²⁺ (mg/L)	Pb	Cd	Ni	Cu	Ca ²⁺ (mg/L)
1	Doux	Labatie_d_Andaure	30.09.09 - 07.10.09	<LoQ	0.083	0.214	0.49	<LoQ	0.828	0.532	69.1	4	<LoQ	0.828	0.532	69.1	4
2	Cance	St_Julien_Vocance	30.09.09 - 07.10.09	<LoQ	0.050	0.416	0.56	0.401	0.329	1.274	82.7	40	0.401	0.329	1.274	82.7	40
3	Gier	La_Valla_en_gier	30.09.09 - 07.10.09	<LoQ	0.063	0.366	0.45	0.305	1.274	0.431	72.1	5	0.305	1.274	0.431	72.1	5
4	Ain	St_Maurice_de_Gourdans	30.09.09 - 07.10.09	<LoQ	<LoQ	0.911	0.58	0.221	0.184	0.600	72.7	61	0.221	0.184	0.600	72.7	61
5	Albarine	Chaley	30.09.09 - 07.10.09	<LoQ	<LoQ	0.866	0.41	0.164	0.865	0.685	52.1	73	0.164	0.152	0.685	52.1	73
6	Mandorne	Oncieux	30.09.09 - 07.10.09	<LoQ	<LoQ	0.763	0.25	0.141	0.154	0.331	50.7	58	0.141	0.154	0.331	50.7	58
7	Vareze	Cours_et_Buis	01.10.09 - 08.10.09	<LoQ	<LoQ	0.798	0.20	0.144	0.175	0.267	51.0	67	0.144	0.175	0.267	51.0	67
8	Galaveyson	St_Claire_sur_Galaveyson	01.10.09 - 08.10.09	<LoQ	<LoQ	0.826	0.30	0.433	0.227	0.494	74.8	64	0.433	0.227	0.494	74.8	64
10	Guiers_Mort	St_Laurent_du_Pont	01.10.09 - 08.10.09	<LoQ	<LoQ	0.615	0.32	0.272	0.217	0.631	71.3	63	0.272	0.217	0.631	71.3	63
11	Ardieres	Les_ardillats	02.10.09 - 09.10.09	0.251	0.200	0.286	0.86	0.464	0.631	0.351	68.9	12	0.464	0.631	0.351	68.9	12
12	Egues	Poule_les_Echarmeaux	02.10.09 - 09.10.09	0.226	0.011	0.339	0.89	0.850	0.200	0.453	63.8	15	0.850	0.200	0.453	63.8	15
13	Doux	Saint_Jean_de_Muzols	30.09.09 - 07.10.09	0.193	<LoQ	0.270	2.32	0.479	0.451	0.479	75.7	11	0.479	0.451	0.479	75.7	11
14	Cance	Sarras	30.09.09 - 07.10.09	0.486	0.066	4.102	5.41	0.401	0.329	1.274	82.7	40	0.401	0.329	1.274	82.7	40
15	Albarine	Saint_Rambert	30.09.09 - 07.10.09	0.072	<LoQ	0.599	0.67	0.276	0.215	0.373	85.3	56	0.276	0.215	0.373	85.3	56
16	Veyre	Lent	30.09.09 - 07.10.09	0.118	<LoQ	0.597	0.19	0.200	0.186	0.370	75.8	89	0.200	0.186	0.370	75.8	89
18	Ange	Briou	30.09.09 - 07.10.09	0.118	0.021	1.334	1.78	0.172	0.147	0.594	74.7	82	0.172	0.147	0.594	74.7	82
19	Drac	Fontaine	01.10.09 - 08.10.09	0.080	0.011	0.649	0.42	0.281	0.279	0.885	71.4	49	0.281	0.279	0.885	71.4	49
21	Azergues	Legny	01.10.09 - 08.10.09	0.150	0.014	0.499	1.22	0.825	0.300	<LoQ	73.8	40	0.825	0.300	<LoQ	73.8	40
22	Azergues	Lucenay	01.10.09 - 08.10.09	0.281	0.105	1.255	3.62	0.888	0.915	<LoQ	79.6	83	0.888	0.915	<LoQ	79.6	83
23	Gier	Givors	02.10.09 - 09.10.09	0.238	0.038	3.228	3.10	0.952	0.217	1.012	82.7	50	0.952	0.217	1.012	82.7	50
24	Rhone	Chasse_sur_Rhone	02.10.09 - 09.10.09	0.119	0.012	1.003	0.94	0.297	0.147	0.691	55.4	65	0.297	0.147	0.691	55.4	65
28	Boralde	Faujaguese	14.05.12 - 21.05.12	<LoQ	<LoQ	<LoQ	0.35	0.416	0.373	0.747	72.4	5	0.416	0.373	0.747	72.4	5
29	Garonne	Rodez	14.05.12 - 21.05.12	<LoQ	<LoQ	1.175	0.88	0.866	0.157	0.778	69.2	61	0.866	0.157	0.778	69.2	61
30	Aveyron	Aval_de_Toulouse	15.05.12 - 22.05.12	0.068	<LoQ	<LoQ	0.50	0.895	0.313	0.966	68.2	21	0.895	0.313	0.966	68.2	21
32	Hers_mort	Saint_Sauveur	15.05.12 - 22.05.12	0.349	0.037	1.685	1.28	0.982	0.109	0.772	68.1	86	0.982	0.109	0.772	68.1	86
33	Isle	Razac	15.05.12 - 22.05.12	0.111	<LoQ	1.310	0.87	0.445	0.134	0.541	64.4	58	0.445	0.134	0.541	64.4	58
34	Rhone	Chasse_sur_Rhone	31.05.12 - 07.06.12	0.071	<LoQ	<LoQ	0.92	0.393	0.111	0.765	67.1	62	0.393	0.111	0.765	67.1	62
35	Giers	Givors	31.05.12 - 07.06.12	0.133	0.028	1.665	2.26	0.478	0.178	1.070	61.6	24	0.478	0.178	1.070	61.6	24
37	Furan	Andrieux_Bouthéon	31.05.12 - 07.06.12	0.301	0.056	3.995	2.06	1.668	0.212	2.162	65.7	44	1.668	0.212	2.162	65.7	44
38	Loire	Bas_en_Basset	31.05.12 - 07.06.12	0.159	0.011	<LoQ	1.45	0.257	0.266	0.543	73.9	9	0.257	0.266	0.543	73.9	9
40	Drac	Fontaine	01.06.12 - 08.06.12	<LoQ	<LoQ	<LoQ	0.40	0.549	0.228	1.185	74.3	40	0.549	0.228	1.185	74.3	40
41	Tillet	Aix_les_Bains	01.06.12 - 08.06.12	0.121	<LoQ	<LoQ	1.21	0.715	0.077	0.712	64.0	78	0.715	0.077	0.712	64.0	78
42	Auvezeret	Segur_le_chateau	19.06.12 - 26.06.12	0.129	<LoQ	<LoQ	0.87	0.336	0.215	0.724	64.8	11	0.336	0.215	0.724	64.8	11
43	Colinet	Cezac	19.06.12 - 26.06.12	0.062	<LoQ	1.140	3.12	0.708	0.156	0.708	62.6	77	0.708	0.156	0.708	62.6	77
44	Dropt	Loubens	19.06.12 - 26.06.12	<LoQ	<LoQ	1.035	1.11	0.275	0.088	<LoQ	74.8	90	0.275	0.088	<LoQ	74.8	90
45	Tolzac	Vares	20.06.12 - 27.06.12	<LoQ	<LoQ	1.150	0.90	1.029	0.109	1.155	57.2	110	1.029	0.109	1.155	57.2	110
46	Arrats	St_Antoine	20.06.12 - 27.06.12	<LoQ	<LoQ	0.965	0.89	0.458	0.104	0.952	57.3	95	0.458	0.104	0.952	57.3	95
47	Gimone	Lafitte	20.06.12 - 27.06.12	<LoQ	<LoQ	<LoQ	0.90	0.410	0.166	0.886	67.7	89	0.410	0.166	0.886	67.7	89
48	Tarn	Albi	10.07.12 - 17.07.12	0.117	<LoQ	<LoQ	0.74	0.537	0.161	<LoQ	61.4	47	0.537	0.161	<LoQ	61.4	47
49	Montbrun	Montbrun_Bocage	10.07.12 - 17.07.12	0.057	<LoQ	<LoQ	0.91	0.281	0.128	0.898	78.2	67	0.281	0.128	0.898	78.2	67
50	Bergon	Reans	11.07.12 - 18.07.12	<LoQ	<LoQ	<LoQ	0.80	0.222	0.133	<LoQ	65.1	75	0.222	0.133	<LoQ	65.1	75
51	Luzou	Begaar	11.07.12 - 18.07.12	0.094	0.017	<LoQ	0.41	0.176	0.104	0.599	68.6	10	0.176	0.104	0.599	68.6	10

Transplantation information			Dissolved metal concentrations in water (µg/L)						Concentrations in transplanted gammarids (µg/g)					
code	River	Site	date (dd.mm.yy)	Pb	Cd	Ni	Cu	Pb	Cd	Ni	Cu	Ca ²⁺ (mg/L)		
52	Gave_de_Pau	Abidos	11.07.12 - 18.07.12	0.098	0.015	<LoQ	0.45	0.703	0.277	0.659	74.1	44		
53	Gave_de_Pau	Rhieules	11.07.12 - 18.07.12	0.101	0.033	<LoQ	0.31	3.724	0.791	1.783	74.1	33		
54	Gave_de_Pau	Gavarrie	11.07.12 - 18.07.12	<LoQ	<LoQ	<LoQ	<LoQ	1.098	0.302	1.159	66.9	28		
55	Trebroul	Castelnaudary	21.07.12 - 19.07.12	0.460	<LoQ	1.540	1.18	1.212	0.074	0.793	78.8	91		
56	Ouche	Crimolois	25.07.12 - 02.08.12	0.085	<LoQ	<LoQ	1.09	0.951	0.195	0.628	71.9	101		
57	Trinquelin	St_Leger_Vauban	25.07.12 - 02.08.12	0.320	0.014	<LoQ	0.92	0.559	0.425	<LoQ	63.9	6		
58	Nievre	Dompierre_sur_Nievre	25.07.12 - 02.08.12	<LoQ	<LoQ	1.195	0.20	0.656	0.196	0.993	69.7	8		
59	Layon	Ivoy_le_Pre	25.07.12 - 02.08.12	<LoQ	<LoQ	<LoQ	0.12	0.486	0.315	1.448	60.0	7		
60	Vauvaise	Jussy_le_Chaudrier	25.07.12 - 02.08.12	<LoQ	<LoQ	<LoQ	0.36	0.522	0.147	0.696	63.3	100		
61	Bourbince	Vitry_en_Charolais	26.07.12 - 03.08.12	0.070	0.015	1.165	0.93	0.795	0.090	0.812	73.8	43		
62	Loire	Briennon	26.07.12 - 03.08.12	0.255	0.016	1.080	1.77	0.833	0.107	0.715	69.8	19		
63	Ardieres	St_Jean	10.08.12 - 17.08.12	0.568	0.035	<LoQ	7.07	2.796	0.512	1.482	92.1	22		
64	Corne	St_Remy	10.08.12 - 17.08.12	0.249	<LoQ	1.430	1.42	0.860	0.121	0.960	81.8	108		
65	Guyotte	St_Bonnet_en_Bresse	10.08.12 - 17.08.12	0.063	<LoQ	1.510	0.34	0.295	0.160	0.810	74.2	69		
66	Reyssouze	Viriat	10.08.12 - 17.08.12	0.468	<LoQ	1.325	2.10	0.693	0.071	0.371	72.0	79		
67	Mare	Gumieres	09.08.12 - 16.08.12	0.224	0.016	<LoQ	0.45	<LoQ	0.297	<LoQ	55.8	3		
68	Dore	Ollergues	09.08.12 - 16.08.12	0.203	0.013	<LoQ	2.53	0.342	0.406	<LoQ	85.6	7		
69	Bedat	St_Laure	09.08.12 - 16.08.12	0.172	0.027	1.605	1.53	0.482	0.073	0.561	92.7	38		
70	Seine	Poissy	28.08.12 - 04.08.12	0.174	0.014	1.300	1.33	0.808	0.143	0.523	79.1	96		
71	Iton	Normanville	28.08.12 - 04.08.12	0.059	<LoQ	<LoQ	1.70	0.351	0.223	0.532	78.5	89		
72	Risle	Ambenay	28.08.12 - 04.08.12	0.118	0.045	<LoQ	4.06	0.492	0.734	0.722	86.9	98		
73	Ru_d_ancuoell	Moisenay	29.08.12 - 05.08.12	<LoQ	0.010	1.540	1.51	0.401	0.232	<LoQ	73.7	151		
74	Seine	St_Fargeau_Ponthierry	29.08.12 - 05.08.12	0.154	<LoQ	<LoQ	0.82	0.512	0.191	<LoQ	81.7	76		
75	Oussance	Ingrannes	29.08.12 - 05.08.12	<LoQ	<LoQ	<LoQ	0.28	0.238	0.164	<LoQ	74.0	74		
76	Loire	Jargeau	29.08.12 - 05.08.12	<LoQ	<LoQ	<LoQ	5.02	0.314	0.240	0.896	88.1	29		
77	Les_Evoissons	Bergicourt	10.09.12 - 17.09.12	<LoQ	<LoQ	<LoQ	0.24	0.310	0.149	<LoQ	70.3	128		
78	Ancre	Bonnay	10.09.12 - 17.09.12	<LoQ	<LoQ	<LoQ	0.40	0.461	0.104	0.595	66.9	130		
79	Vesle	Chassenay	10.09.12 - 17.09.12	0.144	0.014	2.260	1.29	0.436	0.142	0.861	72.2	136		
80	Marne	Reuil	11.09.12 - 18.09.12	0.066	<LoQ	<LoQ	0.54	0.436	0.142	0.861	72.2	63		
81	Marne	Matougues	11.09.12 - 18.09.12	<LoQ	<LoQ	<LoQ	0.37	0.450	0.326	0.587	84.9	58		
82	Chee	Merlaut	11.09.12 - 18.09.12	<LoQ	<LoQ	<LoQ	0.41	0.147	0.226	<LoQ	81.8	113		
83	Roanne	St_Benoit_en_Diois	18.09.12 - 25.09.12	0.086	<LoQ	<LoQ	1.40	0.344	0.146	2.158	80.7	57		
84	Toulourenc	St_Leger_du_Ventoux	18.09.12 - 25.09.12	<LoQ	<LoQ	<LoQ	0.29	0.467	0.089	2.381	75.9	62		
85	Durance	Mees	18.09.12 - 25.09.12	<LoQ	<LoQ	<LoQ	0.32	0.216	0.170	1.714	60.7	60		
86	Luynes	Aix_en_Provence	18.09.12 - 25.09.12	0.267	0.021	0.925	4.54	0.643	0.138	0.674	86.0	97		
87	Auzon	Monteux	18.09.12 - 25.09.12	0.177	<LoQ	1.600	1.73	2.371	0.121	1.288	88.6	139		
89	Tarnon	Rousses	19.09.12 - 26.09.12	<LoQ	0.012	<LoQ	0.33	0.316	0.683	<LoQ	64.3	5		
90	Luech	Genolhac	19.09.12 - 26.09.12	2.111	0.097	<LoQ	1.11	7.427	1.098	0.739	72.3	5		
91	Beaumes	Rosieres	19.09.12 - 26.09.12	0.135	0.013	<LoQ	0.80	1.296	0.686	0.772	77.2	9		
92	Meholle	Void	19.11.12 - 26.11.12	<LoQ	<LoQ	1.000	0.40	0.344	0.273	0.851	69.7	107		
93	Madon	Xeuilley	19.11.12 - 26.11.12	<LoQ	<LoQ	2.165	1.42	0.425	1.092	1.092	66.0	160		
94	Meurthe	Bouxieres	19.11.12 - 26.11.12	0.191	0.019	4.070	2.12	2.115	0.214	1.236	64.7	549		
95	LaMoselle	Hauconcourt	20.11.12 - 27.11.12	0.132	0.012	1.880	2.19	0.612	0.194	0.778	69.6	211		

Transplantation information			Dissolved metal concentrations in water (µg/L)					Concentrations in transplanted gammarids (µg/g)				
code	River	Site	date (dd.mm.yy)	Pb	Cd	Ni	Cu	Pb	Cd	Ni	Cu	Ca ²⁺ (mg/L)
96	La Rosselle	Petite_Roselle	20.11.12 - 27.11.12	0.406	0.065	10.955	2.45	1.386	0.132	0.926	62.1	118
97	Souffel	Mundlosheim	20.11.12 - 27.11.12	0.367	0.015	2.565	2.38	1.737	0.154	1.947	67.7	150
98	Petite_Fecht	Stosswehr	20.11.12 - 27.11.12	0.118	<LoQ	<LoQ	0.56	0.776	0.346	<LoQ	73.1	3
99	Doller	Reiningue	20.11.12 - 27.11.12	0.119	<LoQ	<LoQ	1.84	1.569	0.233	1.629	72.3	16
100	Lanterne	Sainte_Marie_en_Chaux	21.11.12 - 28.11.12	0.182	0.488	<LoQ	1.27	0.750	0.203	0.823	64.8	30
101	Durgeon	Vesoul	21.11.12 - 28.11.12	0.101	<LoQ	1.750	1.57	0.209	0.119	<LoQ	65.9	80
102	Salon	Chalindrey	21.11.12 - 28.11.12	<LoQ	<LoQ	1.210	1.58	0.607	0.160	1.044	68.2	112
103	Ource	Autricourt	16.10.12 - 23.10.12	<LoQ	<LoQ	0.61	0.61	0.115	0.173	<LoQ	73.7	130
104	Seine	Nod_sur_Seine	16.10.12 - 23.10.12	<LoQ	<LoQ	<LoQ	0.58	0.271	0.181	<LoQ	74.0	128
105	Groeme	Terrefontrée	16.10.12 - 23.10.12	<LoQ	<LoQ	0.63	0.63	0.192	0.250	<LoQ	59.9	133
106	Aube	Auberive	16.10.12 - 23.10.12	<LoQ	0.047	<LoQ	0.50	0.326	0.277	<LoQ	65.3	129
107	Regnon	Bourdon_sur_Regnon	17.10.12 - 24.10.12	<LoQ	<LoQ	<LoQ	0.69	0.326	0.187	0.800	72.4	85
108	Aujon	Longchamp_sur_Aujon	17.10.12 - 24.10.12	<LoQ	<LoQ	<LoQ	0.55	0.169	0.233	0.679	68.9	107
109	Landion	Argançon	17.10.12 - 24.10.12	<LoQ	<LoQ	<LoQ	0.87	0.534	0.151	0.938	78.1	115
110	Ornain	Girauval	18.10.12 - 25.10.12	<LoQ	<LoQ	<LoQ	0.66	0.218	0.196	0.696	65.9	88
111	Auve	Sainte-Menehould	18.10.12 - 25.10.12	<LoQ	0.087	<LoQ	0.56	0.283	0.204	0.631	67.3	130
112	Vesle	Taissy	18.10.12 - 25.10.12	0.057	<LoQ	1.165	0.53	0.174	0.206	0.821	75.6	113
113	Puiseaux	Nogent_sur_Vernisson	16.10.12 - 23.10.12	0.250	<LoQ	1.870	1.25	0.301	0.189	0.918	67.8	39
114	Meanches	Chalmaison	16.10.12 - 23.10.12	<LoQ	<LoQ	1.800	0.77	0.205	0.125	0.705	74.4	176
115	Lieutel	Neauphle_le_Vieux	17.10.12 - 24.10.12	0.132	0.016	2.745	1.86	0.417	0.195	0.667	71.6	123
116	Vesgre	Saint-Lubin_de_la_Haye	17.10.12 - 24.10.12	0.341	0.053	2.030	1.26	0.417	0.164	0.655	63.7	84
117	Mesangueville	Dampierre	17.10.12 - 24.10.12	0.205	0.029	5.625	1.46	0.292	0.144	1.179	70.0	58
118	Auchy	Ferrières_en_Bray	17.10.12 - 24.10.12	0.157	0.016	2.395	1.91	0.890	0.130	0.652	72.2	143
119	Beuvronne	Gressy	18.10.12 - 25.10.12	0.097	0.016	2.260	1.17	0.736	0.124	0.970	68.9	225
120	Launette	Ver_sur_Launette	18.10.12 - 25.10.12	0.121	0.016	2.005	1.73	0.669	0.237	0.818	73.6	159
121	Lez	Lattes	20.03.13 - 27.03.13	0.331	<LoQ	<LoQ	1.63	1.030	0.121	1.973	71.2	119
122	Têt_Sainte_Marie_la_mer	Sainte_Marie_la_mer	20.03.12 - 27.03.12	0.154	<LoQ	<LoQ	1.43	0.903	0.129	1.748	62.8	28
123	Aguila_de_la_mar	Alenya	20.03.13 - 27.03.13	0.189	0.013	1.775	2.13	0.257	0.073	1.156	72.7	113
124	Layon	Saint_Lambert	25.03.13 - 01.04.13	0.344	0.014	1.860	2.46	0.340	0.169	1.843	60.2	71
125	Ru_Vrignon	Saint_Aubin	25.03.13 - 01.04.13	0.295	0.023	0.970	2.45	0.451	0.168	1.429	67.3	19
126	Petite_boulogne	Saint_Etienne	25.03.13 - 01.04.13	0.515	0.026	2.985	2.33	0.514	0.187	1.558	69.0	19
127	Boire_de_la_Roche	Saint_Julien	26.03.13 - 02.04.13	<LoQ	0.018	4.020	2.68	1.488	0.171	2.784	76.4	80
128	Vilaine	Guichen	26.03.13 - 02.04.13	0.542	0.026	5.120	2.12	0.436	0.216	2.721	62.0	31
129	Aff	Paimpont	26.03.13 - 02.04.13	0.159	0.036	2.610	2.37	0.413	0.346	2.350	46.9	4
130	Rance	Ereac	26.03.13 - 02.04.13	0.087	0.045	5.485	1.21	0.351	0.275	2.864	56.7	13
131	Oust	Loudeac	26.03.13 - 02.04.13	0.092	0.050	5.285	1.32	0.235	0.395	3.981	66.0	17
132	Gouet	Gouet_Saint_Julien	27.03.13 - 03.04.13	0.149	0.040	1.905	0.87	0.700	0.345	1.865	60.6	16
133	Airon	Loges-Marchis	27.03.13 - 03.04.13	<LoQ	0.024	2.510	0.72	0.539	0.259	2.514	63.8	17
134	Soullevre	Carville	27.03.13 - 03.04.13	0.290	0.013	<LoQ	1.01	0.476	0.211	1.862	63.6	15
135	Noireau	Berjou	28.03.13 - 04.04.13	<LoQ	0.018	3.745	0.84	0.491	0.436	4.415	75.3	17
136	Jouanne	Force	28.03.13 - 04.04.13	<LoQ	<LoQ	NA	1.00	0.434	0.233	1.484	70.0	47
137	Baraize	Saint_Denis_d'Anjou	28.03.13 - 04.04.13	<LoQ	<LoQ	1.300	1.47	0.518	0.188	1.757	62.9	66
138	Bievre	Igny	08.02.13 - 15.02.13	0.068	0.010	0.950	1.41	4.200	0.126	2.680	55.6	102

Transplantation information			Dissolved metal concentrations in water (µg/L)						Concentrations in transplanted gammarids (µg/g)					
code	River	Site	date (dd.mm.yy)	Pb	Cd	Ni	Cu	Pb	Cd	Ni	Cu	Ca ²⁺ (mg/L)		
139	Ru_Gally	Beynes	08.02.13 - 15.02.13	0.650	<LoQ	2.330	1.38	6.600	0.076	1.050	61.9	110		
140	Saint_Blandin	Guerard	11.02.13 - 18.02.13	<LoQ	<LoQ	<LoQ	0.66	0.500	0.078	0.640	41.3	87		
141	Ru_de_l_etang	Doue	11.02.13 - 18.02.13	<LoQ	0.036	1.840	0.23	0.467	1.840	1.230	60.1	81		
142	Ru_du_Rognon	Aulnoy	11.02.13 - 18.02.13	0.144	0.011	1.061	1.30	0.205	0.173	1.070	65.0	98		
143	Orge	Villemoisson_sur_Orge	08.02.13 - 15.02.13	0.084	0.011	1.727	1.91	1.593	0.192	0.884	63.2	110		
147	Lot ⁽¹⁾	Lot_ament_1	01.04.09 - 08.04.09	NA	0.012	NA	NA	NA	0.159	NA	NA	15		
147	Lot ⁽¹⁾	Lot_ament_2	01.06.09 - 08.06.09	NA	0.013	NA	NA	NA	0.190	NA	NA	15		
147	Lot ⁽¹⁾	Lot_ament_3	01.11.09 - 08.11.09	NA	<LoQ	NA	NA	NA	0.100	NA	NA	16		
147	Lot ⁽¹⁾	Lot_ament_4	01.02.10 - 08.02.10	NA	<LoQ	NA	NA	NA	0.298	NA	NA	20		
147	Lot ⁽¹⁾	Lot_ament_5	01.04.10 - 08.04.10	NA	0.013	NA	NA	NA	0.283	NA	NA	13		
147	Lot ⁽¹⁾	Lot_ament_6	01.06.10 - 08.06.10	NA	<LoQ	NA	NA	NA	0.374	NA	NA	15		
148	Lot ⁽¹⁾	Lot_aval_1	01.04.09 - 08.04.09	NA	0.056	NA	NA	NA	2.296	NA	NA	19		
148	Lot ⁽¹⁾	Lot_aval_2	01.06.09 - 08.06.09	NA	0.170	NA	NA	NA	12.690	NA	NA	23		
148	Lot ⁽¹⁾	Lot_aval_3	01.11.09 - 08.11.09	NA	0.136	NA	NA	NA	2.707	NA	NA	17		
148	Lot ⁽¹⁾	Lot_aval_4	01.02.10 - 08.02.10	NA	0.059	NA	NA	NA	1.414	NA	NA	21		
148	Lot ⁽¹⁾	Lot_aval_5	01.04.10 - 08.04.10	NA	0.100	NA	NA	NA	4.279	NA	NA	17		
148	Lot ⁽¹⁾	Lot_aval_6	01.06.10 - 08.06.10	NA	0.143	NA	NA	NA	8.020	NA	NA	15		
149	Riou_Mort ⁽¹⁾	Decazeville_1	01.04.09 - 08.04.09	NA	0.042	NA	NA	NA	0.153	NA	NA	101		
149	Riou_Mort ⁽¹⁾	Decazeville_2	01.06.09 - 08.06.09	NA	0.117	NA	NA	NA	0.387	NA	NA	130		
149	Riou_Mort ⁽¹⁾	Decazeville_3	01.02.10 - 08.02.10	NA	0.041	NA	NA	NA	0.273	NA	NA	69		
149	Riou_Mort ⁽¹⁾	Decazeville_4	01.04.10 - 08.04.10	NA	0.083	NA	NA	NA	0.314	NA	NA	93		
149	Riou_Mort ⁽¹⁾	Decazeville_5	01.06.10 - 08.06.10	NA	0.046	NA	NA	NA	0.509	NA	NA	118		
150	Riou_Viou ⁽¹⁾	Moulin_1	01.04.09 - 08.04.09	NA	0.067	NA	NA	NA	3.772	NA	NA	22		
150	Riou_Viou ⁽¹⁾	Moulin_2	01.06.09 - 08.06.09	NA	0.597	NA	NA	NA	14.350	NA	NA	23		
150	Riou_Viou ⁽¹⁾	Moulin_3	01.11.09 - 08.11.09	NA	0.938	NA	NA	NA	3.817	NA	NA	28		
150	Riou_Viou ⁽¹⁾	Moulin_4	01.02.10 - 08.02.10	NA	0.228	NA	NA	NA	1.185	NA	NA	22		
150	Riou_Viou ⁽¹⁾	Moulin_5	01.04.10 - 08.04.10	NA	0.349	NA	NA	NA	4.689	NA	NA	19		
150	Riou_Viou ⁽¹⁾	Moulin_6	01.06.10 - 08.06.10	NA	0.684	NA	NA	NA	10.888	NA	NA	20		
151	Riou_Mort ⁽¹⁾	Joanis_1	01.06.09 - 08.06.09	NA	6.873	NA	NA	NA	15.843	NA	NA	54		
151	Riou_Mort ⁽¹⁾	Joanis_2	01.02.10 - 08.02.10	NA	5.085	NA	NA	NA	7.987	NA	NA	54		
155	Seine	Marnay_Seine_1	27.03.12 - 03.04.12	0.074	<LoQ	NA	0.60	0.360	0.349	NA	73.9	96		
155	Seine	Marnay_Seine_2	19.06.12 - 26.06.12	<LoQ	<LoQ	NA	0.61	0.422	0.211	NA	84.7	132		
155	Seine	Marnay_Seine_3	04.12.12 - 11.12.12	0.061	<LoQ	NA	0.94	0.244	0.113	NA	60.6	122		
156	Seine	Bouval_1	27.03.12 - 03.04.12	0.191	0.015	NA	1.37	1.055	0.380	NA	67.6	112		
156	Seine	Bouval_2	19.06.12 - 26.06.12	0.199	0.011	NA	1.22	2.742	0.171	NA	80.3	133		
156	Seine	Bouval_3	04.12.12 - 11.12.12	0.159	0.023	NA	1.60	0.376	0.131	NA	62.2	123		
157	Seine	Triel_Seine_1	27.03.12 - 03.04.12	0.164	0.015	NA	1.48	0.875	0.304	NA	75.2	119		
157	Seine	Triel_Seine_2	19.06.12 - 26.06.12	0.161	0.011	NA	1.25	1.598	0.835	NA	79.2	126		
157	Seine	Triel_Seine_3	04.12.12 - 11.12.12	0.146	0.013	NA	1.63	0.531	0.121	NA	62.2	121		

NA means the site was not sampled for this metal / LoQ means the concentration was below the limit of quantification (detailed LoQ are given in Table S2).

Table S III-2: Limits of quantification in water and in gammarids of each metal (Pb, Cd, Ni, and Cu).

Limit of quantification (LQ)	Pb	Cd	Ni	Cu
For dissolved metal concentrations (µg/L)	0.06	0.01	for sites number 1-24:	for sites number 1-24:
			0.01	0.05
For metal concentrations in transplanted gammarids (µg/g)	0.11	Other sites:	Other site: 1.0	Other sites: 0.1
			for sites number 1-2, 13-14 and 18:	for sites number 1-2, 13-14 and 18:
			0.19	0.19
			for sites number 3-12, 15-16 and 19-24:	for sites number 3-12, 15-16 and 19-24:
			0.24	0.24
			Other sites: 0.53	Other sites: 0.27

Table S III-3: Dissolved concentrations of Cd used to predict bioaccumulation ($\mu\text{g/L}$), predicted (“Prediction”) and measured Cd concentrations in the 7d-transplanted gammarids (“Field measurement”) ($\mu\text{g/g}$), and calcium concentrations in water (“Ca²⁺”) (mg/L) (93 sites).

Cd		Dissolved metal	Field measurement	Prediction	Ca ²⁺
code	Site	concentration ($\mu\text{g/L}$)	($\mu\text{g/g}$)	($\mu\text{g/g}$)	(mg/L)
1	Labatie_d_Andaure	0.083	0.828	0.650	4
2	St_Julien_Vocance	0.050	0.329	0.340	40
3	La_Valla_en_gier	0.063	1.274	0.520	5
11	Les_ardillats	0.200	0.631	1.250	12
12	Poule_les_Echarmeaux	0.011	0.200	0.193	15
14	Sarras	0.066	0.329	0.406	40
18	Brion	0.021	0.147	0.196	82
19	Fontaine	0.011	0.279	0.176	49
21	Legny	0.014	0.300	0.192	40
22	Lucenay	0.105	0.915	0.442	83
23	Givors	0.038	0.217	0.277	50
24	Chasse_sur_Rhone	0.012	0.147	0.174	65
32	Saint_Sauveur	0.037	0.109	0.240	86
35	Givors	0.028	0.178	0.270	24
37	Andrezieux_Bouthéon	0.056	0.212	0.356	44
38	Bas_en_Basset	0.011	0.266	0.198	9
51	Begaar	0.017	0.104	0.232	10
52	Abidos	0.015	0.277	0.194	44
53	Rhieules	0.033	0.791	0.279	33
57	St_Leger_Vauban	0.014	0.425	0.219	6
61	Vitry_en_Charolais	0.015	0.090	0.194	43
62	Briennon	0.016	0.107	0.216	19
63	St_Jean	0.035	0.512	0.307	22
67	Gumieres	0.016	0.297	0.235	3
68	Olliergues	0.013	0.406	0.212	7
69	St_Laure	0.027	0.073	0.247	38
70	Poissy	0.014	0.143	0.172	96
72	Ambenay	0.045	0.734	0.254	98
73	Moisenay	0.010	0.232	0.154	151
79	Chassemy	0.014	0.142	0.165	136
86	Aix_en_Provence	0.021	0.138	0.190	97
89	Rousses	0.012	0.683	0.208	5
90	Genolhac	0.097	1.098	0.728	5
91	Rosieres	0.013	0.251	0.210	9
94	Bouxieres	0.019	0.214	0.148	549
95	Hauconcourt	0.012	0.194	0.153	211
96	Petite_Roselle	0.065	0.132	0.288	118
97	Mundlosheim	0.015	0.154	0.165	150
100	Sainte_Marie_en_Chaux	0.488	0.203	2.348	30
106	Auberive	0.047	0.277	0.239	129
111	Sainte-Menehould	0.087	0.204	0.328	130
115	Neauphle_le_Vieux	0.016	0.195	0.171	123
116	Saint-Lubin_de_la_Haye	0.053	0.164	0.288	84
117	Dampierre	0.029	0.144	0.236	58
118	Ferrieres_en_Bray	0.016	0.130	0.168	143
119	Gressy	0.016	0.124	0.158	225
120	Ver_sur_Launette	0.016	0.237	0.165	159
123	Alenya	0.013	0.073	0.166	113
124	Saint_Lambert	0.014	0.169	0.179	71
125	Saint_Aubin	0.023	0.168	0.252	19
126	Saint_Etienne	0.026	0.187	0.267	19
127	Saint_Julien	0.018	0.171	0.188	80
128	Guichen	0.026	0.216	0.251	31
129	Paimpont	0.036	0.346	0.358	4
130	Ereac	0.045	0.275	0.382	13
131	Loudeac	0.050	0.395	0.396	17

132	Saint-Julien	0.040	0.345	0.347	16
133	Loges-Marchis	0.024	0.259	0.260	17
134	Carville	0.013	0.211	0.204	15
135	Berjou	0.018	0.436	0.229	17
138	Igny	0.010	0.126	0.160	102
141	Doue	0.036	0.293	0.241	81
142	Aulnoy	0.011	0.173	0.164	98
143	Villemoisson_sur_Orge	0.011	0.192	0.162	110
147	Lot_amont_1	0.012	0.159	0.199	15
147	Lot_amont_2	0.013	0.190	0.204	15
147	Lot_amont_5	0.013	0.283	0.206	13
148	Lot_aval_1	0.056	2.296	0.421	19
148	Lot_aval_2	0.170	12.690	0.966	23
148	Lot_aval_3	0.136	2.707	0.847	17
148	Lot_aval_4	0.059	1.414	0.429	21
148	Lot_aval_5	0.100	4.279	0.659	17
148	Lot_aval_6	0.143	8.020	0.902	15
149	Decazeville_1	0.042	0.153	0.244	101
149	Decazeville_2	0.117	0.387	0.395	130
149	Decazeville_3	0.041	0.273	0.267	69
149	Decazeville_4	0.083	0.314	0.362	93
149	Decazeville_5	0.046	0.509	0.243	118
150	Moulin_1	0.067	3.772	0.466	22
150	Moulin_2	0.597	14.350	3.054	23
150	Moulin_3	0.938	3.817	4.479	28
150	Moulin_4	0.228	1.185	1.262	22
150	Moulin_5	0.349	4.689	1.921	19
150	Moulin_6	0.684	10.888	3.596	20
151	Joanis_1	6.873	15.843	20.803	79
151	Joanis_2	5.085	7.987	18.601	54
156	Bougival_1	0.015	0.380	0.171	112
156	Bougival_2	0.011	0.171	0.158	133
156	Bougival_3	0.023	0.131	0.187	123
157	Triel_Seine_1	0.015	0.304	0.170	119
157	Triel_Seine_2	0.011	0.835	0.159	126
157	Triel_Seine_3	0.013	0.121	0.165	121

Table S III-4: Dissolved concentrations of Ni used to predict bioaccumulation ($\mu\text{g/L}$), predicted ("Prediction") and measured metal concentrations in the 7d-transplanted gammarids ("Field measurement") ($\mu\text{g/g}$) (72 sites).

Ni		Dissolved metal	Field measurement	Prediction
code	Site	concentration ($\mu\text{g/L}$)	($\mu\text{g/g}$)	($\mu\text{g/g}$)
1	Labatie_d_Andaure	0.21	0.53	0.19
2	St_Julien_Vocance	0.42	1.27	0.23
3	La_Valla_en_gier	0.37	0.43	0.22
4	St_Maurice_de_Gourdans	0.91	0.6	0.30
5	Chaley	0.87	0.68	0.30
6	Oncieux	0.76	0.33	0.28
7	Cours_et_Buis	0.80	0.27	0.29
10	St_Laurent_du_Pont	0.61	0.49	0.26
11	Les_ardillats	0.29	0.35	0.21
12	Poule_les_Echarmeaux	0.34	0.45	0.21
13	Saint_Jean_de_Muzols	0.27	0.48	0.20
14	Sarras	4.10	1.27	0.81
15	Saint_Rambert	0.60	0.37	0.26
16	Lent	0.60	0.37	0.26
18	Brion	1.33	0.59	0.37
19	Fontaine	0.65	0.89	0.26
23	Givors	3.23	1.01	0.67
24	Chasse_sur_Rhone	1.00	0.69	0.32
29	Rodez	1.18	0.78	0.35
32	Saint_Sauveur	1.69	0.77	0.43
33	Razac	1.31	0.54	0.37
35	Givors	1.67	1.07	0.42
37	Andrezieux_Boutheon	4.00	2.16	0.79
43	Cezac	1.14	0.71	0.34
45	Vares	1.15	1.15	0.34
46	St_Antoine	0.97	0.95	0.31
55	Castelnaudary	1.54	0.79	0.40
58	Dompierre_sur_Nievre	1.20	0.99	0.35
61	Vitry_en_Charolais	1.17	0.81	0.35
62	Briennon	1.08	0.71	0.33
64	St_Remy	1.43	0.96	0.39
65	St_Bonnet_en_Bresse	1.51	0.81	0.40
66	Viriat	1.33	0.37	0.37
69	St_Laure	1.61	0.56	0.42
70	Poissy	1.30	0.52	0.37
79	Chassemy	2.26	0.86	0.52
86	Aix_en_Provence	0.93	0.67	0.31
87	Monteux	1.60	1.29	0.41
92	Void	1.00	0.85	0.32
93	Xeuilley	2.17	1.09	0.50
94	Bouxieres	4.07	1.24	0.80
95	Hauconcourt	1.88	0.78	0.46
96	Petite_Roselle	10.96	0.93	1.89
97	Mundlosheim	2.57	1.95	0.57
102	Chalindrey	1.21	1.04	0.35
112	Taissy	1.17	0.82	0.35
113	Nogent_sur_Vernisson	1.87	0.92	0.46
114	Chalmaison	1.80	0.7	0.45
115	Neauphle_le_Vieux	2.75	0.67	0.60
116	Saint-Lubin_de_la_Haye	2.03	0.66	0.48
117	Dampierre	5.63	1.18	1.05
118	Ferrieres_en_Bray	2.40	0.65	0.54

119	Gressy	2.26	0.97	0.52
120	Ver_sur_Launette	2.01	0.82	0.48
123	Alenya	1.78	1.16	0.44
124	Saint_Lambert	1.86	1.84	0.45
125	Saint_Aubin	0.97	1.43	0.31
126	Saint_Etienne	2.99	1.56	0.63
127	Saint_Julien	4.02	2.78	0.80
128	Guichen	5.12	2.72	0.97
129	Paimpont	2.61	2.35	0.57
130	Ereac	5.49	2.86	1.03
131	Loudeac	5.29	3.98	1.00
132	Saint_Julien	1.91	1.87	0.46
133	Loges-Marchis	2.51	2.51	0.56
135	Berjou	3.75	4.42	0.75
137	Saint_Denis_d_Anjou	1.30	1.76	0.37
138	Igny	0.95	2.68	0.31
139	Beynes	2.33	1.05	0.53
141	Doue	1.84	1.23	0.45
142	Aulnoy	1.06	1.07	0.33
143	Villemoisson_sur_Orge	1.73	0.88	0.43

Table S III-5: Dissolved concentrations of Pb used to predict bioaccumulation ($\mu\text{g/L}$), predicted ("Prediction") and measured metal concentrations in the 7d-transplanted gammarids ("Field measurement"), and calcium concentrations in water (" Ca^{2+} ") (87 sites).

Pb					
code	Site	Dissolved metal concentration ($\mu\text{g/L}$)	Field measurement ($\mu\text{g/g}$)	Prediction ($\mu\text{g/g}$)	Ca^{2+} (mg/L)
11	Les_ardillats	0.251	0.464	0.811	12
12	Poule_les_Echarmeaux	0.226	0.85	0.704	15
14	Sarras	0.486	0.401	1.121	40
15	Saint_Rambert	0.072	0.276	0.163	56
18	Brion	0.118	0.172	0.211	82
19	Fontaine	0.080	0.281	0.189	49
21	Legny	0.150	0.825	0.362	40
22	Lucenay	0.281	0.888	0.467	83
23	Givors	0.238	0.952	0.512	50
24	Chasse_sur_Rhone	0.119	0.297	0.238	65
30	Aval_de_Toulouse	0.068	0.895	0.212	21
32	Saint_Sauveur	0.349	0.982	0.563	86
33	Razac	0.111	0.445	0.235	58
34	Chasse_sur_Rhone	0.071	0.393	0.154	62
35	Givors	0.133	0.478	0.381	24
37	Andrezieux_Boutheon	0.301	1.668	0.677	44
38	Bas_en_Basset	0.159	0.257	0.544	9
41	Aix_les_Bains	0.121	0.715	0.221	78
42	Segur_le_chateau	0.129	0.336	0.433	11
43	Cezac	0.062	0.389	0.125	77
48	Albi	0.117	0.537	0.270	47
49	Montbrun_Bocage	0.057	0.281	0.124	67
51	Begaar	0.094	0.176	0.326	10
52	Abidos	0.098	0.703	0.236	44
53	Rhieules	0.101	3.724	0.268	33
55	Castelnaudary	0.460	1.212	0.711	91
56	Crimolois	0.085	0.951	0.142	101
57	St_Leger_Vauban	0.320	0.599	1.119	6
61	Vitry_en_Charolais	0.070	0.795	0.176	43
62	Briennon	0.255	0.833	0.752	19
63	St_Jean	0.568	2.796	1.588	22
64	St_Remy	0.249	0.86	0.358	108
65	St_Bonnet_en_Bresse	0.063	0.295	0.133	69
66	Viriat	0.468	0.693	0.784	79
68	Olliergues	0.203	0.342	0.707	7
69	St_Laure	0.172	0.482	0.419	38
70	Poissy	0.174	0.808	0.275	96
71	Normanville	0.059	0.351	0.112	89
72	Ambenay	0.118	0.492	0.192	98
74	St_Fargeau_Ponthierry	0.154	0.512	0.279	76
79	Chassemy	0.144	0.436	0.189	136
80	Reuil	0.066	0.436	0.144	63
83	St_Benoit_en_Diois	0.086	0.344	0.189	57
86	Aix_en_Provence	0.267	0.643	0.407	97
87	Monteux	0.177	2.371	0.224	139
90	Genolhac	2.111	7.427	7.363	5
91	Rosieres	0.135	1.296	0.465	9
94	Bouxieres	0.191	2.115	0.094	549
95	Hauconcourt	0.132	0.612	0.133	211
96	Petite_Roselle	0.406	1.386	0.538	118
97	Mundlosheim	0.367	1.737	0.418	150
98	Stosswehr	0.118	0.776	0.446	3
99	Reiningue	0.119	1.569	0.377	16
100	Sainte_Marie_en_Chaux	0.182	0.75	0.480	30
101	Vesoul	0.101	0.209	0.186	80
112	Taissy	0.057	0.174	0.097	113

113	Nogent_sur_Vernisson	0.250	0.301	0.593	39
115	Neauphle_le_Vieux	0.132	0.323	0.186	123
116	Saint-Lubin_de_la_Haye	0.341	0.417	0.558	84
117	Dampierre	0.205	0.292	0.415	58
118	Ferrieres_en_Bray	0.157	0.89	0.198	143
119	Gressy	0.097	0.736	0.100	225
120	Ver_sur_Launette	0.121	0.669	0.148	159
121	Lattes	0.331	1.03	0.441	119
122	Sainte_Marie_la_mer	0.154	0.903	0.418	28
123	Alenya	0.189	0.257	0.270	113
124	Saint_Lambert	0.344	0.34	0.616	71
125	Saint_Aubin	0.295	0.451	0.867	19
126	Saint_Etienne	0.515	0.514	1.496	19
128	Guichen	0.542	0.436	1.369	31
129	Paimpont	0.159	0.413	0.584	4
130	Ereac	0.087	0.351	0.292	13
131	Loudeac	0.092	0.235	0.293	17
132	Saint_Julien	0.149	0.7	0.466	16
134	Carville	0.290	0.476	0.897	15
138	Igny	0.068	4.2	0.118	102
139	Beynes	0.650	6.6	0.882	111
142	Aulnoy	0.144	0.205	0.229	98
143	Villemoisson_sur_Orge	0.084	1.593	0.134	110
155	Marnay_Seine_1	0.074	0.36	0.130	96
155	Marnay_Seine_3	0.061	0.244	0.098	122
156	Bougival_1	0.191	1.055	0.274	112
156	Bougival_2	0.199	2.742	0.256	133
156	Bougival_3	0.159	0.376	0.219	123
157	Triel_Seine_1	0.164	0.875	0.230	119
157	Triel_Seine_2	0.161	1.598	0.218	126
157	Triel_Seine_3	0.146	0.531	0.205	121

CHAPITRE IV

IV. Variabilité naturelle inter-populations des capacités de bioaccumulation des métaux par voie dissoute chez le genre *Gammarus*

PUBLICATION 3

Assessing the variability of metal bioaccumulation kinetics among populations of gammarids from uncontaminated freshwaters: towards generalized modeling of metal bioaccumulation.

En préparation pour le journal « Aquatic toxicology »

Résumé

Actuellement, les modèles cinétiques développés au laboratoire pour le Cd, le Cu, le Ni et le Pb chez le gammare sont basés sur l'utilisation d'organismes issus d'une seule population de référence. Cependant, dans les milieux naturels, les gammares vivent dans des hydrosystèmes présentant des paramètres physicochimiques contrastés (teneurs calciques, température, etc.), auxquels ils peuvent s'acclimater localement, via la modulation de leurs fonctions physiologiques (régulation osmotique, densité de canaux membranaires...), lesquelles peuvent être impliquées dans l'accumulation des métaux. Ainsi, la modulation des fonctions physiologiques des organismes en fonction de la physicochimie de leur environnement est susceptible d'impacter leurs capacités à accumuler et/ou éliminer les métaux, ce qui soulève plusieurs questions : quelle est la représentativité du modèle vis-à-vis des populations du milieu ? Quelle est l'incertitude de l'interprétation des données de bioaccumulation liée à l'utilisation d'une seule population ? À ce jour, l'impact de l'hétérogénéité des milieux sur la capacité des organismes aquatiques à accumuler et/ou éliminer les métaux est très peu documenté et aucune étude chez le gammare n'est connue. Ainsi, cette étude vise à évaluer la variabilité naturelle des capacités de bioaccumulation du Cd, du Cu, du Ni et du Pb entre populations de gammares. Pour atteindre cet objectif, des gammares provenant de cinq populations de référence, présentes dans deux bassins versants français éloignés l'un de l'autre (bassin de la Seine et bassin du Rhône), ont été prélevés, puis exposés au laboratoire au Pb, au Cd, au Ni et au Cu, afin de déterminer les constantes d'accumulation et d'élimination du modèle cinétique pour chaque couple métal/population.

Les résultats de cette étude ont montré que les gammares n'accumulaient pas significativement le Cu dans le temps, montrant leur forte capacité à réguler cet élément. Par conséquent, aucune constante d'accumulation et d'élimination n'a été établie. Concernant le Cd, une variabilité supérieure à un facteur deux a été observée entre les constantes d'accumulation déterminées pour les différentes populations testées, suggérant que l'origine des populations pourrait avoir un impact sur leur capacité à accumuler le Cd. La variation des constantes d'accumulation et d'élimination du Ni et du Pb déterminées pour

les cinq populations de référence était comprise dans un facteur deux, ce qui suggèrent une généralité de la réponse des organismes, en termes de bioaccumulation, quel que soit leur milieu d'origine. Ainsi, ces résultats suggèrent que l'utilisation des modèles du Ni et du Pb est transférable d'une population à une autre. À partir de ces résultats, il a été possible de définir des constantes d'accumulation et d'élimination « génériques » pour le Ni et le Pb, intégrant la variabilité naturelle observée entre populations de gammarés de référence, et qui est une étape nécessaire pour évaluer l'impact d'autres facteurs physicochimiques ou l'exposition long terme des organismes, sur la capacité de bioaccumulation des organismes.

Mots-clés:

Métaux traces, adaptation physiologique, macro-invertébré, bioaccumulation, modèle cinétique générique

Assessing the variability of metal bioaccumulation kinetics among populations of gammarids from uncontaminated freshwaters: towards generalized modeling of metal bioaccumulation

N. Urien^{a, b}, I. Friedel^a, L. C. Fechner^{a, b, c}, A. Chaumot^d, O. Geffard^d, J. D. Lebrun^{a, b}

^a Irstea, UR HBAN – Hydrosystems and Bioprocesses, 1 rue Pierre-Gilles de Gennes, CS 10030, F-92761 Antony Cedex, France

^b FIRE FR-3020, 4 place Jussieu, 75005 Paris, France

^c AgroParisTech, 19 Avenue du Maine, F-75732 Paris Cedex 15, France

^d Irstea, UR MAEP, Freshwater Systems, Ecology and Pollution, 5 rue de la Doua, CS 70077, F-69626 Villeurbanne Cedex, France

Abstract

Kinetic models are commonly used to describe metal bioaccumulation processes in aquatic invertebrates and have been recently used to predict metal accumulation in gammarid species. Nevertheless, such models are based on kinetic parameters experimentally derived in a single reference population, which raises the question of their environmental relevance regarding the populations in natural freshwaters. In the present study, we aimed at assessing the inter-population variability of waterborne Pb, Cd, Ni and Cu bioaccumulation among natural populations of gammarid species. To this end, gammarids from five populations inhabiting uncontaminated rivers located in two separate watersheds in France were collected. In the laboratory, for each metal and gammarid population, kinetic parameters, including the uptake and the elimination rate constants, have been determined by performing 7-d kinetic exposures to either 10 µg/L Pb, 0.5 µg/L Cd, 40 µg/L Ni or 2.5 µg/L Cu followed by 7-d depuration periods. Results showed that compared to the control organisms, no significant accumulation of Cu was observed, indicating that gammarids were poor bioindicators of Cu exposure because they were able to regulate it. Concerning Cd, the uptake rate constants varied by more than a factor of two among populations but no explanation was favored since the population inhabiting the most contrasted physicochemical environment was not significantly different from the other populations. In contrast, the kinetic parameters of Ni and Pb were relatively constant among the five gammarid populations (variation within a factor of two), suggesting that populations with different origins have similar abilities to bioaccumulate these two metals. Thus, these generic responses, in terms of bioaccumulation, raise the possibility of using different

reference populations as sources of organisms to calibrated kinetic models. Moreover single generalized kinetic parameters, integrating inter-population variability, for both Ni and Pb have been determined and could be used as reference values to predict metal bioaccumulation in gammarids.

Keywords

Trace metal, acclimation, macroinvertebrate, freshwater, bioaccumulation kinetic, generalized modeling

1. Introduction

Direct measures of dissolved metal concentrations in water do not give information about bioavailable and potentially toxic metal concentrations in the media water (Rainbow, 1995). Therefore, these chemical measures are insufficient to monitor water quality and to assess the impact of metals on aquatic biota. Alternatively, the determination of metal concentrations in aquatic organisms offers promising lines of inquiry for ecotoxicological risk assessment since it time-integrates the exposure of biota to bioavailable metal concentrations (Andral et al., 2004; Besse et al., 2013; Rainbow, 2007). However, metal bioaccumulation is complex because it depends on various physicochemical and biological factors (McGeer, 2004). Therefore, for a reliable interpretation of metal content in organisms, it is necessary to understand the link between metal exposure and bioaccumulation.

Over the last decades, kinetic models have been proposed to make this link, by describing the processes involved in metal bioaccumulation (Landrum et al., 1992; Luoma and Rainbow, 2005). One of these models, the biodynamic model, describes metal bioaccumulation in organisms as the result of a balance between the uptake rate of metal from the water and the diet, and the elimination rate (Luoma and Rainbow, 2005). Using biodynamic models involves the determination of kinetic parameters in the laboratory, which are specific to the metal/species combination, and have been successfully determined for various aquatic species including bivalves, decapods, insects, or freshwater snails (Bourgeault et al., 2010; Cresswell et al., 2014; Croteau and Luoma, 2008; Ponton and Hare, 2010).

More recently, kinetic models have been applied in the laboratory to study waterborne Pb, Cd, Ni and Cu bioaccumulation in the freshwater amphipod *Gammarus pulex* (Lebrun et al., 2012, 2011; Pellet et al., 2009; Urien et al., 2015). Indeed, because of their wide distribution in European freshwaters and their significant abilities to accumulate metals at environmental concentrations, members of the genus *Gammarus* have gained interest as candidates for monitoring metal contamination levels in freshwaters (Besse et al., 2013; Fialkowski et al., 2003a; Lebrun et al., 2014). Usually, kinetic models experimentally developed in gammarids are calibrated from a single reference population (i.e., non-impacted by metal contamination), and do not integrate inter-population variability of metal bioaccumulation abilities. However, gammarid populations are present in various hydrosystems characterized by contrasting physicochemical parameters, such as hardness levels or temperature, likely to affect animal physiological functions involved in metal uptake, and consequently influence their bioaccumulation abilities. For example, in the marine green mussels (*Perna viridis*), Blackmore and Wang (2003) reported different abilities to accumulate Cd and Zn between populations acclimated to different salinities. Nowadays, little is known about the impact of an acclimation of freshwater organisms to the natural environments on metal uptake and loss abilities. However, it appears that understanding

any natural variability of metal bioaccumulation abilities among populations is important for a reliable interpretation of bioaccumulation results and to develop environmentally relevant kinetic models.

The aim of the present study was to assess the inter-population variability of metal bioaccumulation abilities among different populations of gammarid species. Five reference populations inhabiting rivers non-impacted by metals were selected and collected in two contrasting watersheds in France to ensure the heterogeneity of local conditions. We chose to study the two major non-invasive gammarid species found in France, i.e., *G. pulex* and *G. fossarum*, which are closely related species (Pacaud, 1945; Roux, 1970). For each population, the kinetic parameters, including the uptake and the elimination rate constants (k_{in} and k_{out}), were determined in the laboratory, for Pb, Cd, Ni and Cu by performing 7-d kinetic exposures to either 10 µg/L Pb, 0.5 µg/L Cd, 40 µg/L Ni or 2.5 µg/L Cu, followed by 7-d depuration periods. The comparison of the kinetic parameters (k_{in} and k_{out}) for each metal/population combination allowed the quantification of the inter-population variability of metal bioaccumulation in gammarids. Because of logistical constraints, some populations were collected during two different seasons (summer and winter). Thus, we also checked that sampling season did not affect the kinetic parameters.

2. Materials and methods

2.1. Choice, collection and maintenance of the reference populations

From previous biomonitoring programs, five uncontaminated populations of gammarids were selected. Among these populations, three are located in the Seine watershed (North of France), i.e., named GUE, MENE and NEAU (Strahler order (RHT) : 3, 3 and 1, respectively), and two are located in the Rhône watershed (SE of France), named BACU and TOUR (Strahler order (RHT): 3 and 1, respectively) (Figure IV-1). The populations of BACU, GUE and TOUR were identified as *G. fossarum*, whereas MENE and NEAU as *G. pulex*.

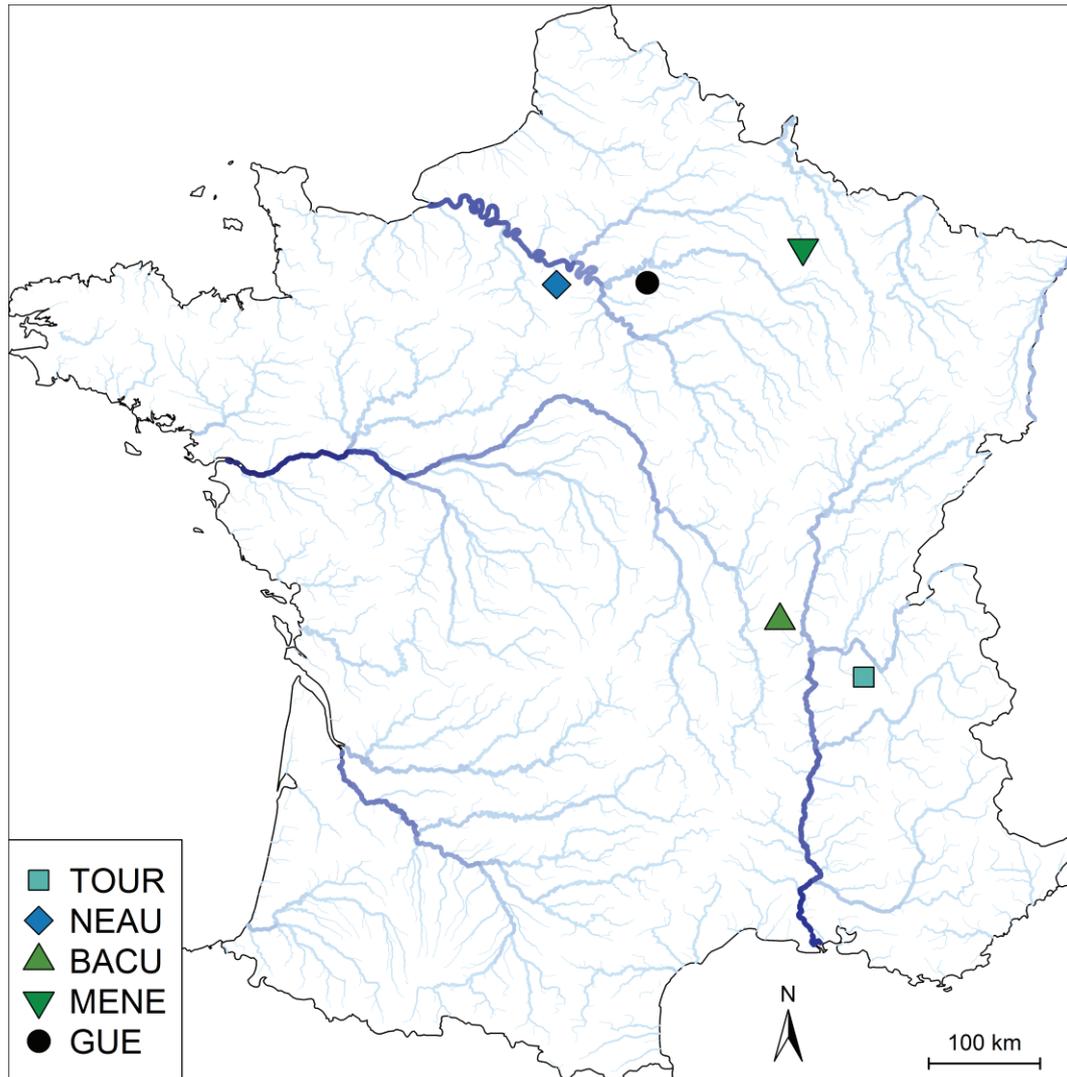


Figure IV-1: Localization of the five sites from which uncontaminated populations of gammarids were sampled for future metal exposure in the laboratory.

The uncontaminated status of the selected populations was determined using the Besse et al. (2013) transplantation protocol, which consisted of transplanting calibrated gammarids coming from a single reference population (Tour du Pin, Bourbre river) for 7 days at our five sites of interest. Then, the concentrations of metals accumulated in their transplanted gammarids were compared to the threshold values, defined by Besse et al. (2013) as the metal concentration in transplanted gammarids above which measured concentrations are expected to reveal a bioavailable contamination at the sampling site (threshold values for Cd: 0.3 $\mu\text{g/g}$, for Pb: 0.4 $\mu\text{g/g}$, for Ni: 0.7 $\mu\text{g/g}$ and for Cu: 73.9 $\mu\text{g/g}$).

Table IV-1 gives the metal concentrations measured in the transplanted gammarids at the five selected sites. All the concentrations are below the threshold values given by Besse et al. (2013), except for Pb which is slightly higher at BACU. Nevertheless, for this particular value,

the standard deviation was high compared to the rest of our database. Hence, in the present study, we assumed BACU as a reference population.

Table IV-1: Threshold values and metal concentrations measured in gammarids transplanted to the 5 selected sites from which indigenous gammarids were collected for metal bioaccumulation modeling in the laboratory (in $\mu\text{g/g}$ dry weight) (\pm standard deviation is given when a triplicate of 5 gammarids was performed. Otherwise, it means there was one replicate of 5 gammarids each). Limits of quantification (LoQ, $\mu\text{g/g}$): 0.095 for Pb; 0.048 for Cd; 0.48 for Ni and 0.24 for Cu. Reference (Besse et al., 2013).

Metal	Threshold values ($\mu\text{g/g}$) (1)	Concentration in transplanted gammarids ($\mu\text{g/g}$)				
		BACU	GUE	MENE	NEAU	TOUR
Cd	0.30	0.30 ± 0.06	0.15 ± 0.02	0.20	0.20	0.18 ± 0.04
Pb	0.40	0.64 ± 0.18	0.24 ± 0.13	0.28	0.32	0.31 ± 0.09
Ni	0.70	< LoQ	0.55 ± 0.06	0.63	0.67	< LoQ
Cu	74	52 ± 1	68 ± 1.7	67	72	55 ± 5

Adult gammarids, from each of the five populations (BACU, GUE, MENE, NEAU and TOUR), were collected in summer (July 2013) for subsequent exposures to Ni and Cu in the laboratory. Concerning Pb and Cd, the populations GUE, MENE and NEAU were also collected in summer (July 2013). Only TOUR (February 2014) and BACU (January 2015) were collected in following winters because of logistic constraints due to geographical locations. So as to check the influence of the sampling season on the variability of Pb and Cd bioaccumulation, the population GUE was collected both in summer and in winter (in July 2013 and in January 2015) for subsequent exposure in the laboratory.

Gammarids were sieved (between mesh-size of 2 and 2.5 mm) to collect only adults (length of about 1 cm for a width between 2 and 2.5 mm), transported to the laboratory, and then acclimatized for 7 days at 14°C in aerated mineral water (Volvic® Ca²⁺ 11.5, Na⁺ 11.6, Mg²⁺ 8.0, K⁺ 6.2, Cl⁻ 13.5, SO₄²⁻ 8.1 mg/L and pH 7) with a 10:14-h light:dark photoperiod. The mineral water (Volvic®) was chosen because of its low mineral content which decreases the risk of metal precipitation during exposures. Organisms were fed *ad libitum* with hornbeam leaves (*Carpinus betulus*) collected at each sampling site along with indigenous gammarids.

2.2. Physicochemical parameters of the water column at each site

At each selected site, pH and conductivity in the water column were measured. Raw water samples, filtered through a 0.45- μm polyethersulfone (PES) syringe filter (Millipore), were

also collected to measure the concentrations of major ions (Ca^{2+} , Na^+ , Mg^{2+} , Cl^- , K^+ , HCO_3^- and SO_4^{2-}) by chromatographic analysis [Dionex DX120, column IonPac CS16 Dionex No 057573 (4×250 mm)]. The physicochemical parameters at each site are presented in Table IV-2.

Table IV-2: Physicochemical parameters measured in the water column at each selected site.

	TOUR	NEAU	BACU	MENE	GUE_summer	GUE_winter
Ca^{2+} (mg/L)	115	123	8	130	105	87
Na^+	7	30	7	8	16	13
Mg^{2+}	3	15	2	2	8	7
Cl^-	16	58	7	29	27	30
K^+	2	6.6	1.3	1.5	2	1.2
HCO_3^-	310	279	<30	274	229	NA
SO_4^{2-}	14	71	8	32	31	44
Conductivity ($\mu\text{S}/\text{cm}$)	560	760	90	600	550	656
Temperature	14	11	14	10	13	5
pH	8.3	8.1	8.4	7.7	7.5	8

2.3. Laboratory experiments

2.3.1. Kinetics of accumulation and depuration

Aquatic microcosms comprised of plastic beakers were filled with 500 mL of Volvic[®] mineral water and independently spiked with $\text{Cd}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ or $\text{NiSO}_4 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ so as to obtain final nominal concentrations of 0.5 $\mu\text{g}/\text{L}$ for Cd, 2.5 $\mu\text{g}/\text{L}$ for Cu, 10 $\mu\text{g}/\text{L}$ for Pb and 40 $\mu\text{g}/\text{L}$ for Ni. Exposure concentrations were chosen so as to be close to the EQS or PNEC values of 0.25, 7.2 and 20 $\mu\text{g}/\text{L}$, for Cd, Pb and Ni, respectively (Directive 2008/105/EC), and 1.4 $\mu\text{g}/\text{L}$ for Cu (Bisson et al., 2005). Each condition was performed in triplicate. In order to ensure a correct final metal exposure, each beaker was pre-equilibrated for 48 h with the final metallic solution to saturate the potential adsorption sites on the beaker walls before performing the exposure. Then, fifty 24-h-starved gammarids from each uncontaminated population were introduced to the beakers for each exposure condition without food for 7 days of exposure followed by a 7-day depuration period. During the exposure phase, water was renewed every day to ensure a constant exposure and oxygenation. During the depuration period, water was daily renewed with uncontaminated Volvic[®] mineral water and hornbeam leaves were added to feed the gammarids. A pool of five gammarids per beaker was sampled on days 0, 1, 2, 4 and 7 for the exposure phase, and on day 8 (except for Pb and Cd experiments), 9, 11 and 14 for the depuration phase. Each time, gammarids were rinsed

in a solution of 2 and then 0.5 mM EDTA (ethylene-diamine tetra-acetic acid), and then rinsed twice with ultrapure water to remove metal potentially adsorbed on their cuticle (Lebrun et al., 2011) and stored at -20°C until metal analysis. At each sampling time, dead gammarids were counted and removed, and the renewed water was sampled and then acidified with HNO_3 *sp* at 1 % v/v to check dissolved metal concentrations.

2.3.2. Metal analyses in waters and in gammarids

Exposure concentrations in beakers were checked using a graphite furnace atomic absorption spectrophotometer (AAS; SpectrAA 220Z Varian with Zeeman background correction). The quality of the analysis was checked by analyzing two certified reference materials every 20 samples (natural waters: SPS-SW1, Spectrapure standard AS Oslo and EP-L-2CR, EnviroMAT).

For analysis, gammarids were freeze-dried (Christ Alpha 2-4 LD plus), weighed, and digested at 95°C (Digiprep Jr, SCP Science) with HNO_3 (65 % suprapur, Merck), H_2O_2 (suprapur, Merck), and diluted with ultrapure water. Cd, Pb, Ni and Cu analysis in gammarids was performed by AAS. In the case of Pb, the analysis was performed by standard addition to limit matrix effects. The quality of the whole analysis process of gammarids including digestion has been checked by analyzing the two natural waters certified reference materials cited above every 20 samples (SPS-SW1, Spectrapure standard AS Oslo and EP-L-2CR, EnviroMAT), and a certified reference material of biological tissue (CMR: Mussel Tissue ERM-CE278). The mean concentration of metals of each certified reference material was consistently within the certified 95 % confidence limit range for all the studied metals.

Metal concentrations measured in gammarids were expressed in $\mu\text{g/g}$ of dry weight.

2.4. Bioaccumulation modeling and kinetic parameters determination

2.4.1. Theory

According to a first-order kinetic model (Landrum et al., 1992), net waterborne metal bioaccumulation can be described by a simplified biodynamic model by the following equation :

$$C_{org}(t) = C_w \times k_{in} / k_{out} \times (1 - \exp^{(k_{out} \times t)}) \quad \text{Eq. (1)}$$

where C_{org} is the net amount of metal accumulated by the organism ($\mu\text{g/g}$, expressed in dry weight), t is the time, C_w is the concentration of dissolved metal in the water ($\mu\text{g/L}$), k_{in} is the uptake rate constant (L/g/d) and k_{out} is the elimination rate constant ($1/\text{d}$).

The net bioaccumulation is obtained by subtracting the metal concentrations measured in the organisms at the beginning of the exposure (basal concentration) from the total metal concentrations. The basal concentration is often close to 0 and can be neglected, but is particularly high for essential metals such as Cu. Indeed, for Cu, this basal concentration is assumed to represent metal integrally incorporated in essential biochemical components (minimum physiological). This concentration is more or less constant (Borgmann and Norwood, 1995b).

At the end of the exposure phase, organisms are introduced for the depuration phase into beakers containing uncontaminated Volvic[®] mineral water where C_w is, therefore, null. Under that condition, metal elimination is described as follows:

$$C_{org}(t) = C_{org}(0) \times \exp(-k_{out} \times t) \quad \text{Eq. (2)}$$

where $C_{org}(0)$ is the concentration of metal in organisms at the beginning of the depuration phase ($\mu\text{g/g}$).

2.4.2. Fitting to bioaccumulation data and statistical analyses

To determine the kinetic parameters, k_{in} and k_{out} , each kinetic model was fitted by nonlinear least square regression to the bioaccumulation data for both the exposure and the depuration phases together, since Eq. (1) and Eq. (2) share the parameter k_{out} .

Kinetic parameters (k_{in} and k_{out}) were determined using the R free software (R Core Team, 2013) and the 'nlstools' package (Baty et al., 2014). They are given with their respective 95% confidence interval and are considered significantly different when 95% confidence intervals did not overlap. Nonparametric Kruskal-Wallis tests were used to compare metal concentrations during the experiment in exposed versus control gammarids (non-exposed organisms).

3. Results and discussion

3.1. Bioaccumulation kinetics

The final mean concentrations of metals in exposure media to which each population was exposed were close to the nominal concentrations 0.45 ± 0.02 $\mu\text{g/L}$ for Cd, 2.3 ± 0.1 $\mu\text{g/L}$ for Cu, 10.6 ± 0.6 $\mu\text{g/L}$ for Pb and 45 ± 1.3 $\mu\text{g/L}$ for Ni ($n = 12$). Figure IV-2 presents the net bioaccumulation of metals measured in gammarids against time for each metal and each population, as well as the best model fit to these bioaccumulation data (except Cu, for which the basal concentration was not subtracted for visual convenience). We observed that the concentrations of Cu measured in exposed gammarids did not vary over time and were not significantly different from the concentrations measured in the control gammarids ($p > 0.05$). Thus, no Cu was newly accumulated by exposed organisms and, no kinetic model has been fitted. These results confirm that gammarids are able to regulate their internal Cu concentrations. Indeed, Cu is known to be an essential element for biota since it is involved in many biological functions, and, its internal regulation by aquatic organisms is well documented (Atli and Canli, 2011; Rainbow, 2007). Thus, the regulation abilities of gammarids regarding Cu contamination observed in our study agree with those observed in the field in indigenous *G. pulex* from the Seine watershed (France) (Lebrun et al., 2014), and in the laboratory for another amphipod, *Hyallela azteca* (Borgmann et Norwood, 1995a). Nevertheless, our results are not consistent with a previous study that observed a significant bioaccumulation kinetic of Cu in another gammarid population when exposed to 2.5 $\mu\text{g/L}$ of dissolved Cu in the same experimental conditions (i.e., one week of exposure in spiked Volvic® mineral water) (Lebrun et al., 2012). Nonetheless, insofar as different uncontaminated populations coming from various physicochemical environments are able to regulate their internal Cu concentrations, the present study suggests that these amphipods are not reliable to monitor Cu contamination. These results are in accordance with a field study of Besse et al. (2013), who reported that *G. fossarum* was a poor indicator of Cu exposure as organisms were able to regulate it.

Pb and Ni were significantly accumulated by gammarids and similar accumulation and elimination patterns were observed among populations. Indeed, metal concentrations in gammarids sharply increased during the first 48 hours of exposure, followed by a progressive slow down to finally tend towards steady-state concentrations. During the depuration phase, metal was exponentially eliminated. Hence, for each population and for both Ni and Pb, the kinetic model was successfully fitted to the bioaccumulation data. These results show a particularly high bioaccumulation of Pb and Ni, which is in accordance with the significant metal accumulation abilities of *G. pulex* and *G. fossarum* observed both in the laboratory and *in situ* (Dedourge-Geffard et al., 2009; Geffard et al., 2010; Lebrun et al., 2011; Urien et al., 2015). Thus, these results confirm that the species from the genus *Gammarus* are suitable

candidates as biomonitors of metal contamination in freshwaters and can be proposed in biomonitoring programs.

Concerning Cd, bioaccumulation kinetics among the five reference populations were not homogeneous. Indeed, during the exposure period, two patterns were observed: the accumulated Cd concentrations in gammarids from TOUR and NEAU increased linearly until about 2.5 $\mu\text{g/g}$ and no steady-state was observed, whereas for BACU, MENE and GUE, accumulated Cd concentrations levelled off at about 1.5 $\mu\text{g/g}$ at day 7. Moreover, we noticed that the depuration phases performed in the laboratory for Cd were too short and no significant metal elimination was observed (except for NEAU). Consequently, the kinetic models were only fitted on the accumulation data. The slow Cd depuration observed in gammarids in the present study argues in favor of a sequestration of Cd in their tissues after their exposure. Indeed, in the literature, many studies have shown that toxic metals such as Cd can be stored in aquatic organisms in detoxified forms after complexation with defense proteins, such as metallothioneins (MTLP) (Cooper et al., 2013; Peakall and Burger, 2003; Roesijadi and Robinson, 1994). Metallothioneins are low molecular mass cytosolic proteins with many thiol functions able to complex metals in detoxified form, and they can be induced after exposure to metals such as Cd in aquatic organisms, including gammarids (Amiard et al., 2006; Geffard et al., 2010, 2007; Roesijadi, 1992). In gammarids, it was reported that Cd may be stored into the soluble (bound to MTLP) and the insoluble fraction (Geffard et al., 2010).

The results of the bioaccumulation kinetics of Pb and Cd performed in the gammarid from the population GUE, collected both in summer and in winter, are presented in Figure S IV-1 in the supporting information (SI). Briefly, similar bioaccumulation patterns were observed for both Pb and Cd, irrespective of the sampling period (summer or winter).

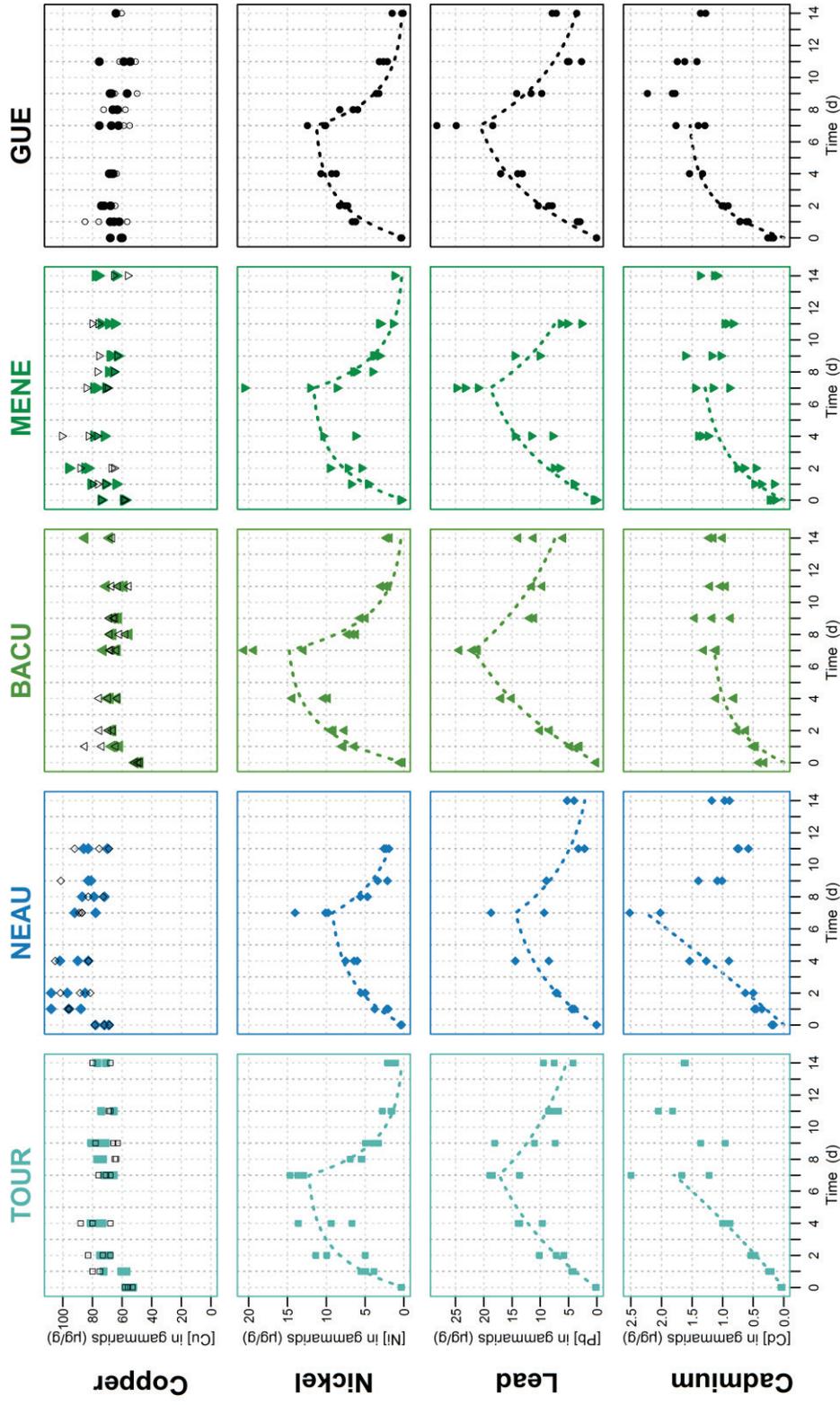


Figure IV-2: Bioaccumulation kinetics of Cu, Ni, Pb and Cd in the five reference populations of gammarids (TOUR, NEAU, BACU, MENE and GUE). In the case of Cu, the full points represent the concentrations of metal measured in exposed gammarids (a point = a pool of 5 gammarids), whereas the empty points account for the control gammarids (gammarids not exposed). The dotted lines represent the best model fit on the net bioaccumulation.

3.2. Kinetic parameters: uptake and elimination rate constants

As no bioaccumulation kinetics was observed in gammarids exposed to Cu, no kinetic parameters have been determined. The kinetic parameters (k_{in} and k_{out}) of Pb, and the uptake rate constants (k_{in}) of Cd determined in gammarids from GUE sampled both in summer (July 2013) and in winter (January 2015) are given in Table S IV-1 (SI). For all these kinetic parameters, no significant difference was observed between the sampling periods for Pb or Cd. These results indicate that the sampling period did not impact the bioaccumulation abilities of Pb and Cd in gammarids during metal exposure in controlled conditions in the laboratory. Therefore, this confirms that kinetic parameters of Pb and Cd can be compared among the five reference populations (BACU, GUE, MENE, NEAU and TOUR) and can be used, whatever the sampling periods. For the rest of the paper, when we refer to GUE, we mean the gammarids sampled in summer (July 2013) as they were simultaneously exposed to all the metals (Cd, Cu, Ni and Pb) at this period.

The kinetic parameters of Ni, Pb, and Cd determined in all populations of gammarids (BACU, GUE, MENE, NEAU and TOUR) are compared in Figure IV-3 (detailed values and 95 % confidence intervals are given in Table S IV-2, SI).

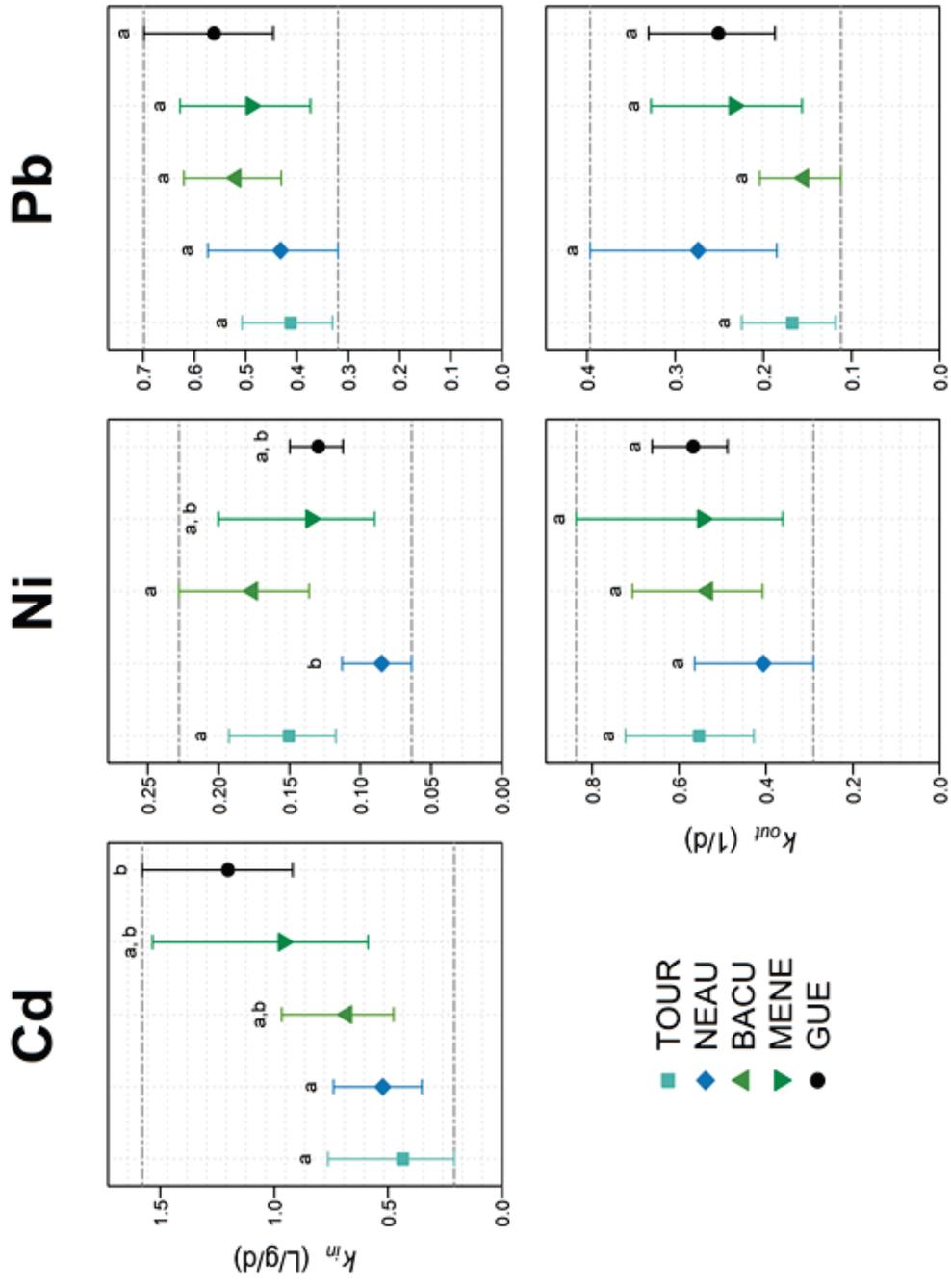


Figure IV-3: Uptake rate constants (k_{in} , L/g/d) and elimination rate constants (k_{out} , 1/d) determined in gammarids from TOUR, NEAU, BACU, MENE and GUE, and their 95 % confidence intervals. In each box, points sharing a common letter are not significantly different ($p < 0.05$). The dashed lines represent the upper and the lower bounds of the inter-population variability.

The k_{in} values of Cd ranged from 0.44 to 1.20 L/g/d and varied significantly between the populations from TOUR, NEAU, and the population from GUE (Figure 3). The k_{in} values of Ni ranged from 0.09 L/g/d to 0.18 L/g/d. Confidence intervals showed significant differences between the populations from TOUR, BACU, and the population from NEAU (Figure IV-3). The k_{out} values of Ni ranged from 0.41 to 0.57 1/d and there was no significant difference among populations. Finally, the k_{in} values of Pb ranged from 0.41 to 0.70 L/g/d and no significant difference between the populations was observed. The k_{out} values of Pb ranged from 0.15 to 0.27 1/d. The k_{out} value determined for TOUR and BACU (i.e., from the Rhône watershed) tended to be lower than those of the other populations but no statistical difference was observed.

The minimum and the maximum k_{in} values of Cd varied by more than a factor of two among the populations (within a factor of 2.7), suggesting that gammarids with different geographical and geochemical origins have different abilities to accumulate Cd. It is possible that local acclimation of gammarids to their physicochemical environment may affect their bioaccumulation abilities. However, no correlation between the k_{in} values and the physicochemical parameters of the selected sites was observed (data not shown). Nevertheless, we observed that gammarids from BACU, which are present in a stream with very low calcium concentration compared to the other sites, had a k_{in} value in the range of the other k_{in} values. To date, our study does not allow an explanation of such variability among the k_{in} values of Cd in gammarids. In that sense, further investigations should be done, first to determine the full set of kinetic parameters (k_{in} and k_{out}) describing Cd bioaccumulation, and secondly, by using populations from more contrasted environments.

Concerning Ni and Pb, we observed that the maximum and the minimum k_{in} and k_{out} values for these two metals varied within a factor of two. These results highlight the relatively low inter-population variability of metal uptake and loss abilities among reference populations, whatever their geochemical and geographical origins. In addition, our results suggest that metal bioaccumulation abilities were relatively constant between the two closely related species, *G. fossarum* and *G. pulex*, which is in agreement with the field study of Lebrun et al. (2015), who observed no significant differences in metal bioaccumulation measured in two populations of *G. pulex* and *G. fossarum* transplanted for seven days along a river axis exhibiting a metal gradient. Overall, concerning Pb and Ni, the present results showed that the kinetic models can be calibrated from different uncontaminated populations without increasing the uncertainties about the model predictions. Furthermore, regarding the use of gammarids as biomonitors, these results also indicate that in the cases of transplanted organisms, the interpretation of the measured bioaccumulation would be similar irrespective of the uncontaminated populations used as the source of organisms.

3.3. Towards a generalized model

As kinetic parameters of Pb and Ni bioaccumulation are relatively constant between the populations tested in the present study, a single set of kinetic parameters (k_{in} and k_{out}) was determined for each metal. Indeed, a single generalized kinetic model for each metal, integrating the inter-population variability of metal uptake and loss abilities between gammarids can be fitted using Eq. (1) and (2) on the whole dataset as showed in Figure IV-4.

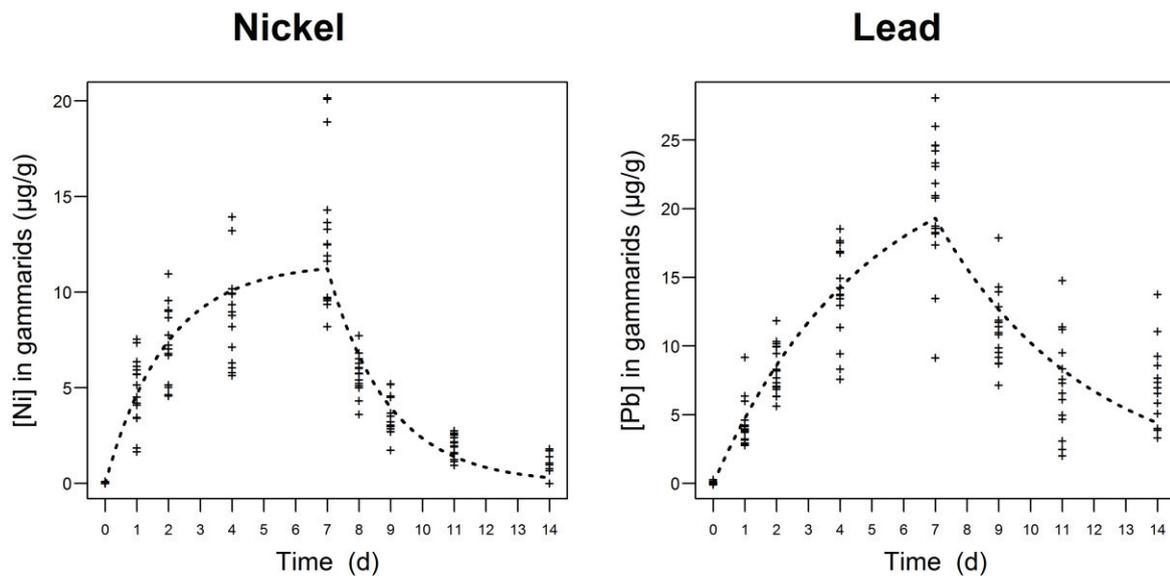


Figure IV-4: Best model fits on the complete bioaccumulation dataset for Ni and Pb (NEAU, BACU, TOUR, MENE, GUE). Each point represents the concentration of metal measured in 5 gammarids exposed to metal. The dotted lines represent the best model fit on the bioaccumulation data.

The generalized kinetic parameters and their 95 % confidence intervals determined for Ni were $k_{in} = 0.13$ L/g/d [0.12 – 0.15] and $k_{out} = 0.52$ 1/d [0.45 – 0.60]. The generalized kinetic parameters obtained for Pb were $k_{in} = 0.52$ L/g/d [0.47 – 0.57] and $k_{out} = 0.21$ 1/d [0.18 – 0.24]. By comparison, the kinetic parameters for Ni ($k_{in} = 0.032$ L/g/d and $k_{out} = 0.126$ 1/d) and for Pb ($k_{in} = 1.01$ L/g/d and $k_{out} = 0.33$ 1/d) determined in another gammarid population were overall 4 times lower and 2 times higher, respectively, than the generalized kinetic parameters determined in the present study (Lebrun et al., 2011; Urien et al., 2015). These results suggest that the gammarid population used in the previous studies has different physiological abilities to cope with Ni and Pb contamination. One possible explanation accounting for this might be that this population is contaminated. Indeed, a recent study from Khan et al. (2011) reported that a historically impacted population of *G. pulex* had lower uptake of Cu and Zn compared with a transplanted reference population.

Nevertheless, compared to Cu and Cd, studies about Ni or Pb bioaccumulation in freshwater invertebrates are far less extensive and deserve to be more investigated.

3.4. Uncertainty for model predictions

Kinetic models offer the possibility to predict metal bioaccumulation in aquatic organisms. However, laboratory-derived kinetic models are usually calibrated on a single reference population ignoring the inter-population variability of bioaccumulation abilities. Therefore, these models, when they are field-tested did not integrate the uncertainty of the prediction related to the use of a single population. In the present study, we determined generalized kinetic parameters for Ni and Pb integrating the inter-population variability of bioaccumulation abilities among 5 reference populations. From the set of uptake and the loss rate constants determined for each reference population it was possible to establish lower and upper bound of the inter-population variability for these parameters which are for Ni: k_{in} [0.06 ; 0.32] and k_{out} [0.29 ; 0.84], and for Pb: k_{in} [0.32 ; 0.70] and k_{out} [0.11 ; 0.40]. These values correspond to the maximum and minimum IC 95 % obtained among the 5 reference populations tested (represented by the dashed lines in the Figure IV-3). First, these ranges of values could be used as threshold values above and below which a kinetic parameter can be interpreted as deviated bioaccumulation ability for the population, and could be used to assess the impact of other factors on bioaccumulation, such as metal field-exposure. Secondly, from these values it is possible for kinetic models to generate accumulated metal predictions along with uncertainties, which is of concern when they are field-tested.

4. Conclusion

Cu was actively regulated by gammarids and no significant bioaccumulation was observed. Thus, no kinetic model was calibrated for Cu. In the case of Cd, a high inter-population variability of the k_{in} values was observed (more than a factor of two). No k_{out} values were determined as no significant elimination was observed, arguing in favor of the Cd storage abilities of gammarids. Nevertheless, for a complete interpretation of these results, further investigations must be conducted to establish the whole set of kinetic parameters (k_{in} and k_{out} together).

The variation of the kinetic parameters (k_{in} and k_{out}) of Ni and Pb among the five reference populations was lower than a factor of two highlighting low inter-population bioaccumulation abilities for these two metals whatever their geographical and geochemical origins. These results indicate that (i) a single reference population is environmentally relevant regarding the populations in natural freshwaters, (ii) the kinetic model is transferable from one reference population to another, and (iii) different population with different origins can be used as source organisms to calibrate kinetic models in the

laboratory. Finally, from these results, generalized kinetic parameters, integrating the natural inter-population variability, have been determined for Ni and Pb. For the future, these values could be used as reference constants characterizing metal bioaccumulation in gammarids. Moreover, lower and upper bounds of inter-population variability were established so as to allow the calculation of the uncertainties around model predictions of bioaccumulation.

5. Supporting information

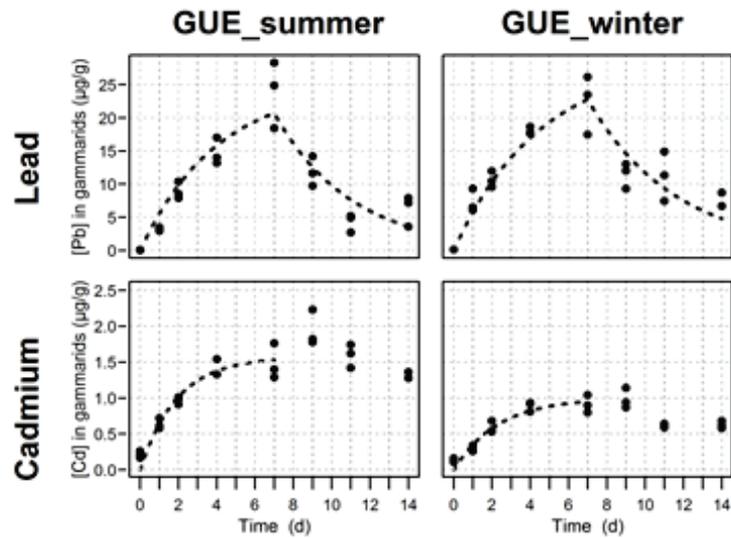


Figure S IV-1: Bioaccumulation kinetics of Pb and Cd in the population GUE sampled both in summer (July 2013) and in winter (January 2015). The full points represent the concentrations of metal measured in exposed gammarids (a point = a pool of 5 gammarids). The dotted lines represent the best model fit on the net bioaccumulation.

Table S IV-1: Uptake rate constants (k_{in} , L/g/d) and elimination rate constants (k_{out} , 1/d) determined in gammarids from the population GUE, collected in July 2013 (GUE_summer) and in January 2015 (GUE_winter), and their 95% confidence intervals. Constants sharing a common letter in any comparison are not significantly different.

	Uptake		Elimination				
	k_{in}	95% confidence interval	k_{out}	95% confidence interval			
Cd	GUE_summer	1.20	0.92 - 1.58	a	Nd.	-	-
	GUE_winter	0.98	0.74 - 1.29	a	Nd.	-	-
Pb	GUE_summer	0.56	0.45 - 0.70	b	0.25	0.19 - 0.33	c
	GUE_winter	0.70	0.57 - 0.84	b	0.22	0.17 - 0.29	c

Table S IV-2: Uptake rate constants (k_{in} , L/g/d) and elimination rate constants (k_{out} , 1/d) determined in gammarids from TOUR, NEAU, BACU, MENE and GUE (summer, July 2013), and their 95 % confidence intervals. For each metal and each constant, values sharing a common letter are not significantly different. Nd. means that parameters could not have been determined.

	Uptake			Elimination		
	k_{in}	95% confidence interval	k_{out}	95% confidence interval	k_{out}	95% confidence interval
Cd	TOUR	0.44	0.21 - 0.76	a	Nd.	-
	NEAU	0.52	0.35 - 0.74	a	Nd.	-
	BACU	0.68	0.48 - 0.97	a, b	Nd.	-
	MENE	0.96	0.59 - 1.53	a, b	Nd.	-
	GUE	1.20	0.92 - 1.58	b	Nd.	-
Pb	TOUR	0.41	0.33 - 0.51	a	0.17	0.12 - 0.22
	NEAU	0.43	0.32 - 0.57	a	0.27	0.18 - 0.40
	BACU	0.52	0.43 - 0.62	a	0.15	0.11 - 0.20
	MENE	0.49	0.37 - 0.63	a	0.23	0.16 - 0.33
	GUE	0.56	0.45 - 0.70	a	0.25	0.19 - 0.33
Ni	TOUR	0.15	0.12 - 0.19	a	0.55	0.43 - 0.72
	NEAU	0.09	0.06 - 0.11	b	0.41	0.29 - 0.56
	BACU	0.18	0.14 - 0.23	a	0.53	0.41 - 0.71
	MENE	0.13	0.09 - 0.20	a, b	0.55	0.36 - 0.84
	GUE	0.13	0.11 - 0.15	a, b	0.57	0.49 - 0.66

CHAPITRE V

V. Effet d'une exposition métallique chronique sur la capacité de bioaccumulation des métaux chez *Gammarus*

Partie V.1 : Capacité de bioaccumulation des métaux chez des gammarés issus de milieux contaminés.

(**Publication 4:** *Effects of metal field-exposure history on waterborne bioaccumulation kinetics of Ni, Pb and Cd in gammarid species.* En préparation pour le journal « Environmental pollution »)

Partie V.2 : Capacité de bioaccumulation des métaux chez des gammarés naïfs acclimatés à long terme en laboratoire au Pb ou au Cd.

1. Capacité de bioaccumulation des métaux chez des gammarses issus de milieux contaminés

PUBLICATION 4

Effects of metal field-exposure history on waterborne bioaccumulation kinetics of Ni, Pb and Cd in gammarid species.

En préparation pour le journal « Environmental pollution »

Résumé

En réponse à un stress métallique chronique, les organismes peuvent mettre en place des mécanismes de défense, lesquels peuvent par conséquent leur conférer un certain degré de tolérance. L'apparition d'une tolérance peut résulter d'une adaptation génétique, transférable aux générations futures, ou bien d'une adaptation physiologique (ou acclimatation), se manifestant suite à une exposition de l'organisme au cours de sa vie et qui peut être perdue dès lors que cette exposition cesse. Ainsi, si les organismes ont la capacité de s'acclimater à la contamination métallique dans leur milieu, ceci se traduit par la mise en place de mécanismes physiologiques et biochimiques permettant de mieux réguler la bioaccumulation des métaux, tels que la réduction de l'internalisation des métaux, l'augmentation de l'élimination ou encore l'augmentation de la détoxification/séquestration. Dans cette éventualité, l'interprétation des données de bioaccumulation, en termes de contamination biodisponible, peut être compromise. Ce chapitre a pour but d'étudier la possibilité pour les gammarses de s'acclimater à la contamination métallique et son implication dans leur capacité à accumuler et gérer les métaux lors d'une exposition. Pour cela, des gammarses contaminés, issus de trois populations résidentes de milieux soumis à une contamination métallique chronique, ont été prélevés puis exposés au laboratoire au Cd, au Ni et au Pb, afin de déterminer les constantes d'accumulation et d'élimination du modèle cinétique pour chaque couple métal/population. Dans le chapitre précédent, il a été montré que la pertinence du choix du gammare était limitée pour le suivi de la contamination du Cu. C'est pourquoi, le Cu n'a pas été inclus dans cette étude.

Les résultats de cette étude ont montré que par rapport à une population non contaminée, les capacités de bioaccumulation des métaux étaient différentes chez des populations de gammarses historiquement contaminés. En effet, il a été observé que les populations contaminées au Pb et au Ni avaient des capacités limitées à accumuler le Ni et le Cd, suggérant qu'elles se sont acclimatées à leur milieu. Les mécanismes potentiellement impliqués dans la modulation de la bioaccumulation de ces métaux seront abordés. Ces

résultats montrent également que l'utilisation du modèle cinétique peut être un outil intéressant pour identifier les populations chroniquement soumises à une contamination métallique de populations non contaminées. Enfin, dans le cadre de la biosurveillance des milieux, ces résultats suggèrent que pour une interprétation fiable des données de bioaccumulation acquises *in situ*, l'utilisation d'organismes autochtones ne semble pas pertinente et que des approches actives seraient donc à privilégier.

Mots-clés:

Contamination multi-métallique, adaptation, modèle cinétique, gammare, métal

Effects of metal field-exposure history on waterborne bioaccumulation kinetics of Ni, Pb and Cd in gammarid species

N. Urien^{a, b}, I. Friedel^a, A. Farfarana^a, L. C. Fechner^{a, b, c}, A. Chaumot^d, O. Geffard^d,

J. D. Lebrun^{a, b} *

^a Irstea, UR HBAN – Hydrosystems and Bioprocesses, 1 rue Pierre-Gilles de Gennes, CS 10030, F-92761 Antony Cedex, France

^b FIRE FR-3020, 4 place Jussieu, 75005 Paris, France

^c AgroParisTech, 19 Avenue du Maine, F-75732 Paris Cedex 15, France

^d Irstea, UR MAEP, Freshwater Systems, Ecology and Pollution, 5 rue de la Doua, CS 70077, F-69626 Villeurbanne Cedex, France

Abstract

Gammarid species are promising candidates for monitoring bioavailable metals in freshwaters. However, for a reliable interpretation of the bioaccumulation in terms of water contamination, it is crucial to know the animals' behavior regarding the contamination. Recently, kinetic models describing metal bioaccumulation processes in gammarids have been developed and were used to link metal contamination in water to bioaccumulation in organisms. Nevertheless, one factor that may affect metal bioaccumulation is the metal field-exposure history which is likely to cause changes in metal uptake and/or loss rates by organisms. The aim of this study was to assess the impact of metal field-exposure history on the subsequent kinetics of trace metal bioaccumulation from water in gammarids. For this, three contaminated populations of gammarid species inhabiting rivers impacted with various multi-metallic contaminations were collected. In the laboratory, they were exposed for 7 days to Ni, Pb or Cd and were then placed in clean water, to monitor their ability to first accumulate and then eliminate metals. By fitting a first-order kinetic model, the uptake and loss rate parameters of each metal were established and compared to a non-contaminated population. Results showed that the kinetic parameters for Ni, Pb or Cd accumulation by gammarids were not affected by a field-exposure to Cd. In contrast, the uptake rate constants of Ni and Cd were significantly lower in gammarids contaminated with Ni and Pb, whereas the kinetic parameters for Pb were not impacted by any metal field-exposure history. Thus, the present study demonstrated that metal field-exposure history can affect metal uptake rates in gammarids. Moreover the use of kinetic models was useful to discriminate contaminated populations from non-contaminated gammarid populations.

Finally, the significance of characterizing correctly the metal field-exposure history of sample populations is also discussed regarding biomonitoring since bias of interpretation of the field bioaccumulation results would be limited.

Keywords

Multi-metallic contamination, kinetic model, gammarids, adaptation, metal

1.1. Introduction

Since metals are non-biodegradable elements, they exert a chronic and diffuse pressure on aquatic organisms which is likely to reduce their abundance and biodiversity with shifts towards tolerant populations, and consequently disturb ecosystem functioning (Clements, 1991; Roussel et al., 2008). The use of aquatic organisms to monitor trends of chemical contamination in water, including trace metals, was first initiated in the mid-1970s for coastal water biomonitoring (Goldberg, 1975), and has been subsequently developed in freshwaters environments (Besse et al., 2012). Indeed, metal determinations in aquatic organisms enable time-integrated measures of bioavailable and potentially toxic metals in the receiving waters, which is of direct ecotoxicological relevance (Rainbow, 1995). Among the potential biomonitors, the amphipods of the genus *Gammarus* are especially suitable to monitor trace metals in freshwaters as they are common inhabitants of the streams and rivers of Europe and are efficient accumulators of trace metals at environmental concentrations (Amyot et al., 1996; Besse et al., 2013; Dedourge-Geffard et al., 2009; Fialkowski et al., 2003a; Lebrun et al., 2015; Urien et al., 2015).

Recently, first-order kinetic models characterizing waterborne metal bioaccumulation processes in gammarids have been developed (Lebrun et al., 2012; Pellet et al., 2009; Urien et al., 2015). Generally, kinetic models describe metal bioaccumulation as the result of a balance between uptake and loss rates of metal and depends on kinetic parameters (uptake and elimination rate constants) easily determined under controlled conditions in the laboratory (Landrum et al., 1992; Luoma and Rainbow, 2005).

There is increasing evidence for the development of metal-tolerance in aquatic populations inhabiting chronically metal-contaminated environments (Amiard-Triquet et al., 2011; Wang and Rainbow, 2005). Tolerance may be brought by biochemical and physiological changes, as a result of physiological acclimation (reversible process) or genetic adaptation (transferable to the next generation) (Amiard-Triquet et al., 2011). Generally, it is admitted that pre-exposure induces physiological mechanisms aiming at reducing bioaccumulation. Among them, the most commonly reported in the literature are metal detoxification processes, such as the induction of metallothioneins synthesis (Roesijadi, 1992) and metal sequestration in metal-rich granules (Vijver et al., 2004), the reduction of metal uptake and/or the increase of metal elimination (Mason and Jenkins, 1995; Postma et al., 1996; Wang and Rainbow, 2005). Therefore, if such mechanisms are induced in contaminated organisms, thus the interpretation of bioaccumulation in terms of metal bioavailability might be compromised. For example, in a recent study, Khan et al. (2011) reported that a historically impacted population of *Gammarus pulex* had lower uptake of Cu and Zn compared with a transplanted reference population.

The aim of the present study was to assess the influence of metal field-exposure history on the bioaccumulation kinetics of Ni, Pb and Cd uptake from solution in various gammarid

populations. For that, populations of *Gammarus pulex* and *Gammarus fossarum*, two closely related species (Lebrun et al., 2015; Roux, 1970), were collected at a non-contaminated site (one reference population) and at three sites in France exhibiting multi-metallic contamination; one site mainly contaminated by Cd and to a lesser extent by Pb, and two sites contaminated with both Pb and Ni. In the laboratory, each pre-exposed and non-contaminated population of gammarids was then exposed for 7 days to 0.5 µg/L of Cd, 10 g/L of Pb or 40 µg/L of Ni and was placed in non-contaminated media for 7 days, so as to determine the uptake rate and the elimination rate constants for each metal/population combination. Finally, the comparison of the kinetic parameters for each metal among the populations offered the possibility to identify the underlying mechanisms (uptake, loss, storage) affected by metal field-exposure history, if any.

1.2. Materials and methods

1.2.1. Choice, collection and maintenance of the impacted populations

From previous biomonitoring programs, three populations of gammarids were selected in the Seine watershed (North of France), i.e., named BIE, GAL and GUE, and another population in the Rhône watershed (SE of France), named ARDI, in January 2015 (Figure V-1). For the three impacted populations, sampling sites were characterized by different metallic pressures; GAL is located downstream of a military shooting range and in a peri-urban area; BIE is located in an urban zone and receives domestic effluents; ARDI is located in a rural area and is known to be naturally loaded with Cd from a geochemical background. The reference population GUE, is also located in a rural area without anthropogenic pressure and has been previously characterized as an uncontaminated population. For the rest of the paper, when we refer to the terms “BIE”, “GAL”, “ARDI” or “GUE”, we mean the populations of gammarids from these sites (i.e., BIE, GAL, ARDI or GUE population).

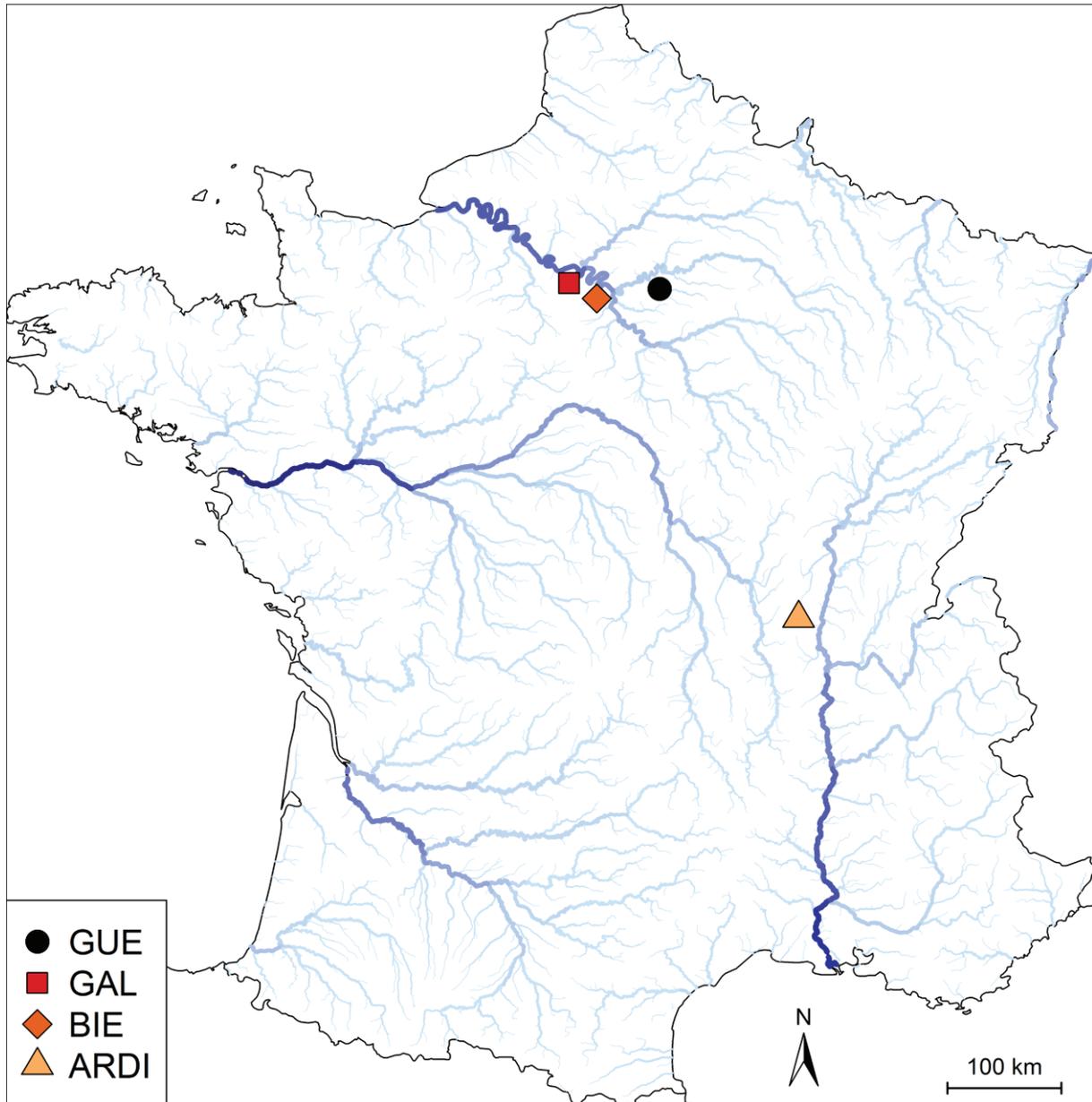


Figure V-1: Localization of the selected populations of gammarids species (one reference population, GUE, and three historically exposed populations to metals) for subsequent exposure kinetics to Ni, Pb or Cd in the laboratory (France).

In order to confirm the chronic pressure of populations in terms of metal bioavailability and the reference status of the population GUE, we used the Besse et al. (2013) transplantation protocol, which consisted of transplanting calibrated gammarids coming from a single reference population (Tour du Pin, Bourbre river) for 7 days at our four sites of interest. Then the accumulated metal concentrations in the transplanted gammarids were compared to the threshold values, defined by Besse et al. (2013) as the metal concentration above which measured concentrations are expected to reveal a bioavailable contamination at the

sampling site (threshold values for Pb : 0.4 µg/g, Cd : 0.3 µg/g and Ni : 0.7 µg/g). The measured concentrations of Pb, Cd and Ni in transplanted gammarids are given in Table V-1.

Table V-1: Collection sites, geographical coordinates and concentrations of Pb, Cd and Ni (µg/g ± standard deviation (sd) dry weight, n = 3) in the 7-d transplanted *G. fossarum*. Limits of quantification in gammarids (LoQ, µg/g): 0.031 for Pb; 0.015 for Cd and 0.31 for Ni. Values above the threshold values defined by Besse et al. (2013) are given in bold and grey.

Site	Geographical coordinates (LIIE)		Metal concentration in transplanted gammarids (µg/g dry weight)					
	X	Y	Pb	sd	Cd	sd	Ni	sd
GAL	567191.3147	2430343.352	6.64	1.80	0.08	0.03	1.05	0.25
BIE	591583.7303	2416828.146	4.23	1.12	0.13	0.02	1.20	0.29
ARDI	768620.398	2134169.38	0.65	0.11	1.43	0.10	<LoQ	-
GUE (reference population)	646551.1032	2425416.98	0.16	0.03	0.15	0.02	0.55	0.06
Threshold value (µg/g)			0.40		0.30		0.70	

By comparison with the threshold values defined by Besse et al. (2013), we have the evidence that the gammarid populations of GAL and BIE are highly contaminated by Pb and to a lesser extent by Ni; the population of ARDI is mainly contaminated by Cd and to a lesser extent by Pb; and the population GUE is non-impacted by metals.

For each population, adult gammarids (length of 1 cm) were collected, then transported to the laboratory, and acclimatized for 7 days at 14°C in aerated mineral water (Volvic® Ca²⁺ 11.5, Na⁺ 11.6, Mg²⁺ 8.0, K⁺ 6.2, Cl⁻ 13.5, SO₄²⁻ 8.1 mg/L and pH 7) with a 10:14-h light:dark photoperiod. Organisms were fed *ad libitum* with hornbeam leaves (*Carpinus betulus*) collected at each sampling site along with indigenous gammarids.

1.2.2. Uptake and elimination kinetic experiments

Aquatic microcosms comprised of plastic beakers were filled with 500 mL of Volvic® mineral water (with low mineral content to limit the risk of metal precipitation during exposures) and independently spiked with Cd(NO₃)₂·4H₂O, Pb(NO₃)₂ or NiSO₄·6H₂O so as to obtain nominal concentrations of 0.5 µg/L for Cd, 10 µg/L for Pb and 40 µg/L for Ni. These exposure concentrations were chosen so as to be close to the EQS values of 7.2, 0.25 and 20 µg/L, for Pb, Cd and Ni, respectively (Directive 2008/105/EC) and represent, in addition, environmentally realistic concentrations in metal-contaminated freshwaters. Each condition was performed in triplicate. So as to ensure a correct final metal exposure, each beaker was

pre-equilibrated for 48 h with the final metallic solution to saturate the potential adsorption sites on the beaker walls before performing the exposure. Then, to assess waterborne metal accumulation, fifty 24-h-starved gammarids from each population were independently introduced in the beakers for each condition without food for 7 days of exposure followed by a 7 days of depuration. During the exposure phase, water was renewed every day to ensure a constant exposure and sufficient oxygenation. During the depuration period, water was renewed only with uncontaminated Volvic[®] mineral water and hornbeam leaves were added and removed every day. A pool of five gammarids per beaker was sampled on days 0, 1, 2, 4 and 7 for the exposure phase, and on days 8 (for Ni), 9, 11 and 14 for the depuration phase. Each time, gammarids were rinsed in a solution of 2 and then 0.5 mM EDTA (ethylene-diamine tetra-acetic acid), and then rinsed twice with ultrapure water to remove metal potentially adsorbed on their cuticle (Lebrun et al., 2011) and stored at -20°C until metal analysis. At the same time, dead gammarids were counted and removed. At each sampling time, the renewed water was sampled and then acidified with HNO₃ *suprapur* at 1 % v/v to check the exposure concentrations.

1.2.3. Metal analyses

(i) Exposure concentrations in microcosms

Final metal concentrations in each microcosm were checked using a graphite furnace atomic absorption spectrophotometer (AAS; SpectrAA 220Z Varian with Zeeman background correction) and were in compliance with the nominal concentrations (9.8 ± 0.1 , 0.4 ± 0.0 and 43.9 ± 0.4 µg/L, for Pb, Cd and Ni, respectively). The quality of the analyses was checked by analyzing two certified reference materials every 20 samples (natural waters: SPS-SW1, Spectrapure standard AS Oslo and EP-L-2CR, EnviroMAT).

(ii) Metal in gammarids

For analysis, gammarids were freeze-dried (Christ Alpha 2-4 LD plus), weighed, and digested at 95°C (Digiprep Jr, SCP Science) with HNO₃ (65 % *suprapur*, Merck), H₂O₂ (*suprapur*, Merck), and diluted with ultrapure water. Cd, Pb and Ni analyses in gammarids were performed by AAS and expressed in µg/g of dry weight. For Pb, analysis was performed by standard addition to limit matrix effects. The quality of the whole analysis process of gammarids including digestion was checked every 20 samples by analyzing the two natural water certified reference materials cited above, and a certified reference material of biological tissue (CMR: Mussel Tissue ERM-CE278k). The mean concentration of each certified reference material was consistently within the certified 95 % confidence limit range for all the studied metals.

1.2.4. Biodynamic modeling of metal bioaccumulation

According to the first-order kinetic model, when organisms are exposed to metal from solution, metal bioaccumulation (C_{org} in $\mu\text{g/g}$) is defined by k_{in} (the uptake rate constant in L/g/d), k_{out} (the elimination rate constant in $1/\text{d}$), C_w (dissolved metal concentration in the water in $\mu\text{g/L}$) and t (time in $1/\text{d}$) (Eq. 1) as follows:

$$C_{org}(t) = C_w \times k_{in} / k_{out} \times (1 - \exp^{-k_{out} \times t}) \quad \text{Eq. (1)}$$

When organisms are placed in uncontaminated water (i.e., $C_w = 0$), metal elimination in the organisms is described as follows:

$$C_{org}(t) = C_{org}(0) \times \exp^{-k_{out} \times t} \quad \text{Eq.(2)}$$

where $C_{org}(0)$ is the concentration of metal in organisms at the beginning of the depuration phase ($\mu\text{g/g}$).

To determine metal-specific kinetic parameters, k_{in} and k_{out} , for each population, the kinetic model was fitted by nonlinear least square regression to the net bioaccumulation for both the exposure and the depuration phases together, since Eq. (1) and Eq. (2) share the parameter k_{out} . (R free software (R Core Team, 2013) and the 'nlstools' package (Baty et al., 2014)). Net bioaccumulation was obtained by subtracting, time by time, the metal concentrations measured in the control gammarids (non-exposed organisms in microcosms) from the total metal concentrations measured in exposed gammarids. Kinetic parameters, k_{in} and k_{out} , are given with their 95 % confidence intervals (IC 95 %) and were considered significantly different when 95 % confidence intervals did not overlap.

1.3. Results and discussion

1.3.1. Bioaccumulation kinetics

As depicted in Figure V-2, for each population, Ni and Pb concentrations in exposed gammarids increased linearly for the first 2 days of exposure, followed by progressive slowdown to finally tend towards a steady-state on day 7. During the depuration periods, previously accumulated Ni and Pb were exponentially eliminated over time. Thus, the significant accumulation of Ni and Pb by exposed gammarids observed in the present study is consistent with other experimental studies that reported the important abilities of various

populations of gammarid species *G. pulex* and *G. fossarum* to accumulate Ni and Pb (Geffard et al., 2010; Lebrun et al., 2011; Urien et al., 2015). In general, species from the genus *Gammarus* are known to efficiently accumulate metals and have been proposed as biomonitors of metal contamination in freshwaters (Besse et al., 2013; Dedourge-Geffard et al., 2009; Fialkowski et al., 2003a; Lebrun et al., 2014).

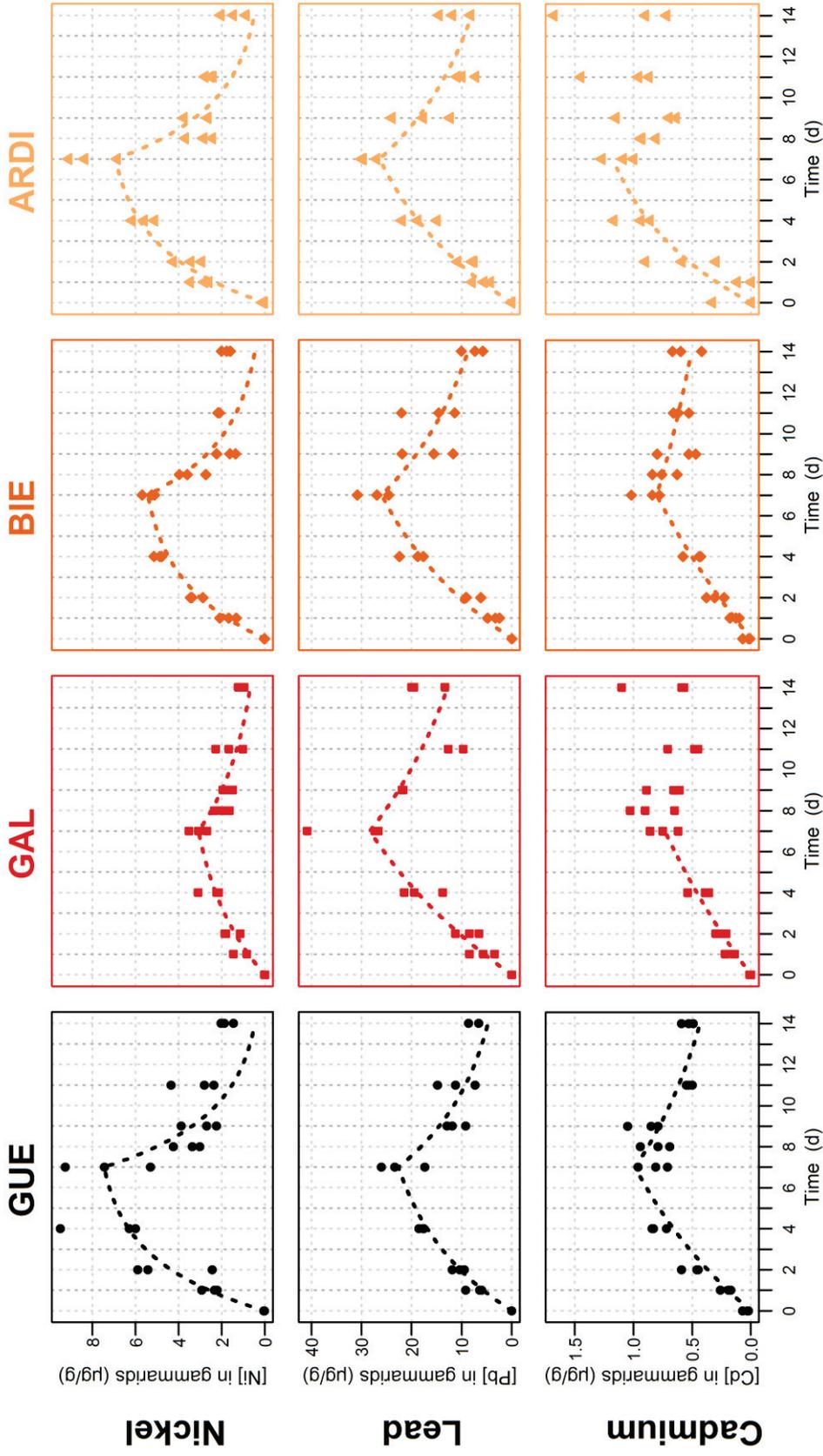


Figure V-2: Net accumulation and elimination for Ni, Pb and Cd in the reference (GUE) and impacted populations of gammarids (GAL, BIE, ARDI) ($\mu\text{g/g}$). Each point represents a pool of 5 gammarids. The dotted lines represent the best model fit of the net bioaccumulation data, when appropriate.

In the case of Cd, the concentrations of metal observed in exposed gammarids from GUE and ARDI linearly increased during the first 2 days of exposure and tended to slow down until the end of the accumulation phase. By contrast, for GAL and BIE, a linear accumulation was observed for the 7 days (Figure V-2). During the depuration phase, a slow elimination of Cd was observed for GUE and BIE, whereas no significant elimination was observed for GAL and ARDI. Unlike GUE, GAL and BIE, for which the basal Cd concentration was $0.06 \pm 0.03 \mu\text{g/g}$, with the population of ARDI, Cd concentrations at the start of experiment were 10-fold higher ($2.67 \pm 0.34 \mu\text{g/g}$, data not shown). The accumulation of Cd by gammarids reported in the present study is in agreement with the results reported by Pellet et al. (2009) in another reference population of *G. pulex*. The latter authors also reported that after the exposure, the accumulated Cd in gammarids decreased very slowly during the elimination phase and reported a Cd half-life in *G. pulex* equals to 22 days, which suggests that the 7-d depuration period applied in our study was too short to observe significant elimination of Cd. Nonetheless, these results suggest that, in gammarids, accumulated Cd was stored in relative non-labile form. Numerous studies have shown that non-essential metals, such as Cd, may be stored in detoxified forms in different subcellular fractions within aquatic invertebrates (Ahearn et al., 2004; Amiard et al., 2006; Rainbow, 2002; Roesijadi, 1992). In gammarid species, it was also reported that Cd exposure may induce the synthesis of metallothionein-like proteins (MTLP) which are low molecular mass cytosolic proteins with many thiol functional groups able to decrease intracellular metal availability by complexing them (Stuhlbacher and Maltby, 1992). More recently, Geffard et al. (2010) reported that, in the laboratory, Cd in non-exposed *G. fossarum* was present largely in the cytosol (bound to the MTLP), whereas in the exposed gammarids, a larger part of newly accumulated Cd was stored in the insoluble fraction and particularly in detoxified metal-rich granules (MRG). In marine invertebrates such as the amphipod *Echinogammarus pirloti*, Rainbow and White (1989) reported no evidence for significant elimination of accumulated Cd.

1.3.2. Comparison of the uptake and elimination rate constants

By fitting the first-order kinetic model to the bioaccumulation data presented in Figure V-2, we determined the kinetic parameters (k_{in} and k_{out}) for each population and each metal, except the Cd- k_{out} values in GAL and ARDI. In addition, as the depuration period for Cd was not optimal, the elimination rate constants determined in GUE and BIE were not accurate (wide IC 95 %) and have to be interpreted carefully. Thus, for Cd, further studies should be carried out with longer depuration periods.

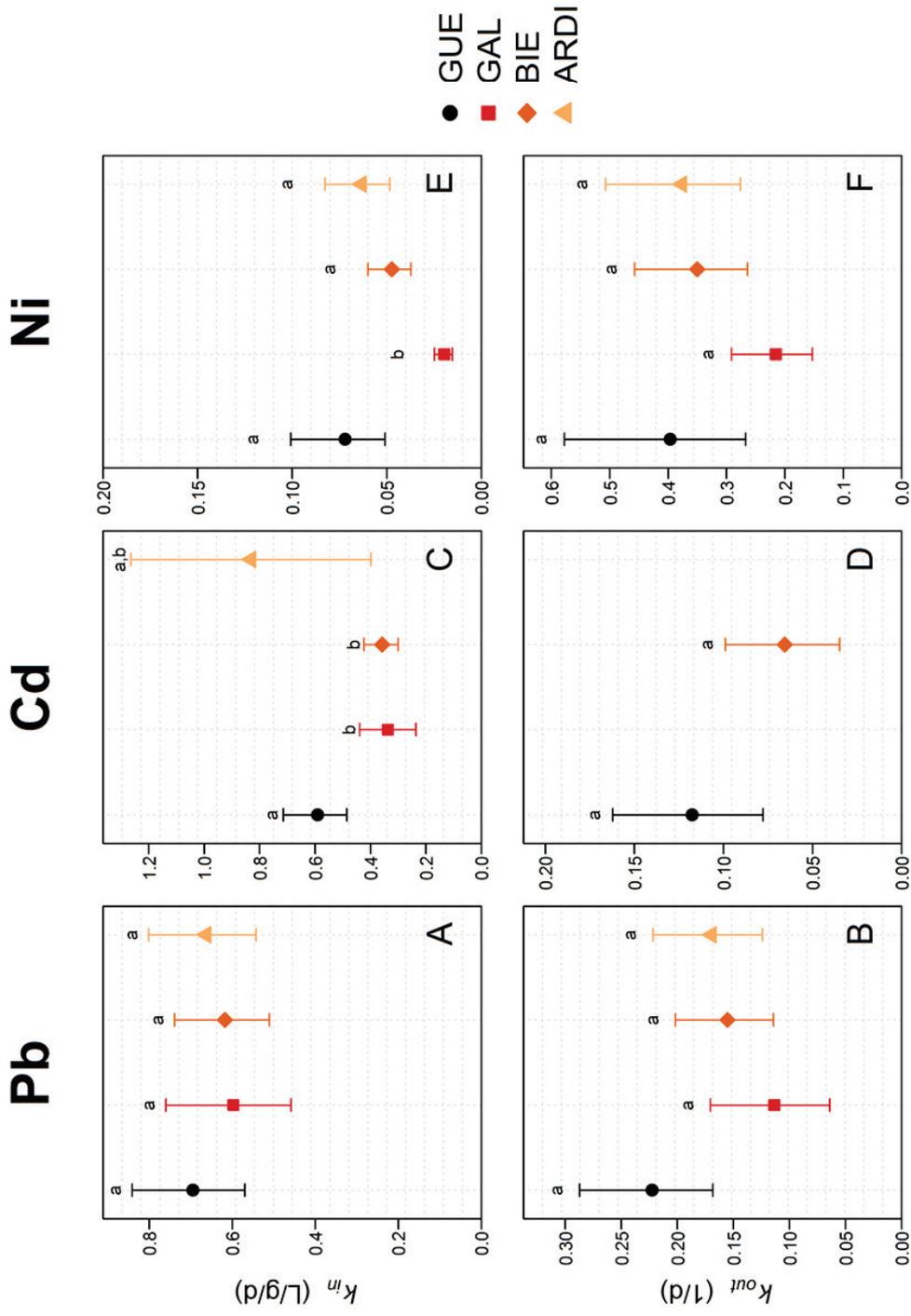


Figure V-3: Kinetic parameters, k_{in} (L/g/d) and k_{out} (1/d), determined for each metal and each population (reference population GUE and pre-exposed populations GAL, BIE and ARDI). Kinetic parameters are considered as significantly different when the 95 % CI between parameters do not overlap.

(i) Pb bioaccumulation following metal pre-exposure

The uptake rate constants of Pb determined for GAL and BIE were not significantly different from the reference population GUE (Figure V-3-A). The corresponding elimination rate constants tended to be lower than GUE, but no statistical difference was observed (Figure V-3-B). Our experimental results thus indicate that a pre-exposure to Ni and Pb had no influence on the bioaccumulation abilities of Pb in gammarids. One possible explanation is that pre-exposure to Pb was not strong enough to select for a reduction in dissolved metal uptake rates in the populations, and no specific defense mechanisms were induced. This could be linked to the fact that before observing toxicity, gammarids must be exposed to considerable amount of Pb. Indeed, Kutlu et Sümer (1998) reported that the 50 % lethal concentration of Pb after 96 h of exposure in *G. pulex* was equal to 394 µg/L. In the isopod *Asellus meridianus*, Brown (1977) observed a low decrease of the Pb uptake rates from solution in Pb-tolerant organisms but for an exposure to 500 µg/L of Pb, which is not environmentally realistic. Moreover, Geffard et al. (2010) reported that accumulated Pb by gammarids is stored in insoluble fraction, particularly in the MRG (metal-rich granules) into inert (non-toxic) form. In addition, in the literature, it has been reported that in crustaceans, such MRG can be released into the gut lumen during their feeding (Ahearn et al., 2004).

The uptake and the elimination rate constants (Figure V-3-A; 3-B) observed for ARDI were not significantly different from GUE suggesting that a pre-exposure to Cd had no influence on the Pb bioaccumulation abilities in gammarids. The lack of influence of Cd pre-exposure on Pb uptake rates suggests that gammarids cope differently with these metals. Indeed, it has been shown that in gammarids, Pb may mainly bind with the insoluble fraction (bound to MRG) whereas Cd was found in the soluble fraction (bound to MTLP) (Geffard et al., 2010). Therefore, differences in binding and storage resulted in the relatively independent bioaccumulation of Cd and Pb in gammarids. Finally, pre-exposure of gammarid species to Ni, Pb or Cd had no influence on the subsequent Pb bioaccumulation processes.

(ii) Cd bioaccumulation following metal pre-exposure

The uptake rate constant observed for ARDI exhibited a very wide IC 95 % and was not significantly different from GUE, suggesting that a pre-exposure to Cd had no effect on Cd uptake rate (Figure V-3-C). No elimination rate constant could be determined for ARDI (Figure V-3-D). These results are in agreement with those reported in marine invertebrates by Rainbow et al. (2003), who found no significant effect of Cd field-exposure on the subsequent uptake of Cd in the barnacle *Balanus amphitrite*. Similarly, in studies of Zn and Cd uptake in the marine green mussel, *Perna viridis*, neither Cd nor Zn uptake was affected by a pre-exposure to Cd and Zn (Blackmore and Wang, 2002; Shi and Wang, 2004).

The uptake rate constants determined for GAL and BIE were significantly lower than for the reference population GUE (Figure V-3-C), whereas for the elimination rate constants, the situation was somewhat complicated; no statistical difference between the elimination rate constants for GUE and BIE had been found and no elimination rate constant for GAL could be determined (Figure V-3-D). Our results showed that a pre-exposure to one metal (here, Ni or Pb) may affect the accumulation of another metal (here Cd). One possible explanation could be that a pre-exposure to Ni and Pb would damage the pathways through which Cd enters the cells of gammarids. Indeed, it has been found that Ni exposure causes toxicity to some aquatic organisms via Mg^{2+} and Ca^{2+} disruption, in both acute and chronic exposure (Niyogi et al., 2014; Pane et al., 2003). At the same time, it is well documented that Cd may enter cells through Ca^{2+} channels as it acts as a Ca^{2+} analog (Buchwalter et Luoma, 2005). Therefore, the reduced uptake of Cd observed in gammarids from GAL and BIE could be a consequence of the modification of Ca^{2+} channels after a chronic exposure to Ni. Surprisingly, no similar observation was previously made with Pb uptake which is, thought to preferentially enter cells via Ca^{2+} channels (Macdonald et al., 2002).

(iii) Ni bioaccumulation following metal pre-exposure

Neither the uptake rate constant (Figure V-3-E) nor the elimination rate constant of ARDI (Figure V-3-F) was significantly different from GUE. These results indicate that a pre-exposure to Cd had no effects on subsequent Ni bioaccumulation processes. The lack of influence of Cd pre-exposure on the bioaccumulation of Ni suggests that Ni storage was not related to MTLP induction as for Cd. In gammarids, it has been reported that Ni was mainly found in the insoluble fraction in control group, and Ni was equally distributed between the cytosolic and insoluble fractions when organisms were exposed (Geffard et al., 2010). Therefore, this differential binding of Ni and Cd in gammarids may be an explanation for the absence of significant influence of Cd pre-exposure to Ni uptake.

The uptake rate constants for GAL and BIE were lower than GUE, although the difference was not significant for BIE (Figure V-3-E). Unlike BIE, the elimination rate constant for GAL tended to be lower than GUE but no statistical difference was observed (Figure V-3-F). These results suggest that gammarids pre-exposed to Ni and Pb had adapted by reducing their Ni uptake. Moreover, we observed that the suppressing effect of a pre-exposure to Ni and Pb on the Ni kinetic parameters was more important in the GAL population, which was the most impacted by Pb contamination (see Table V-1). One possible reason could be a reduced permeability of the membranes of gammarids as reported in Zn-tolerant polychaetes (Bryan and Hummerstone, 1973). In the same vein, a study of Pane et al. (2003) reported that Ni exposure appears to cause excess mucus secretion or gill cell swelling in the rainbow trout. In addition, Brown (1977) suggested a reduce number of binding sites for explaining reduce Pb accumulation in the *Asellus meridianus*. Little is known about the mechanisms underlying Ni uptake in aquatic organisms and this metal deserves to be investigated more deeply.

The comparative use of kinetic model showed that it was possible to identify contaminated population of gammarids. Indeed, in previous studies, the kinetic parameters of Ni and Pb had been determined in a population of *G. pulex*, with k_{in} and k_{out} values of 0.03 L/g/d and 0.13 1/d, respectively for Ni and with k_{in} and k_{out} values of 1.01 L/g/d and 0.33 1/d for Pb, respectively (Lebrun et al., 2011; Urien et al., 2015). By using the Besse et al. (2013) transplantation approach, we determined that this population was contaminated with Ni. (results of metal accumulation in transplanted gammarids are presented in Table S V-2 in SI). This result was confirmed by the comparison of the kinetic parameters determined for this population of *G. pulex* with the kinetic parameters determined in each of our contaminated populations. Indeed, we observed that they were similar to the kinetic parameters determined for the population GAL which is impacted with Ni and Pb. Moreover, the Pb kinetic parameters for this population of *G. pulex* were not significantly different from those determined in the present study, which supports the fact that a previous field exposure to Ni in gammarids did not affect Pb bioaccumulation abilities.

The bioaccumulation factor kinetic BCF_k is defined as the ratio k_{in}/k_{out} and translates the bioaccumulation abilities of the organisms at the theoretical steady-state (Clason 2004). The BCF_k is given for each contaminated and non-contaminated population in Table V-2. By comparison with the reference population GUE, we confirm that a contamination with Ni and Pb (GAL and BIE) involved reduced Ni bioaccumulation, but had a low enhancing effect on Pb bioaccumulation (translated by the lowered k_{out} but values were not statistically different from GUE, Figure V-3). A contamination with Cd (ARDI) had no impact on Ni (and Cd) bioaccumulation as previously mentioned, but had a slight enhancing effect on Pb bioaccumulation. These results thus confirm that metal field-exposure history affects the bioaccumulation abilities of gammarids, highlighting the importance to well characterize the population for a reliable interpretation of the bioaccumulation.

Table V-2: BCF_k (k_{in}/k_{out} ratio) for each population of the present study GUE, GAL, BIE and ARDI.

		<i>Ni</i>	<i>Pb</i>	<i>Cd</i>
	GUE (reference population)	0.19	3.1	5.03
BCF_k	GAL	0.10	5.3	NA
	BIE	0.14	4.0	5.45
	ARDI	0.18	4.0	NA

1.4. Conclusion

The present study has shown that the metal field-exposure history of gammarids affects their metal accumulation capacity. Moreover, the pre-exposure to one metal may affect the

bioaccumulation of another metal. These findings emphasize that, for reliable interpretation of the bioaccumulation in gammarids, it is important to well characterize the test population used for calibrating kinetic models in the laboratory. These findings also showed that, comparison of the kinetic parameters could be used to discriminate metal contaminated from non-contaminated populations, and is also an interesting tool to highlight modulation in metal bioaccumulation among populations. Finally, as bioaccumulation processes in contaminated gammarids seem to involve a variety of underlying mechanisms, further studies aiming at controlling the pre-exposure in the laboratory would be appropriate.

Acknowledgment

The authors thank Adeline François for her valuable help both in field and logistic.

1.5. Supporting information

Table S V-1: Uptake rate constant (k_{in} , in L/g/d) and elimination rate constant (k_{out} , in 1/d) determined for each metal in each population. Values are given with their 95 % confidence intervals. For each metal, values sharing a common letter are not significantly different.

	Uptake			Elimination		
	k_{in} (L g ⁻¹ d ⁻¹)	95% I.C.		k_{out} (d ⁻¹)	95% I.C.	
<i>Ni</i>						
GUE	0.073	[0.052 - 0.102]	<i>a</i>	0.387	[0.260 - 0.564]	<i>a</i>
GAL	0.020	[0.016 - 0.026]	<i>b</i>	0.209	[0.146 - 0.284]	<i>a</i>
BIE	0.048	[0.038 - 0.061]	<i>a</i>	0.339	[0.253 - 0.446]	<i>a</i>
ARDI	0.065	[0.049 - 0.084]	<i>a</i>	0.361	[0.264 - 0.488]	<i>a</i>
<i>Pb</i>						
GUE	0.699	[0.573 - 0.845]	<i>a</i>	0.222	[0.168 - 0.286]	<i>a</i>
GAL	0.600	[0.461 - 0.762]	<i>a</i>	0.114	[0.064 - 0.170]	<i>a</i>
BIE	0.621	[0.514 - 0.742]	<i>a</i>	0.155	[0.115 - 0.201]	<i>a</i>
ARDI	0.669	[0.548 - 0.807]	<i>a</i>	0.169	[0.124 - 0.220]	<i>a</i>
<i>Cd</i>						
GUE	0.591	[0.485 - 0.714]	<i>a</i>	0.118	[0.078 - 0.162]	<i>a</i>
GAL	0.337	[0.235 - 0.439]	<i>b</i>	NA		
BIE	0.358	[0.300 - 0.423]	<i>b</i>	0.066	[0.035 - 0.099]	<i>a</i>
ARDI	0.832	[0.398 - 1.265]	<i>a,b</i>	NA		

Table S V-2: Concentration of Pb, Cd and Ni ($\mu\text{g/g} \pm$ standard deviation (*sd*) dry weight, $n = 3$) in 7-d transplanted gammarids (Besse et al (2013) transplantation protocol). Limits of quantification (LoQ, $\mu\text{g/g}$): 0.031 for Pb; 0.015 for Cd and 0.31 for Ni. Values above the threshold values defined by Besse et al. (2013) are given in bold and grey.

Site	Metal concentration in transplanted gammarids ($\mu\text{g/g}$ dry weight)					
	Pb	<i>sd</i>	Cd	<i>sd</i>	Ni	<i>sd</i>
G. pulex (Lebrun et al. 2011)	0.28	0.10	0.29	0.01	1.23	0.25
Threshold value ($\mu\text{g/g}$)	0.40		0.30		0.70	

2. Capacité de bioaccumulation des métaux chez des gammarex naïfs acclimatés à long terme en laboratoire au Pb ou au Cd.

Introduction

Un des facteurs pouvant influencer les capacités de bioaccumulation des métaux chez les organismes est la pré-exposition à une contamination métallique. Chez les gammarex, il a été précédemment montré que des populations résidant dans des milieux soumis à une contamination métallique chronique pouvaient moduler leurs capacités à accumuler les métaux. Cependant, les mécanismes physiologiques sous-jacents sont difficiles à identifier en raison de la multiplicité des facteurs environnementaux susceptibles d'influencer la bioaccumulation dans les milieux (facteurs physicochimiques, multi-contamination, etc.). C'est pourquoi il est pertinent d'étudier les capacités d'accumulation et d'élimination des métaux chez des organismes dont la contamination est connue et contrôlée en laboratoire. Le travail présenté dans ce chapitre a pour but d'évaluer les capacités d'accumulation et d'élimination des métaux chez des gammarex « naïfs » acclimatés en laboratoire à une contamination métallique faible et pendant plusieurs mois (Cd et Pb). Pour ce faire, des organismes issus d'une population de référence et suivie depuis plusieurs années ont été prélevés. Au laboratoire, ces organismes naïfs ont été exposés à long terme (10 semaines) à 5 µg/L de Pb ou bien à 0.25 µg/L de Cd. À l'issue de cette période d'acclimatation, des cinétiques de bioaccumulation pour le Cd, le Ni et le Pb ont été réalisées afin de déterminer les constantes d'accumulation et d'élimination du modèle cinétique, pour chaque couple métal/organismes pré-exposés.

2.1. Bref rappel du « Matériels et méthodes »

L'expérimentation s'est déroulée en deux étapes : (i) exposition long terme de gammarex naïfs (issus de la population de référence GUE) à une faible concentration de Cd ou bien de Pb, puis (ii) réalisation de cinétiques d'accumulation et de dépuraction chez ces organismes pré-exposés pour le Cd, le Ni, le Pb, afin d'estimer les paramètres k_{in} et k_{out} du modèle cinétique.

2.1.1. Exposition long terme des gammares naïfs au Cd ou au Pb (en laboratoire)

Des gammares naïfs ont été répartis dans trois mésocosmes, chacun correspondant à une condition d'acclimatation qui a duré 10 semaines:

(i) la condition qui consiste à ne pas acclimater les gammares naïfs aux métaux et qui constitue la population « **témoin** »,

(ii) la condition qui consiste à acclimater les gammares naïfs à une concentration de Cd à 0.25 µg/L, afin d'obtenir des organismes qui seront nommés « **pré-exposés au Cd** »,

(iii) et la condition qui consiste à acclimater les gammares naïfs à une concentration de Pb à 5 µg/L, afin d'obtenir des organismes « **pré-exposés au Pb** ».

Durant les 10 semaines d'acclimatation, les milieux d'exposition ont été renouvelés d'un tiers tous les deux jours et l'intégralité des milieux d'exposition a été renouvelée toutes les deux semaines. Parallèlement, de l'eau a été prélevée afin de suivre les concentrations d'exposition en métal dissous. Toutes les deux semaines, quatre réplicats de 5 gammares ont été prélevés par condition d'acclimatation pour suivre la bioaccumulation des métaux dans le temps. Après 10 semaines d'acclimatation, les organismes de chaque condition ont été placés dans des milieux non contaminés pendant 5 jours, de façon à ce qu'ils retrouvent une concentration basale. Les gammares n'ont plus été nourris 24 h avant le début des cinétiques de bioaccumulation.

2.1.2. Cinétiques de bioaccumulation en microcosmes

Les gammares « **témoins** », « **pré-exposés au Cd** » et « **pré-exposés au Pb** » ont été introduits dans des microcosmes (bêchers) et exposés pendant 6 jours, à 0.5 µg/L de Cd, 10 µg/L de Pb ou bien à 40 µg/L de Ni. Cette phase d'accumulation a été immédiatement suivie d'une phase de 7 jours de dépuración, durant laquelle les gammares n'ont plus été exposés aux métaux et la nourriture a été réintroduite. Parallèlement, des gammares ont été placés dans des bêchers contenant de la Volvic® non-contaminée afin de constituer les « contrôles » de cette expérience.

2.2. Résultats

2.2.1. Exposition long terme des gammares naïfs au Cd ou au Pb

(i) Suivi des concentrations en Cd et en Pb dissous dans les mésocosmes

Durant 10 semaines d'acclimatation, les concentrations en Cd et en Pb dissous dans le milieu témoin étaient négligeables (respectivement inférieures à la LoQ (0.01 µg/L) et égales à 0.07 ± 0.04 µg/L (LoQ = 0.01 µg/L, n = 54) (Figure V-4 – « Témoins »).

Pendant l'acclimatation au Cd, la concentration d'exposition finale moyenne en Cd dissous était égale à 0.17 ± 0.10 µg/L (n =48). Cette concentration est inférieure à la concentration d'exposition théorique (0.25 µg/L), certainement due à la complexation de l'ion Cd à différentes molécules complexantes du milieu, en particulier à la nourriture et à la matière organique. Un horsain a été observé au jour 14 à environ 0.50 µg/L, ce qui peut être dû à une contamination accidentelle des échantillons, lors de l'acidification pour analyse (Figure V-4).

Dans le cas de l'acclimatation au Pb, on observe que les concentrations de Pb dissous fluctuent dans le temps entre 1 et 3 µg/L, à l'exception de deux mesures à environ 5 µg/L et 7 µg/L. La concentration finale d'exposition moyenne en Pb dissous durant l'acclimatation est égale à 2.2 ± 1.6 µg/L (n=56). Là encore la différence avec la concentration d'exposition théorique est probablement due à la complexation de l'ion Pb^{2+} dans le milieu (Figure V-4).

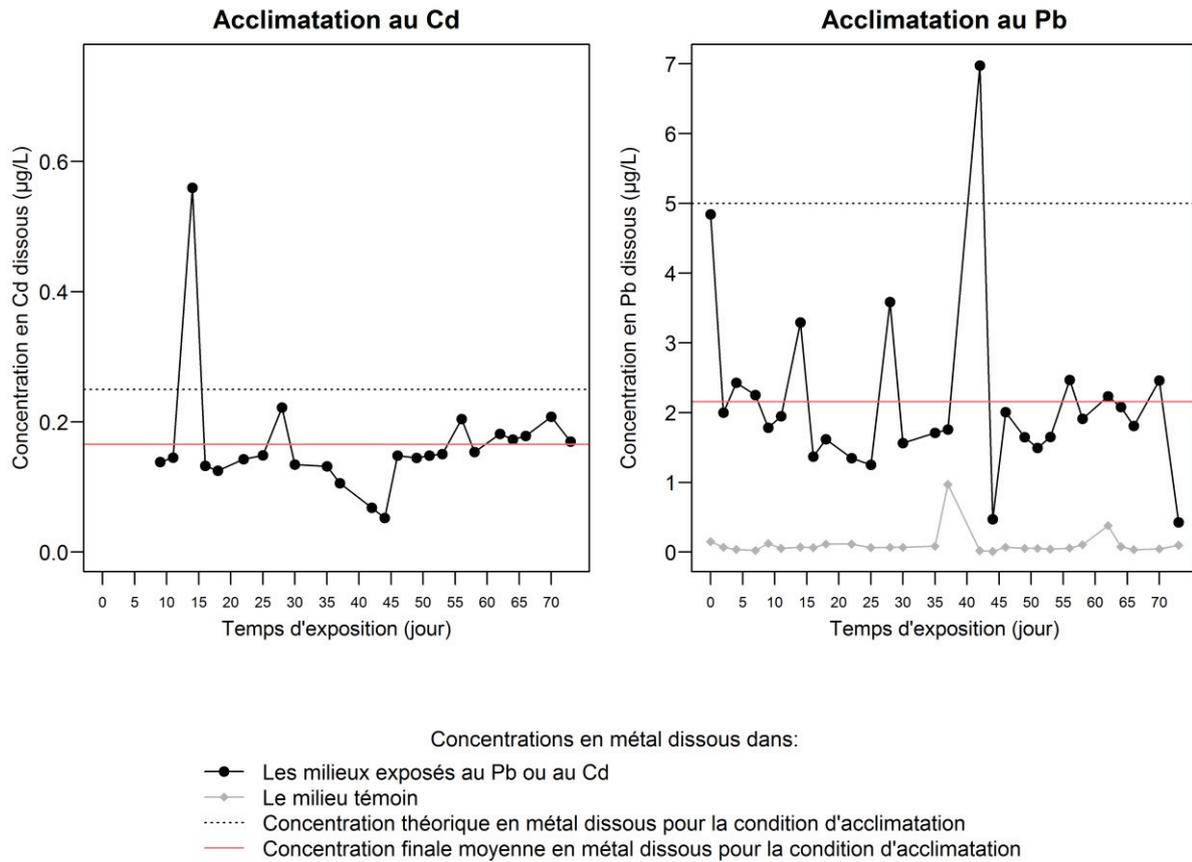


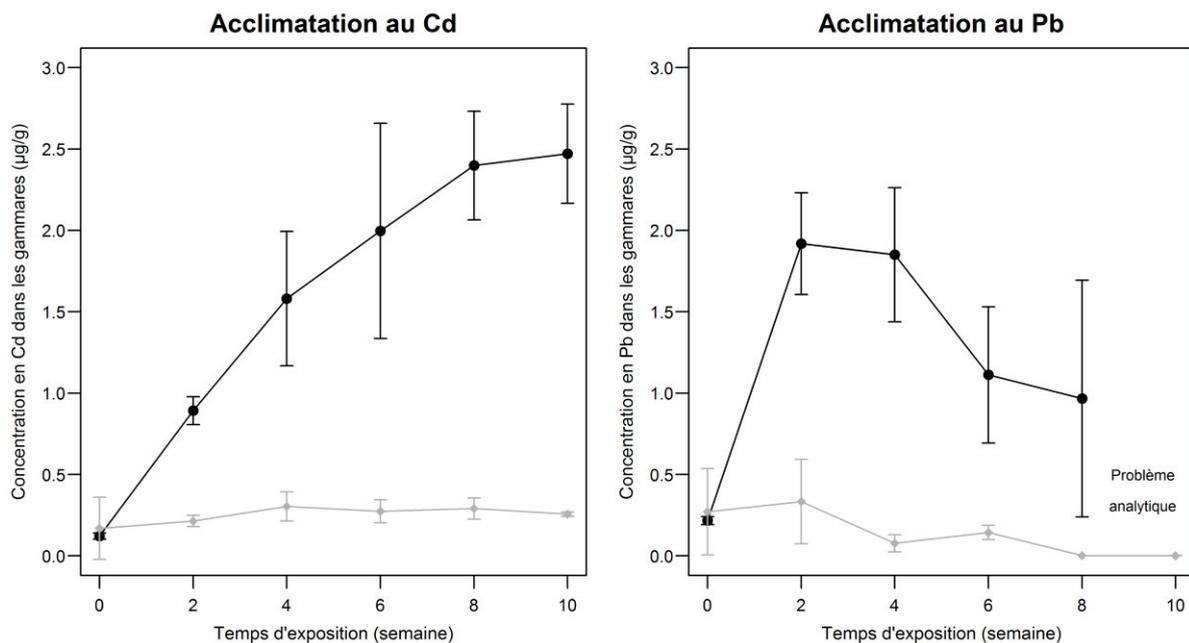
Figure V-4: Concentrations en métal dissous des milieux d'exposition pendant l'acclimation de 10 semaines (ou 73 jours) au Pb ou au Cd. Chaque point représente un prélèvement.

(ii) Suivi des concentrations en Pb et en Cd dans les gammares pendant l'acclimatation

Le suivi des concentrations métalliques dans les gammares témoins durant l'acclimatation ont permis d'estimer une concentration basale interne, en ces deux métaux, égales à $0.25 \pm 0.10 \mu\text{g/g}$ de Cd et $0.21 \pm 0.33 \mu\text{g/g}$ de Pb.

Durant l'acclimatation au Cd, les concentrations internes de Cd dans les gammares augmentent rapidement pendant les quatre premières semaines. Ensuite, l'accumulation du Cd ralentit progressivement jusqu'à la 8^{ème} semaine, pour enfin tendre vers un plateau autour de $2.5 \mu\text{g/g}$ en fin d'acclimatation (10^{ème} semaines) (Figure V-5).

Au contraire, pendant l'acclimatation au Pb, les concentrations de Pb accumulées par les gammares augmentent très rapidement pendant les deux premières semaines, jusqu'à atteindre un maximum à environ $2 \mu\text{g/g}$. Ensuite, les concentrations internes de Pb se stabilisent entre les 2^{ème} et 4^{ème} semaines, puis tendent à diminuer progressivement (Figure V-5).



Concentrations de métal dans les gammares :

- Acclimatés au Cd ou au Pb
- ◆ Témoins

Figure V-5: Concentrations en Cd ou en Pb internalisées dans les gammares durant l'acclimatation au Cd ou au Pb. Chaque point représente la moyenne de 4 réplicats de 5 gammares chacun (les barres d'erreur représentent \pm l'écart type).

Ces résultats montrent que chez le gammare, les mécanismes intervenant dans la gestion du Cd et du Pb sont différents. En effet, dans le cas du Pb, les gammares semblent favoriser une stratégie visant à réduire les teneurs en Pb accumulées dans leurs tissus, tandis que dans le cas du Cd, les gammares semblent mettre en place des mécanismes de stockage du métal. De plus, les mécanismes de régulation du Pb se mettent en place rapidement (après deux semaines d'acclimatation) alors que dans le cas du Cd, les organismes ne semblent atteindre un état-stationnaire avec le milieu qu'à la fin de la période d'acclimatation, i.e. entre 8 et 10 semaines.

Dans la littérature, de nombreuses études ont montré que chez les invertébrés aquatiques, le Cd accumulé était préférentiellement stocké sous forme complexée à des métallothionéines (MTPL), situées dans la fraction cytosolique des cellules (Amiard et al., 2006; Roesijadi, 1992; Vijver et al., 2004). Chez certains crustacés, il a même été rapporté que le Cd pouvait être accumulé sans jamais être excrété (Rainbow and White, 1989). Dans d'autres circonstances, et notamment dans le cas de fortes contaminations, le Cd lié au MTPL peut cependant être déposé dans la fraction insoluble, puis être pris en charge par les lysosomes, et progressivement éliminé via le tractus digestif (Rainbow, 2002). Plus récemment, une étude de Geffard et al. (2010) a montré chez *G. fossarum*, que les organismes non exposés stockaient le Cd dans la fraction cytosolique, tandis que chez les organismes exposés, le Cd nouvellement accumulé était majoritairement retrouvé dans la fraction insoluble. Dans la présente étude, de tels mécanismes d'excrétion ne semblent pas être mis en jeu après 10 semaines d'acclimatation. Afin de mieux caractériser les mécanismes impliqués dans le stockage du Cd, il serait intéressant d'analyser la répartition de ce métal dans les différents compartiments cellulaires du gammare. Des analyses en ce sens sont d'ailleurs envisagées.

Le cas du Pb est singulier. La diminution des concentrations métalliques dans les organismes après 2 semaines d'acclimatation suggèrent que les gammares seraient capables de le réguler. Ces résultats contredisent les observations faites dans la littérature jusqu'à présent. En effet, le Pb est un métal non essentiel et sa régulation par les organismes aquatiques n'a pas été rapportée. Toutefois, les données disponibles dans la littérature concernent soit des cinétiques d'exposition de courtes durées (1 à 2 semaines) (MacLean et al., 1996) ; soit des études sur du long terme, mais pour lesquelles, les teneurs accumulées ont été déterminées uniquement au départ et à la fin de l'exposition (Borgmann et al., 1993). Une étude de Mulliss et al. (1996) a suivi quotidiennement les concentrations en Pb (et en Cd) chez *G. pulex* exposés durant 36 jours dans un rejet d'effluent urbain. Les auteurs ont observé une augmentation d'un facteur 8 des concentrations accumulées de Cd et de Pb dans les organismes, sans noter de tendance à réguler le Pb. Dans une autre étude, les concentrations en Pb chez *G. pulex*, encagés en amont et en aval d'un exutoire d'orage, ont été suivies chaque semaine pendant 7 semaines (Bascombe et al., 1990). Les auteurs ont observé que le métal était accumulé linéairement et qu'un état-stationnaire était atteint au bout de 4 semaines d'exposition. Sur le site le plus en aval, des concentrations de 130 µg/g

ont été enregistrées dans les organismes et aucune tendance à la diminution n'a été rapportée.

Chez les invertébrés aquatiques, y compris le genre *Gammarus*, le Pb est préférentiellement distribué dans la fraction insoluble, dans laquelle il est stocké dans des granules riches en métal (MRG) (Geffard et al., 2010). Ensuite ces granules sont transportées dans les lysosomes et progressivement éliminées dans le tractus digestif (Ahearn et al., 2004; Correia et al., 2002; Rainbow, 2002).

Ces résultats soulèvent des interrogations, à la fois sur la pertinence des modèles cinétiques calibrés en laboratoire sur une semaine d'exposition, et sur la pertinence du gammare pour suivre la contamination du milieu pour le Pb. Afin de compléter le présent travail, des études visant à évaluer si la diminution des concentrations en Pb mesurées dans les gammares est due à une augmentation de l'élimination ou bien à une diminution de la prise seraient nécessaires afin d'approfondir les connaissances sur les mécanismes physiologiques à l'origine de la régulation du Pb chez le gammare, et de confirmer ces résultats.

2.2.2. Cinétiques de bioaccumulation en microcosmes

Suite à la période d'acclimatation (10 semaines), les gammares ont été introduits dans des milieux non contaminés pendant 5 jours, de façon à ce qu'ils retrouvent des concentrations métalliques basales. À l'issue de ces 5 jours, les résultats ont montré que les gammares acclimatés au Pb retrouvaient une concentration basale identique à celle observée au début de l'acclimatation, ce qui montre leur forte capacité d'élimination. Ces résultats corroborent ceux observés par Kutlu et al. (2002) chez *G. pulex*. Dans le cas du Cd, les gammares acclimatés au Cd n'ont pas dépuré durant ces 5 jours et une concentration de Cd dans les gammares d'environ 2.5 µg/g a été mesurée, ce qui confirme leur capacité à stocker ce métal sous une forme qui résiste à l'élimination.

Ensuite, les cinétiques de bioaccumulation ont été réalisées en microcosmes, où les gammares ont été exposés durant 6 jours au Cd, au Ni ou au Pb, puis placés dans un milieu non contaminé pour la phase de dépuration. Les concentrations en métal dissous, auxquelles les gammares ont été exposés durant la phase d'accumulation de 6 jours, sont données dans le Tableau V-I. Ces concentrations sont en conformité avec les concentrations nominales théoriques.

Tableau V-I: Concentrations finales d'exposition en Ni, Pb et Cd dissous dans les microcosmes (bêchers) pendant la phase d'accumulation.

Gammares	Concentration d'exposition ($\mu\text{g/L}$)					
	Ni		Pb		Cd	
	Moyenne	écart-type	Moyenne	écart-type	Moyenne	écart-type
Témoins	37.7	0.6	9.22	0.41	0.52	0.02
Pré-exposés au Pb	38.0	0.5	9.4	0.34	0.51	0.01
Pré-exposés au Cd	37.0	3.2	9.41	0.22	0.51	0.01

(i) Cinétiques d'accumulation et de dépuraton

La Figure V-6 présente les cinétiques d'accumulation et de dépuraton du Ni, du Pb et du Cd chez les gammares « **témoins** », « **pré-exposés au Pb** » et « **pré-exposés au Cd** ». Pour chaque métal et chaque condition, il s'agit de la concentration nette accumulée dans les gammares, c'est-à-dire supérieure à la concentration de métal mesurée dans les organismes au début de la cinétique de bioaccumulation ($t = 0$).

L'observation des cinétiques de bioaccumulation du Ni montre, qu'indépendamment de la condition d'acclimatation, les organismes accumulent significativement et de façon similaire le Ni dans le temps. Ensuite, lorsque les organismes sont placés dans un milieu non contaminé (phase de dépuraton), le Ni préalablement accumulé est progressivement éliminé.

En ce qui concerne les cinétiques du Pb, les résultats montrent que, quelle que soit la condition d'acclimatation, les gammares accumulent significativement le Pb dans le temps et ce de manière similaire à ce qui a été précédemment observé dans les chapitre III.1, IV et V.1. Durant la dépuraton, les gammares éliminent progressivement le Pb, mais de manière non significative pour la population « **pré-exposés au Cd** ». Ces résultats suggèrent que l'acclimatation au Cd influence la capacité des gammares à éliminer le Pb, mais ces résultats restent à confirmer en raison de la variabilité observée entre les réplicats.

Concernant les cinétiques du Cd, les résultats montrent une accumulation significative de ce métal chez les gammares « **témoins** » et « **pré-exposés au Pb** ». En revanche aucune élimination n'a été observée. Ces résultats sont en accord avec ceux précédemment observés dans chapitres IV et V.1, où pour une grande majorité des populations de gammares étudiées, aucune élimination significative n'avait été observée. En revanche, chez les gammares « **pré-exposés au Cd** », où les concentrations tissulaires au début de la cinétique étaient en moyenne égales à $2.5 \mu\text{g/g}$, aucune accumulation n'a été observée, suggérant qu'une exposition à $0.5 \mu\text{g/g}$ n'était pas assez élevée. Pourtant, dans le chapitre

V.1, une accumulation nette de Cd avait été observée chez les gammarés provenant d'une population contaminée au Cd (ARDI), et qui comme dans cette étude, avaient une concentration interne avant le début de la cinétique de bioaccumulation d'environ 3 µg/g. Cette différence pourrait être due aux différentes méthodologies mises en place entre ces deux études, à savoir que dans le chapitre V.1, les organismes ont été pêchés, puis ont subi des cinétiques d'exposition après 5 jours d'acclimatation à la Volvic, tandis que dans la présente étude, les organismes ont été maintenus 10 semaines en armoire thermostatée.

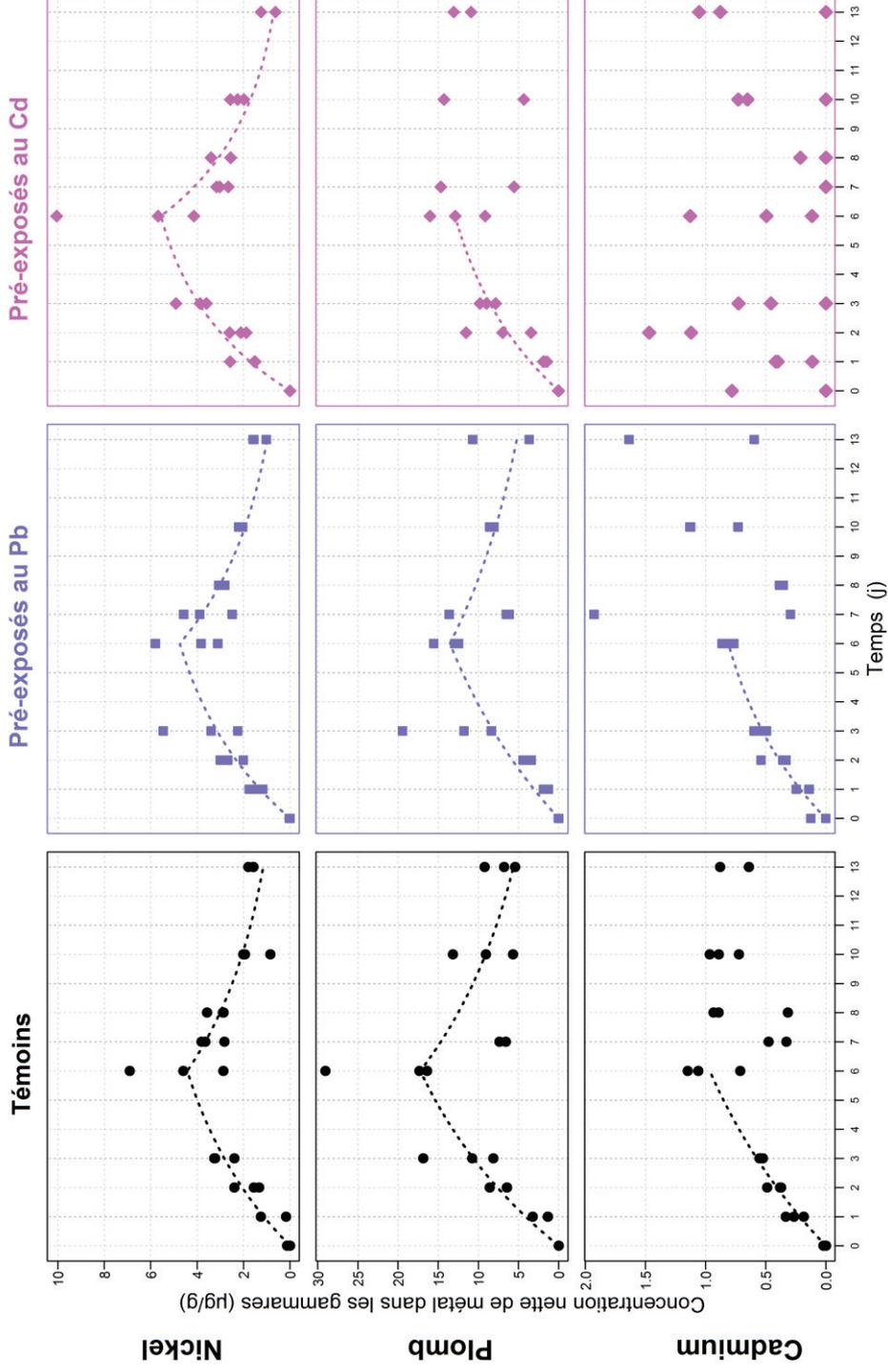


Figure V-6: Cinétique d'accumulation et de dépuraton du Ni, du Pb et du Cd chez le gammare en fonction de leur exposition long terme. Chaque point représente un réplicat de 5 individus. Les courbes pointillées sont le meilleur ajustement du modèle cinétique aux données de bioaccumulation nette.

(ii) Paramètres du modèle cinétiques

La détermination et la comparaison des constantes d'accumulation et d'élimination du Ni, du Pb et du Cd chez les gammares « témoins », « pré-exposés au Pb » et « pré-exposés au Cd », présentée sur la Figure V-7, montrent que l'acclimatation long terme des gammares au Pb ou au Cd n'a pas eu d'influence sur leur capacité d'accumulation et d'élimination du Ni, du Pb et du Cd.

Ces résultats confirment l'absence d'effet d'une contamination au Pb sur la bioaccumulation du Pb chez les gammares déjà observée dans le chapitre V.1. En revanche, ces résultats diffèrent de ceux présentés dans le chapitre V.1, où il avait été montré que des gammares contaminés au Pb et au Ni (BIE et GAL) réduisaient leur capacité d'accumulation en Ni et en Cd.

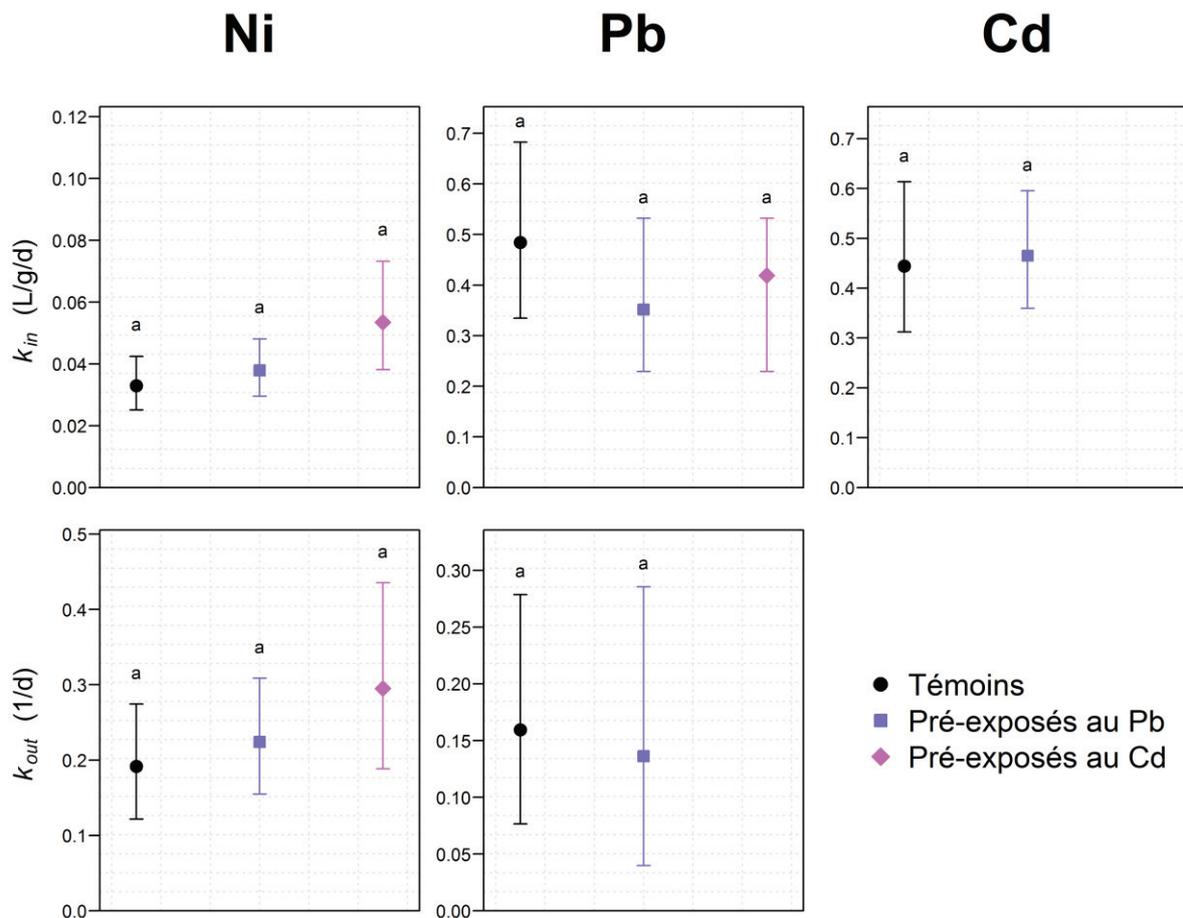


Figure V-7: Constantes cinétiques d'accumulation (k_{in} en L/g/d) et d'élimination (k_{out} en 1/d) du Ni, du Pb et du Cd chez des gammares « témoins », « pré-exposés au Pb » ou « pré-exposés au Cd ». Les valeurs des paramètres sont données avec un intervalle de confiance à 95 %. Pour chaque métal, des paramètres sont considérés comme significativement différents si leurs intervalles de confiance ne se chevauchent pas.

Ces résultats suggèrent que les changements physiologiques mis en place durant l'acclimatation long terme pour lutter contre le stress métallique (stockage du Cd, régulation du Pb) ont été perdus durant les 5 jours de stabulation des gammares afin qu'ils retrouvent des concentrations basales. En effet, l'acclimatation est un phénomène qui peut être réversible, et les mécanismes de défense acquis durant une exposition des individus au cours de leur vie peuvent être perdus lorsque l'exposition cesse (Amiard-Triquet et al., 2011). Cette période de stabulation de 5 jours des organismes a également été appliquée aux gammares contaminés dans l'étude du chapitre V.1, entre la pêche des individus depuis leur milieu contaminé et la réalisation des cinétiques de bioaccumulation. Pourtant, une diminution de l'accumulation du Ni et du Cd a été observée chez les gammares chroniquement exposés au Pb et au Ni dans leur milieu naturel. Les résultats du chapitre V.1 suggèrent que les gammares, qui ont été exposés à la contamination dans leur milieu tout au long de leur vie et ce depuis plusieurs générations, se seraient acclimatés de manière irréversible. Des études complémentaires visant à déterminer si le changement de comportement des gammares vis-à-vis de la bioaccumulation des métaux est le fruit d'une adaptation génétique ou non pourraient être envisagées.

2.3. Conclusions et perspectives

Les résultats de cette étude ont montré que les gammares adoptaient différentes stratégies pour lutter contre une exposition long terme au Pb et au Cd à faible dose, et que le Pb semble être régulé par les organismes, ce qui va l'encontre des observations faites dans la littérature.

L'absence d'effet observé de l'acclimatation au Pb ou au Cd sur la bioaccumulation du Ni, du Pb ou bien du Cd suggère que les mécanismes mis en place pour lutter contre le stress métallique soient réversibles ou que les pressions métalliques soient trop faibles pour la mise en place de ces mécanismes. Aussi des études complémentaires sont nécessaires afin d'approfondir les connaissances sur les mécanismes physiologiques gouvernant la bioaccumulation des métaux. Il serait également intéressant d'étudier la répartition subcellulaire des métaux dans les organismes au cours de l'acclimatation puis des cinétiques de bioaccumulation pour mieux comprendre le comportement des métaux une fois internalisés et expliquer les différences observées ou non entre les différents paramètres d'accumulation et d'élimination des métaux chez le gammare.

CHAPITRE VI

VI. Discussion générale

1. Intérêt du gammare pour le suivi de la contamination métallique biodisponible dans les milieux aquatiques

L'un des principaux critères, sur lequel repose le choix d'une espèce pour le suivi de la contamination chimique dans le milieu aquatique, est sa capacité à accumuler les contaminants (Beeby, 2001; Rainbow, 2002). Dans ce travail de thèse, les cinétiques d'accumulation des métaux réalisées en conditions contrôlées de laboratoire (cf. chapitres III.1, IV et V) ainsi que le suivi de la bioaccumulation chez des gammares autochtones et transplantés *in situ* (chapitre III) confirment que ces amphipodes sont capables d'accumuler significativement le Pb, le Ni et le Cd, pour des concentrations d'exposition environnementales. Ces résultats corroborent les fortes capacités d'accumulation des métaux (Pb, Ni et Cd) déjà observées chez *G. pulex* et *G. fossarum* en laboratoire (Geffard et al., 2010; Lebrun et al., 2011; Pellet et al., 2014, 2009), mais également *in situ* lors d'expérimentations de transplantation (Dedourge-Geffard et al., 2009; Lebrun et al., 2015). De manière générale, les gammares sont connus pour être de bons accumulateurs de métaux et ont déjà fait l'objet de campagnes de suivi de la contamination métallique des milieux (Amyot et al., 1996; Besse et al., 2013; Fialkowski et al., 2003b; Khan et al., 2011; Schaller et al., 2011).

Jusqu'à présent, la mise en place de suivis de la contamination des milieux, via l'utilisation de gammares transplantés, concernait un nombre restreint de cours d'eau (maximum 27 sites dans le bassin du Rhône dans l'étude de Besse et al. (2013) par exemple). De plus, ces sites appartiennent à un seul bassin versant, aux propriétés géochimiques homogènes, ce qui limite par conséquent l'impact des facteurs physicochimiques dans l'interprétation des données de bioaccumulation. Dans ce travail de thèse, un suivi de l'accumulation des métaux dans des gammares transplantés à l'échelle de la France (141 sites) a été réalisé, permettant ainsi de travailler sur des hydrosystèmes contrastés en matière de facteurs physicochimiques et de profils de contamination (diverses pressions anthropiques). Les résultats de cette campagne ont montré que :

- Le gammare était un outil sensible pour détecter la contamination métallique dans les milieux. En effet, par rapport aux mesures directes effectuées dans la colonne d'eau, pour lesquelles environ 40 % des concentrations en Cd, Ni et Pb n'ont pas été détectées (< LoQ), la majorité des mesures de concentrations effectuées dans les gammares étaient supérieures à la LoQ (chapitre III.2). Ainsi l'utilisation d'une matrice intégratrice, telle que le gammare, permet une mesure fiable du Cd, du Ni et du Pb.
- Des contaminants, présents à très faibles concentrations (voire inférieures à la LoQ) dans les milieux, peuvent être extrêmement biodisponibles pour le biote. Effectivement, par comparaison des teneurs métalliques accumulées dans les gammares engagés sur les 141 sites, avec les valeurs seuils de contamination biodisponibles (BBAC) proposées par Besse

et al. (2013) (cf. Matériels et méthodes, partie II.2.2), une classification des sites peut être effectuée. Les résultats montrent que pour 60 % des sites pour le Pb et le Ni, et 28 % des sites pour le Cd, les gammars ont accumulés ces métaux à des concentrations supérieures aux BBAC, ce qui peut être interprété comme la présence d'une contamination biodisponible dans le milieu. De plus, parmi ces sites, 99 % (Pb), 88 % (Ni) et 60 % (Cd) d'entre eux présentent des concentrations en métal dissous inférieures aux valeurs seuils de toxicité définies par la DCE (NQE), i.e. ne sont pas considérés comme présentant un mauvais état chimique. Ceci pourrait s'expliquer par le fait que dans certains milieux, les conditions physicochimiques favorisent la biodisponibilité des métaux, telles que les faibles concentrations de calcium, de matière organique dissoute, pH et/ou température élevée, etc. Par conséquent, ces résultats montrent que, pour une interprétation fiable des données de bioaccumulation, il est nécessaire d'une part, de mieux connaître l'influence de ces facteurs chimiques contrôlant la biodisponibilité des métaux *in situ*, et d'autre part, qu'il serait important de les prendre en compte dans les valeurs seuils définies par la réglementation (NQE), afin de mieux protéger les écosystèmes. C'est ce qui est déjà appliqué au sujet du Cd, pour lequel plusieurs valeurs de NQE-eau ont été établies en fonction de la dureté de l'eau. Les résultats de cet travail de thèse montrent qu'il est indispensable d'élargir cette réflexion aux autres contaminants métalliques que sont le Ni et le Pb.

Concernant le Cu, en revanche, les expérimentations au laboratoire ont montré que les gammars n'accumulaient pas significativement ce métal pour des expositions à 2.5 µg/L de Cu dissous (cf. chapitre IV). De même, lors des expérimentations *in situ* (transplantation de gammars, chapitre III.2), les résultats du suivi de la contamination des gammars ont montré que, par rapport au Cd, au Ni ou encore au Pb, les teneurs en Cu accumulées par les gammars variaient d'un facteur deux contre un facteur 200, 40 et 15 pour les autres métaux, respectivement. Le Cu est un élément essentiel, impliqué dans la synthèse de l'hémocyanine, et est fortement régulé par les invertébrés aquatiques, parmi lesquels on trouve le genre *Gammarus* (Dedourge-Geffard et al., 2009; Lebrun et al., 2012; Taylor and Anstiss, 1999). Ainsi, ce travail de thèse indique que la pertinence du gammare pour le suivi de la contamination métallique des cours d'eau semble être limitée dans le cas du Cu. Ce constat rejoint celui fait par Besse et al. (2013) lors d'une campagne de transplantation de *G. fossarum* sur 27 sites du bassin du Rhône. Les auteurs ont observé un facteur d'enrichissement du Cu de 1.7 (ratio de la concentration maximale mesurée sur la concentration minimale mesurée) alors qu'il était d'environ 10 pour le Cd et le Pb, et de 5 pour le Ni.

Dans la littérature, l'utilisation d'organismes autochtones pour le suivi de la qualité chimique des milieux est l'approche historiquement la plus fréquemment utilisée (Amyot et al., 1996; Fialkowski et al., 2003a; Lebrun et al., 2014; Schaller et al., 2011; Tilghman et al., 2008). Cependant, les résultats du chapitre V ont montré que des gammars contaminés pouvaient moduler leur capacité à réguler certains métaux. Effectivement, il a été observé en

laboratoire que des gammares provenant de milieux soumis à une contamination chronique de Pb et de Ni limitaient leur capacité à accumuler le Ni et le Cd, par rapport à une population non contaminée. Ces résultats suggèrent que ces organismes se seraient acclimatés à la contamination de leur milieu. En ce sens, une récente étude de Khan et al. (2011) a rapporté que des gammares autochtones contaminés au Zn et au Cu accumulaient moins ces deux métaux par rapport à des gammares de référence transplantés. Ainsi, dans le cadre de la biosurveillance des milieux, les résultats de ce travail de thèse montrent que l'utilisation de gammares autochtones, potentiellement adaptés à la contamination, pouvait limiter la fiabilité de l'interprétation des données de bioaccumulation. Au contraire, la biosurveillance active (chapitre III.2), en se basant sur l'utilisation de gammares issus d'une population de référence, limite l'influence de facteurs biotiques sur la bioaccumulation, tels que l'histoire de contamination des organismes, et par conséquent permet une interprétation et une comparaison plus fiable des données entre sites.

Par ailleurs les résultats présentés dans le chapitre IV montrent qu'il existe une faible variabilité des capacités d'accumulation et d'élimination du Ni et du Pb entre populations de gammares de référence ayant différentes origines géographiques (provenant de deux bassins versants). Dans le cadre de la transplantation de gammares mise en place à l'échelle de la France dans le chapitre III.2, cette généralité de la réponse des organismes indiquent:

- que l'incertitude de l'interprétation des données de bioaccumulation liée à l'utilisation d'une seule population de gammare au regard des populations du milieu est faible.
- qu'il peut être envisagé d'utiliser pour la transplantation, différentes populations de référence comme source d'organismes.

En ce qui concerne, le Cd, une variabilité inter-populations plus forte, par rapport au Ni et au Pb, a été observée dont les mécanismes sous-jacents restent à définir. Pour approfondir ces résultats, il serait approprié d'une part, d'étudier un plus grand nombre de populations, et d'autre part de travailler sur des sites ayant des profils encore plus contrastés, en particulier au niveau des caractéristiques physicochimiques.

De manière générale, l'ensemble de ces travaux montre que le gammare est un outil pertinent pour le suivi de certaines contaminations métalliques biodisponibles dans les milieux aquatiques. De plus, dans le cadre de la biosurveillance, l'utilisation d'une approche active (transplantation) chez le gammare à large échelle est faisable, et plus pertinente que la biosurveillance passive. Aussi, la faible variabilité des capacités de bioaccumulation observée entre populations de référence suggèrent que des données de bioaccumulation acquises, via la transplantation de gammares peuvent être inter-comparées, quelle que soit la population de référence utilisée. Ceci ouvre de sérieuses perspectives, quant à la mise en place de campagne de biosurveillance à de très larges échelles spatiales.

2. Capacité du modèle cinétique à relier la contamination du milieu à celle des organismes.

Dans la littérature, des modèles cinétiques de bioaccumulation du Cd, du Ni et du Cu ont été développés en laboratoire chez le gammare (Lebrun et al., 2012, 2011; Pellet et al., 2009). De la même manière, dans ce travail de thèse, il a été possible de calibrer un modèle cinétique de bioaccumulation du Pb. L'étude de l'influence des cations majeurs de l'eau a montré que le calcium avait un effet inhibiteur sur l'accumulation du Pb, lequel a été intégré au modèle cinétique (chapitre III.1). Ces résultats rejoignent des travaux antérieurs montrant le pouvoir inhibiteur des ions calciques sur la bioaccumulation du Pb chez les organismes aquatiques, tels que la daphnie et la truite arc-en-ciel (Komjarova and Blust, 2009; Macdonald et al., 2002; Rogers and Wood, 2004). Aujourd'hui, il est admis qu'en raison de sa ressemblance chimique pour le calcium, le Pb emprunterait préférentiellement les voies calciques pour pénétrer dans les organismes aquatiques, et que la diminution de la bioaccumulation du Pb serait due à une compétition entre le calcium et le Pb pour ces sites d'entrée (Macdonald et al., 2002). La confrontation *in situ* du modèle cinétique du Pb, via le suivi de la contamination de gammares autochtones dans le bassin de la Seine, a montré que la considération des teneurs calciques du milieu augmentait la capacité du modèle à prédire correctement la bioaccumulation *in situ*, i.e. déviation de la prédiction inférieure à un facteur deux par rapport à l'observation *in situ* (chapitre III.1). Ainsi, ces résultats montrent la nécessité de prendre en compte les facteurs physicochimiques pour une meilleure évaluation de la contamination biodisponible des milieux. Afin d'évaluer la capacité des modèles cinétiques de bioaccumulation (Cd, Ni et Pb), à rendre compte de la contamination biodisponible des milieux à large échelle, la bioaccumulation prédite par les modèles a été comparée à la bioaccumulation observée chez les gammares transplantés sur toute la France (chapitre III.2) (le Cu ne sera pas abordé dans cette discussion étant donnée la pertinence limitée du gammare pour son suivi). Les résultats ont montré que le modèle du Cd était le plus performant avec 71 % de la bioaccumulation observée correctement prédite. En revanche, les modèles du Ni et du Pb ont une capacité médiocre à prédire la bioaccumulation (39 % et 48 %, respectivement) et donc à rendre compte de la contamination biodisponible du milieu. Plus généralement, la bioaccumulation mal prédite par les modèles est sous-estimée. Ces résultats suggèrent deux hypothèses qui peuvent être complémentaires :

- une autre source de contaminant biodisponible n'est pas prise en compte. Cette source peut être la nourriture.
- les paramètres déterminés en laboratoire et supposés constants, peuvent être impactés *in situ* en raison des facteurs physicochimiques affectant la biodisponibilité des métaux, comme cela a été précédemment montré pour le calcium vis-à-vis du Pb et du Cd (chapitre III.1, Pellet et al., (2009)).

La sous-estimation globale de la bioaccumulation par les modèles cinétiques pourrait être liée à l'absence de prise en compte de la voie trophique. Cette voie d'exposition a été peu étudiée chez les amphipodes et a été généralement considérée comme négligeable par rapport à la voie dissoute, comme rapporté chez *G. pulex* pour le Zn ou encore, chez l'amphipode détritivore, *Hyalella azteca*, pour 25 métaux (Borgmann et al., 2007; Xu and Pascoe, 1994). Pour limiter la mortalité et contrôler les variations de poids des gammares durant la campagne de transplantation réalisée dans ce travail de thèse, une quantité identique de feuilles d'aulne, préalablement rincées et considérées comme non-contaminées, a été introduite dans chaque système d'exposition. Certains métaux, en particulier le Pb, sont connus pour leur affinité pour la matière organique, ce qui inclut la nourriture (Macdonald et al., 2002). Il est alors envisageable que durant la transplantation, un équilibre entre les feuilles et les métaux circulant dans le milieu se soit établi, et que les gammares aient en partie ingéré des feuilles contaminées. Par conséquent, l'absence de prise en compte de la voie trophique tendrait à sous-estimer la contamination des gammares. Actuellement, très peu d'information sont disponibles sur la contribution de la voie trophique dans la bioaccumulation du Pb, du Ni et du Cd chez le gammare. Seule une étude de Pellet et al. (2014) concernant l'accumulation du Cd chez *G. pulex* estime que la voie trophique contribuerait à hauteur de 66-95 % dans la contamination des organismes. Toutefois, cette estimation a été obtenue pour une exposition en laboratoire, ignorant la complexité du milieu naturel. Ainsi, afin d'améliorer les capacités prédictives du modèle, la contribution relative de la voie trophique dans la bioaccumulation des métaux chez le genre *Gammarus in situ* reste à confirmer.

L'influence de certains facteurs physicochimiques de l'eau sur la biodisponibilité des métaux n'est plus à démontrer. Dans la conception du modèle cinétique, les constantes d'accumulation et d'élimination établies au laboratoire dépendent du couple métal/organisme considéré et sont indépendantes du milieu d'exposition. En réalité, dans le milieu naturel, ces paramètres cinétiques peuvent être fonction de facteurs physicochimiques, comme cela a été montré pour le calcium (k_{in} exprimée en fonction de la concentration calcique et d'une constante de demi-saturation dans le cas du Cd et du Pb).

Dans le cas du Pb, les résultats du chapitre III.1 ont montré la capacité du modèle à relier la contamination du milieu à celle observée chez des gammares autochtones du bassin de la Seine. En revanche, ce même modèle a une faible capacité à rendre compte de la biodisponibilité du Pb à l'échelle de la France. Cette différence pourrait s'expliquer par le fait que dans le bassin de la Seine, la composition physicochimique des milieux est relativement homogène et dominée par de fortes teneurs calciques. Le calcium peut être considéré comme l'un des facteurs de contrôle majeurs de la biodisponibilité du Pb, et son effet inhibiteur vis-à-vis de la bioaccumulation du Pb chez le gammare a probablement masqué l'effet d'autres facteurs plus négligeables, ce qui a permis une bonne prédiction du modèle. Au contraire, à l'échelle de la France, les sites étudiés étaient situés dans différents bassins versants dont les milieux présentaient des profils physicochimiques contrastés, lesquels ont

probablement influencé la biodisponibilité de ce métal de manière site-spécifique. Plus généralement, le modèle cinétique, dans son formalisme actuel, n'a pas permis de rendre compte de la biodisponibilité du Pb, du Cd, ni du Ni à large échelle.

D'autre part, le déploiement des organismes sur les 141 sites a été réalisé sur plus d'une année. Les organismes ont par conséquent été exposés à différentes températures, ce qui pourrait avoir influencé la bioaccumulation des métaux. Par exemple, chez *G. fossarum*, Fialkowski et al., (2003) ont observé qu'une élévation de la température pouvait être associée à une augmentation du métabolisme des organismes, ce qui favoriserait les mécanismes d'accumulation des métaux. Plus récemment, il a été montré que la saison pouvait influencer la bioaccumulation du Ni chez *G. fossarum* et *G. pulex* transplantés une semaine sur 3 sites, le long de l'axe Seine, en été, automne, hiver et printemps (Lebrun et al., 2015). Dans cette étude, le principal facteur explicatif de cette variation était la température du milieu. En revanche dans l'étude de Besse et al. (2013), aucun effet significatif de la température d'exposition de *G. fossarum* transplantés sur 27 sites du bassin du Rhône n'a été observé. Les auteurs ont rapporté que les températures d'exposition variaient de 8.6°C à 19.7°C, ce qui restait dans une gamme optimale pour les organismes (Wijnhoven et al., 2003). De plus, dans l'étude de Besse et al. (2013), le déploiement des organismes engagés a été effectué à la même saison. En revanche, lors de la campagne de transplantation effectuée dans ce travail de thèse, il est probable que les organismes aient parfois été exposés à des températures extrêmes, susceptibles d'affecter leur physiologie et potentiellement leur capacité de bioaccumulation.

De manière générale, ces résultats ont permis de mettre en évidence les limites de l'application du modèle cinétique en conditions naturelles. Ceci suggère donc la nécessité d'élargir l'étude de l'influence des facteurs physicochimiques sur la bioaccumulation des métaux, comme la température ou la voie trophique, et de les intégrer aux modèles cinétiques afin d'améliorer leur pertinence environnementale.

La pertinence environnementale des modèles cinétiques repose également sur la représentativité de la population de référence, utilisée pour calibrer les modèles au laboratoire vis-à-vis des populations du milieu. Les résultats présentés dans le chapitre IV ont montré que pour le Ni et le Pb, la variabilité des constantes d'accumulation et d'élimination (k_{in} et k_{out}) du modèle cinétique, déterminées chez 5 populations de référence de gammare, était faible. Ces résultats montrent d'une part, que les modèles sont transférables d'une population à une autre et d'autre part, qu'il était possible de calibrer les modèles à partir de différentes populations de référence comme source d'organismes. Ces résultats ont également permis de déterminer des constantes cinétiques « génériques » et des « valeurs seuils » quantifiant la variabilité naturelle inter-populations des capacités de bioaccumulation du Ni et du Pb chez le gammare (i.e. IC 95 % maximum et minimum de chaque constante parmi les 5 populations testées) (cf. chapitre IV, Figure IV-3). Ces valeurs seuils désignent les valeurs de k_{in} et de k_{out} au-dessus et au-dessous desquelles une

constante pourrait être interprétée comme significativement différente de la variabilité naturelle.

La comparaison de ces valeurs seuils, déterminées dans le chapitre IV, aux constantes cinétiques déterminées pour la population de référence GUE dans le chapitre V.1 (utilisée comme population de référence versus populations contaminées) montre une différence significative pour le Ni, i.e. k_{in} et k_{out} inférieures à la variabilité naturelle. Cette différence pourrait s'expliquer par la saison de pêche des organismes. En effet, la variabilité naturelle inter-populations des capacités de bioaccumulation du Ni chez le gammare a été déterminée uniquement chez des populations issues de pêches réalisées en été, tandis que la population de GUE utilisée comme témoin dans le chapitre V.1 a été pêchée en hiver. Or, dans la littérature, il a été montré que la saison pouvait influencer les conditions physiologiques des organismes aquatiques en raison de leur cycle de vie (reproduction, stade de mue) ou encore de leur statut énergétique (ressources en nourriture différentes d'une saison à l'autre par exemple), et par conséquent impacter leur capacité à gérer les métaux. Chez les amphipodes, il a été montré qu'il existait des variations saisonnières de la bioaccumulation des métaux chez 4 espèces parmi lesquelles *G. fossarum* (Fialkowski et al., 2003a, 2003b). Il a également été rapporté que durant le premier stade de mue, les gammarés avaient des vitesses d'accumulation du Cd plus élevées, car la demande calcique était plus forte (Wright, 1980). Dans le cadre de la biosurveillance, la pêche des gammarés sur le site de référence pour la transplantation se fait tout au long de l'année, selon les besoins, comme cela a été le cas dans la campagne à l'échelle de la France (chapitre III.2), ce qui pourrait impacter la fiabilité de l'interprétation des données de bioaccumulation. Ainsi, l'effet de la période de pêche sur la bioaccumulation des métaux et en particulier du Ni mériterait d'être approfondi, afin d'étayer l'hypothèse avancée.

Les gammarés pré-exposés à une contamination métallique peuvent moduler leur capacité à accumuler les métaux. En effet, la comparaison des constantes du modèle cinétique, déterminées chez des populations de gammarés résidant dans des milieux soumis à une pression multi-métallique chronique, a montré que les gammarés contaminés au Pb et au Ni limitaient leur capacité d'accumulation du Ni et du Cd (chapitre V.1). Ces résultats indiquent tout d'abord qu'il est nécessaire de calibrer les modèles cinétiques à partir de gammarés issus de populations de référence pour limiter les biais dans la prédiction de la bioaccumulation. Ainsi, à l'aide de l'approche cinétique, il est possible de mettre en évidence un comportement adaptatif chez le gammare, vis-à-vis de certaines contaminations, ce qui est d'un grand intérêt pour évaluer finement l'état physiologique des populations en place.

Conclusion et perspectives

L'ensemble de ce travail de thèse renforce la pertinence de l'outil « gammare » pour le suivi de la contamination métallique biodisponible dans les cours d'eau et appuie l'intérêt des approches de biosurveillance active pour une interprétation fiable des données de bioaccumulation.

À l'aide du modèle cinétique, il a été possible d'approfondir les connaissances sur les mécanismes physiologiques régissant la bioaccumulation des métaux chez le gammare, et d'identifier des facteurs physicochimiques et biologiques responsables de la variabilité des capacités de bioaccumulation entre populations. Ces facteurs sont le calcium et la pré-exposition des organismes. Ces résultats montrent que pour une interprétation fiable des données de bioaccumulation, il est important d'une part, de prendre en compte les teneurs calciques des milieux et d'autre part, de connaître l'histoire de vie de la population utilisée, que ce soit pour la transplantation ou pour calibrer les modèles cinétiques au laboratoire.

Par ailleurs, il a été montré qu'il existait une faible variabilité inter-populations des capacités de bioaccumulation des métaux pour des populations de référence, quelle que soit leur origine. Ces résultats ont permis de déterminer des constantes cinétiques d'accumulation et d'élimination « génériques » pour le Ni et le Pb. De plus, ces résultats montrent que dans le cadre de la biosurveillance et de la modélisation, les incertitudes liées à l'utilisation d'une seule population de référence sont faibles et offrent la possibilité d'utiliser plusieurs populations de référence comme source d'organismes.

Les résultats ont montré le potentiel du modèle cinétique calibré en laboratoire, pour le Cd, à relier la contamination du milieu à celle des organismes. Par conséquent le modèle cinétique pourrait être un outil pertinent pour évaluer la contamination biodisponible des milieux. En revanche, la pertinence environnementale des modèles développés pour le Ni et le Pb reste faible. Ces résultats ont permis de montrer les limites de l'application de ces modèles *in situ* et la nécessité d'accroître les connaissances sur le lien entre la contamination du milieu et celle des organismes. Ainsi, plusieurs perspectives associées à ce travail ont été dégagées :

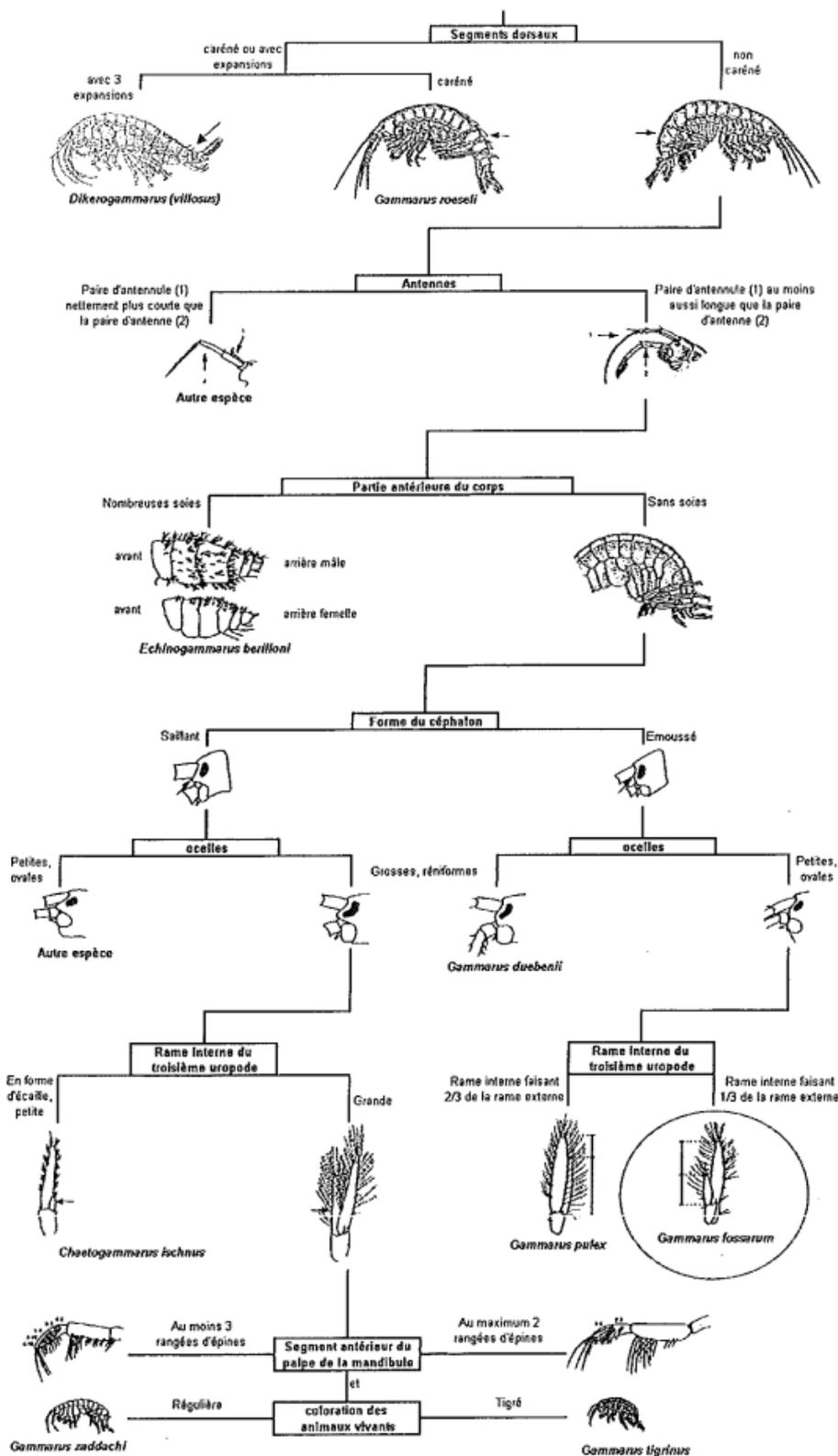
- Afin d'élargir les connaissances sur les interactions entre les paramètres physicochimiques du milieu et les organismes, il serait nécessaire d'orienter les recherches vers d'autres paramètres, tels que la température. L'effet de la température d'exposition sur la bioaccumulation des métaux chez le gammare, en particulier le Ni, pourrait être étudié en laboratoire puis formalisé et intégré au modèle cinétique. De plus dans un contexte de changement climatique, la connaissance de l'effet d'une augmentation de température sur le comportement des organismes vis-à-vis de la contamination des milieux est aujourd'hui une question scientifique forte.

- La contamination des gammarex par voie dissoute a été considérée dans ce travail de thèse comme prépondérante par rapport à la voie trophique. Aujourd'hui cette hypothèse reste à être validée par des approches complémentaires, permettant d'évaluer la contribution relative de la voie trophique dans la contamination des organismes. En ce sens, des travaux sur le Pb sont actuellement en cours au laboratoire d'écotoxicologie d'Irstea Antony.
- Dans ce travail de thèse, il a été montré que la contamination à un métal pouvait affecter l'accumulation d'un autre métal. En effet, dans les milieux naturels, les organismes sont exposés non pas à un seul, mais bien souvent à plusieurs métaux. Dans ce contexte, il serait nécessaire d'examiner l'impact des métaux en mélange sur la bioaccumulation chez les gammarex, et en particulier dans le cas où les métaux emprunteraient des voies d'entrée communes, comme le Zn et le Cd par exemple.
- L'étude de l'effet de la saison de pêche sur les capacités de bioaccumulation des métaux a été l'une des questions soulevées dans ce travail de thèse. Aussi, il serait envisageable de déterminer les constantes d'accumulation et d'élimination du modèle cinétique de bioaccumulation des métaux chez une ou plusieurs populations de référence, pour toutes les saisons de l'année. De plus, ces constantes (k_{in} et k_{out}) pourraient alimenter le jeu de données déjà acquis dans ce travail de thèse, ce qui permettrait de définir de manière plus robuste la variabilité naturelle inter-populations.

Enfin, dans le cadre de la DCE et dans le but d'améliorer l'évaluation du risque écotoxicologique des contaminants dans les milieux, il serait nécessaire d'établir le lien entre la contamination mesurée dans le biote et les effets toxiques, qui est à ce jour peu documenté. En effet, l'intégralité du métal accumulé dans un organisme n'est pas nécessairement métaboliquement disponible pour ce dernier. En ce sens, des études complémentaires sont nécessaires, et notamment sur l'approfondissement des connaissances quant à la répartition subcellulaire du métal dans les organismes, permettant ainsi de renseigner sur leur disponibilité intracellulaire et les sites d'actions potentiels.

Annexes

Annexe 1 : Clé de détermination du genre Gammarus (d'après Cărăușu et al., 1955; Goedmakers, 1981; Nagel, 1989).



Annexe 2 : Protocole de digestion acide de tissus biologiques en digiprep**Introduction**

La présente méthode décrit la digestion acide d'échantillons solides de type tissus biologiques pour l'analyse des métaux en ICP-AES, GFAAS, FAAS et ICP-MS. Dans le cas particulier de l'analyse minérale des tissus biologiques et donc des organismes, il faut éliminer la matrice organique tout en solubilisant les espèces métalliques. L'utilisation de HNO₃ permet d'atteindre ce but, accompagné d'eau oxygénée H₂O₂ comme agent oxydant. Tous les éléments de la matrice organique sont transformés en CO₂, H₂O et NO₂.

Matériel

- Bloc chauffant Digiprep Jr
- Sonde de température digiprobe
- Digitubes en PP 50 mL
- Verres de montre en PP
- Micropipettes 5 mL et 1 mL

Réactifs et étalons

- HNO₃ Sigma-Aldrich Trace select 69% - d = 1,41
- H₂O₂ Sigma-Aldrich Trace select
- Eau ultra-pure
- CMR Mussel tissue CE-278k = 100 mg

Précautions

Manipuler toutes les étapes sous hotte aspirante, avec blouse, gants, lunettes

Préparation du matériel

Le matériel est utilisé tel quel.

Protocole de digestion

Le protocole de digestion est appliqué à des échantillons lyophilisés ou séchés à l'étuve.

- Écrire les noms sur les flacons
- Pesée exacte du flacon vide : m_1
- Transfert du matériau à digérer dans le flacon
- Pesée exacte du flacon avec échantillon : m_2 . Masse d'échantillon = $m_2 - m_1$

Ajout des réactifs en fonction de la masse d'échantillon :

Masse échantillon (mg)	HNO ₃	H ₂ O ₂	H ₂ O
Pour Gammarex <100	2 mL	1 mL	Ajustement 10 mL après évaporation
100 à 500	5 mL	2 mL	Ajustement 50 mL
500 à 1000	10 mL	4 mL	Ajustement 50 mL

-
- Ajouter HNO₃ (voir tableau) et mettre les verres de montre
- Montée en température digiprep : programme "**MINE GAMMAREX**", 45 min de rampe jusqu'à 100 °C + 45 min de palier. La sonde de température est laissée dans le bloc.
- Sortir le portoir du bloc chauffant et laisser refroidir afin de limiter les vapeurs d'acide lors du retrait des verres de montre
- Ajouter H₂O₂ (voir tableau) et mettre les verres de montre
- Montée en température digiprep : programme "**MINE GAMMAREX**", 45 min de rampe jusqu'à 100 °C + 45 min de palier. La sonde de température est laissée dans le bloc.
- Évaporer jusqu'à 500 µL environ avec le programme « **Evap HNO₃** », (suivre en direct). Laisser les verres de montre pour éviter les contaminations croisées.
- À froid (pour les mêmes raisons de sécurité) : ajouter 500 µL de HNO₃
- Rincer les verres de montre dans le tube qui lui correspond avec de l'eau ultra-pure. Jeter les verres de montre.
- Ajuster à 10 mL avec de l'eau ultra-pure.
- Pesée exacte du flacon avec minéralisat : m₃.

$$\text{Volume exact} = \frac{m_3 - m_1}{\mu_{\text{HNO}_3 \text{ 6.5\%}}} \text{ avec } \mu_{\text{HNO}_3 \text{ 6.9\%}} = 1,041$$

NB : la valeur de μ dépend de l'acide utilisé, et notamment du pourcentage en acide. Si celui-ci change, vérifier μ .

Annexe 3 : Fiche de conformité EMR – CE278k



JOINT RESEARCH CENTRE
Institute for Reference Materials and Measurements

CERTIFICATE OF ANALYSIS

ERM[®] - CE278k

164+165

MUSSEL TISSUE		
	Mass Fraction	
	Certified value ^{1,2)} [mg/kg]	Uncertainty ^{2,3)} [mg/kg]
As	6.7	0.4
Cd	0.336	0.025
Cr	0.73	0.22
Cu	5.98	0.27
Fe	161	8
Hg	0.071	0.007
Mn	4.88	0.24
Ni	0.69	0.15
Pb	2.18	0.18
Rb	2.46	0.16
Se	1.62	0.12
Sr	19.0	1.2
Zn	71	4

1) Unweighted mean value of the means of accepted sets of data, each set being obtained in a different laboratory and/or with a different method of determination. The certified value and its uncertainty are traceable to the International System of Units (SI).
2) Certified mass fractions are corrected for the water content of the material (and expressed as dry mass), determined as described in the section "Instructions for use".
3) The certified uncertainty is the expanded uncertainty with a coverage factor $k = 2$ corresponding to a level of confidence of about 95 % estimated in accordance with ISO/IEC Guide 98-3, Guide to the Expression of Uncertainty in Measurement (GUM:1995), ISO, 2008.

This certificate is valid for one year after purchase.

Sales date: 18. Dez. 2014

The minimum amount of sample to be used is 200 mg.

Accepted as an ERM[®], Geel, 22 October 2012

Signed: _____


Prof. Dr. Hendrik Emons
European Commission
Joint Research Centre
Institute for Reference Materials and Measurements
Retieseweg 111
B-2440 Geel, Belgium



Registration No. 268-RM
ISO Guide 34 for the
production of reference materials

All following pages are an integral part of the certificate.

Page 1 of 4

Références

- Agence de l'eau Artois-Picardie, 2015. URL <http://www.eau-artois-picardie.fr/> (accessed 8.31.15).
- Ahearn, G.A., Mandal, P.K., Mandal, A., 2004. Mechanisms of heavy-metal sequestration and detoxification in crustaceans: a review. *J. Comp. Physiol. B* 174, 439–452.
- Alberts, J.J., Giesy, J.P., 1983. Conditional stability constants of trace metals and naturally occurring humic materials: application in equilibrium models and verification with field data, in: *Aquatic and Terrestrial Humic Materials*. Ann Arbor Science Ann Arbor, MI, pp. 333–348.
- Amiard, J.-C., Amiard-Triquet, C., Barka, S., Pellerin, J., Rainbow, P.S., 2006. Metallothioneins in aquatic invertebrates: Their role in metal detoxification and their use as biomarkers. *Aquat. Toxicol.* 76, 160–202. doi:10.1016/j.aquatox.2005.08.015
- Amiard-Triquet, C., Burgeot, T., Claisse, D., 1999. La surveillance de la qualité du milieu marin : l'expérience du Réseau National d'Observation (RNO) et le développement de biomarqueurs. *Océanis* 25, 651–684.
- Amiard-Triquet, C., Rainbow, P.S., Romeo, M., 2011. *Tolerance to Environmental Contaminants*. CRC Press.
- Amyot, M., Pinel-Alloul, B., Campbells, P., Desy, J., 1996. Total metal burdens in the freshwater amphipod *Gammarus fasciatus*: contribution of various body parts and influence of gut contents. *Freshw. Biol.* 35, 363–373. doi:10.1046/j.1365-2427.1996.00493.x
- Andral, B., 2002. Guide méthodologique. Le Réseau Intégrateurs Biologiques (RINBIO) en Méditerranée. Evaluation de la contamination chimique basée sur l'utilisation de stations artificielles de moules. Ifremer.
- Andral, B., Stanisiere, J.Y., Sauzade, D., Damier, E., Thebault, H., Galgani, F., Boissery, P., 2004. Monitoring chemical contamination levels in the Mediterranean based on the use of mussel caging. *Mar. Pollut. Bull.* 49, 704–712. doi:10.1016/j.marpolbul.2004.05.008
- Andral, B., Tomasino, C., 2010. RINBIO 2009 - Evaluation de la qualité des eaux basée sur l'utilisation de stations artificielles de moules en Méditerranée: résultats de la campagne 2009.
- Andrès, S., Baudrimont, M., Lapaquellerie, Y., Ribeyre, F., Maillet, N., Latouche, C., Boudou, A., 1999. Field transplantation of the freshwater bivalve *Corbicula fluminea* along a polymetallic contamination gradient (river Lot, France): I. Geochemical characteristics of the sampling sites and cadmium and zinc bioaccumulation kinetics. *Environ. Toxicol. Chem.* 18, 2462–2471. doi:10.1002/etc.5620181112
- Atli, G., Canli, M., 2011. Essential metal (Cu, Zn) exposures alter the activity of ATPases in gill, kidney and muscle of tilapia *Oreochromis niloticus*. *Ecotoxicology* 20, 1861–1869.
- Barnard, J.L., Barnard, C.M., 1983. *Freshwater Amphipoda of the world*.

- Bascombe, A.D., Ellis, J.B., Revitt, D.M., Shutes, R.B.E., 1990. The development of ecotoxicological criteria in urban catchments. *Water Sci. Technol.* 22, 173–179.
- Baty, F., Ritz, C., Charles, S., Brutsche, M., Flandrois, J.P., Delignette-Muller, M.-L., 2014. A Toolbox for Nonlinear Regression in R: The Package nlstools. *Revis. J. Stat. Softw.*
- Beeby, A., 2001. What do sentinels stand for? *Environ. Pollut.* 112, 285–298. doi:10.1016/S0269-7491(00)00038-5
- Bervoets, L., Blust, R., Verheyen, R., 1996. Effect of temperature on cadmium and zinc uptake by the midge larvae *Chironomus riparius*. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 31, 502–511. doi:10.1007/BF00212434
- Bervoets, L., Meregalli, G., De Cooman, W., Goddeeris, B., Blust, R., 2004. Caged midge larvae (*Chironomus riparius*) for the assessment of metal bioaccumulation from sediments in situ. *Environ. Toxicol. Chem.* 23, 443–454.
- Bervoets, L., Van Campenhout, K., Reynders, H., Knapen, D., Covaci, A., Blust, R., 2009. Bioaccumulation of micropollutants and biomarker responses in caged carp (*Cyprinus carpio*). *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 72, 720–728.
- 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. *Environ. Sci. Technol.* 39, 1492–1505.
- Besse, J.-P., Coquery, M., Lopes, C., Chaumot, A., Budzinski, H., Labadie, P., Geffard, O., 2013. Caged *Gammarus fossarum* (Crustacea) as a robust tool for the characterization of bioavailable contamination levels in continental waters: Towards the determination of threshold values. *Water Res.* 47, 650–660. doi:10.1016/j.watres.2012.10.024
- Besse, J.-P., Geffard, O., Coquery, M., 2012. Relevance and applicability of active biomonitoring in continental waters under the Water Framework Directive. *TrAC Trends Anal. Chem.* 36, 113–127.
- Besse, J.-P., Geffard, O., Coquery, M., 2011. Développement d'une méthodologie pour l'amélioration du suivi chimique des eaux continentales Etat de l'art sur les approches de biosurveillance et application dans le cadre de la DCE (Rapport de synthèse). ONEMA - Irstea.
- Besser, J.M., Brumbaugh, W.G., Brunson, E.L., Ingersoll, C.G., 2005. Acute and chronic toxicity of lead in water and diet to the amphipod *Hyalella azteca*. *Environ. Toxicol. Chem.* SETAC 24, 1807–1815.
- Billon, G., Magnier, A., Lourino-Cabana, B., Baeyens, W., Fischer, J.C., Ouddane, B., 2009. suivi en continu d'éléments traces métalliques dans le canal de la Deule. Agence de l'eau Artois-Picardie, Université de Lille Geosystèmes, CNRS.
- Bisson, M., Houeix, N., Gay, G., Jolibois, B., Lacroix, G., Lefèvre, J.P., Magaud, H., Morin, A., Tissot, S., 2005. Fiche de données toxicologiques et environnementales des substances chimiques—Cuivre et ses dérivés. INERIS.

- Blackmore, G., Wang, W.-X., 2003. Inter-population differences in Cd, Cr, Se, and Zn accumulation by the green mussel *Perna viridis* acclimated at different salinities. *Aquat. Toxicol.* 62, 205–218. doi:10.1016/S0166-445X(02)00083-8
- Blackmore, G., Wang, W.-X., 2002. Uptake and efflux of Cd and Zn by the green mussel *Perna viridis* after metal preexposure. *Environ. Sci. Technol.* 36, 989–995. doi:10.1021/es0155534
- Boisen, A.M.Z., Amstrup, J., Novak, I., Grosell, M., 2003. Sodium and chloride transport in soft water and hard water acclimated zebrafish (*Danio rerio*). *Biochim. Biophys. Acta BBA - Biomembr., Anion Transport* 1618, 207–218. doi:10.1016/j.bbamem.2003.08.016
- Bollache, L., 2003. Trois espèces d'Amphipodes épigés nouvelles pour la Saône bourguignonne. *Bull. Sci. Bourgogne* 51, 1–9.
- Borgmann, U., Couillard, Y., Grapentine, L.C., 2007. Relative contribution of food and water to 27 metals and metalloids accumulated by caged *Hyaella azteca* in two rivers affected by metal mining. *Environ. Pollut. Barking Essex 1987* 145, 753–765. doi:10.1016/j.envpol.2006.05.020
- Borgmann, U., Norwood, W.P., 1995a. Kinetics of excess (above background) copper and zinc in *Hyaella azteca* and their relationship to chronic toxicity. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 52, 864–874.
- Borgmann, U., Norwood, W.P., 1995b. EDTA toxicity and background concentrations of copper and zinc in *Hyaella azteca*. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 52, 875–881. doi:10.1139/f95-087
- Borgmann, U., Norwood, W.P., Clarke, C., 1993. Accumulation, regulation and toxicity of copper, zinc, lead and mercury in *Hyaella azteca*. *Hydrobiologia* 259, 79–89.
- Borgmann, U., Norwood, W.P., Dixon, D.G., 2004. Re-evaluation of metal bioaccumulation and chronic toxicity in *Hyaella azteca* using saturation curves and the biotic ligand model. *Environ. Pollut.* 131, 469–484. doi:10.1016/j.envpol.2004.02.010
- Borgmann, U., Nowierski, M., Dixon, D.G., 2005. Effect of major ions on the toxicity of copper to *Hyaella azteca* and implications for the biotic ligand model. *Aquat. Toxicol.* 73, 268–287. doi:10.1016/j.aquatox.2005.03.017
- Bourgeault, A., Gourlay-Francé, C., Tusseau-Vuillemin, M.-H., 2010. Modeling the effect of water chemistry on the bioaccumulation of waterborne cadmium in zebra mussels. *Environ. Toxicol. Chem.* 29, 2182–2189.
- Brignon, J.-M., Malherbe, L., Soleille, S., 2005. Les substances dangereuses prioritaires de la directive cadre sur l'eau - Fiches de données technico-économiques. (Rapport final No. INERIS DRC_MECO_2004_59520). INERIS, Verneuil en Halatte.
- Brooks, S.J., Lloyd Mills, C., 2003. The effect of copper on osmoregulation in the freshwater amphipod *Gammarus pulex*. *Comp. Biochem. Physiol. A. Mol. Integr. Physiol.* 135, 527–537. doi:10.1016/S1095-6433(03)00111-9
- Brown, B.E., 1977. Uptake of copper and lead by a metaltolerant isopod *Asellus meridianus* Rac. *Freshw. Biol.* 7, 235–244. doi:10.1111/j.1365-2427.1977.tb01671.x

- Bryan, G.W., Hummerstone, L.G., 1973. Adaptation of the Polychaete *Nereis Diversicolor* to Estuarine Sediments Containing High Concentrations of Zinc and Cadmium. *J. Mar. Biol. Assoc. U. K.* 53, 839–857. doi:10.1017/S0025315400022517
- Brzóska, M.M., Moniuszko-Jakoniuk, J., 2001. Interactions between cadmium and zinc in the organism. *Food Chem. Toxicol.* 39, 967–980. doi:10.1016/S0278-6915(01)00048-5
- Buchwalter, D.B., Luoma, S.N., 2005. Differences in dissolved cadmium and zinc uptake among stream insects: mechanistic explanations. *Environ. Sci. Technol.* 39, 498–504. doi:10.1021/es0404421
- Buffle, J., 1988. Complexation reactions in aquatic systems. An analytical approach.
- Buffle, J., Wilkinson, K.J., van Leeuwen, H.P., 2009. Chemodynamics and Bioavailability in Natural Waters. *Environ. Sci. Technol.* 43, 7170–7174. doi:10.1021/es9013695
- Cain, D.J., Luoma, S.N., Wallace, W.G., 2004. Linking metal bioaccumulation of aquatic insects to their distribution patterns in a mining-impacted river. *Environ. Toxicol. Chem.* 23, 1463–1473. doi:10.1897/03-291
- Cairns, A., Yan, N., 2009. A review of the influence of low ambient calcium concentrations on freshwater daphniids, gammarids, and crayfish. *Environ. Rev.* 17, 67–79.
- Campbell, P.G.C., 1995. Interactions between trace metals and aquatic organisms: a critique of the free-ion activity model, Tessier A., Turner DR, Metal Speciation and Bioavailability in Aquatic Systems, 1995, 45-102. Wiley, New York.
- Campbell, P.G.C., Errécalde, O., Fortin, C., Hiriart-Baer, V.P., Vigneault, B., 2002. Metal bioavailability to phytoplankton—applicability of the biotic ligand model. *Comp. Biochem. Physiol. Part C Toxicol. Pharmacol.* 133, 189–206. doi:10.1016/S1532-0456(02)00104-7
- Canli, M., Atli, G., 2003. The relationships between heavy metal (Cd, Cr, Cu, Fe, Pb, Zn) levels and the size of six Mediterranean fish species. *Environ. Pollut.* 121, 129–136. doi:10.1016/S0269-7491(02)00194-X
- Cărăușu, S., Dobreanu, E., Manolache, C., Romîne, A.R.P., 1955. Crustacea: Amphipoda forme salmastre și de apă dulce. Editura Academiei Republicii Populare Romîne.
- Casado-Martinez, M.C., Smith, B.D., DelValls, T.A., Rainbow, P.S., 2009. Pathways of trace metal uptake in the lugworm *Arenicola marina*. *Aquat. Toxicol.* 92, 9–17. doi:10.1016/j.aquatox.2008.12.010
- Cazan, A.M., Klerks, P.L., 2015. Effects from a short-term exposure to copper or cadmium in gravid females of the livebearer fish (*Gambusia affinis*). *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 118, 199–203. doi:10.1016/j.ecoenv.2015.04.039
- Chau, Y.K., Kulikovskiy-Cordeiro, O.T.R., 1995. Occurrence of nickel in the Canadian environment. *Environ. Rev.* 3, 95–120.
- Chiodi Boudet, L., Polizzi, P., Romero, M.B., Robles, A., Gerpe, M., 2013. Lethal and sublethal effects of cadmium in the white shrimp *Palaemonetes argentinus*: A comparison between populations from contaminated and reference sites. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 89, 52–58. doi:10.1016/j.ecoenv.2012.11.008

- Chowdhury, M.J., Bucking, C., Wood, C.M., 2008. Is nickel an essential metal for aquatic animals. *Integr. Environ. Assess. Manag.* 4, 266–267. doi:10.1897/1551-3793(2008)4[266:INAEMF]2.0.CO;2
- Clements, W.H., 1991. Community responses of stream organisms to heavy metals: a review of observational and experimental approaches. *Met. Ecotoxicol. Concepts Appl.* Lewis Publ. Chelsea MI 363–391.
- Conti, M.E., Iacobucci, M., Cecchetti, G., Alimonti, A., 2008. Influence of weight on the content of trace metals in tissues of *Mytilus galloprovincialis* (Lamarck, 1819): a forecast model. *Environ. Monit. Assess.* 141, 27–34.
- Cooper, S., Bonneris, E., Michaud, A., Pinel-Alloul, B., Campbell, P.G.C., 2013. Influence of a step-change in metal exposure (Cd, Cu, Zn) on metal accumulation and subcellular partitioning in a freshwater bivalve, *Pyganodon grandis*: a long-term transplantation experiment between lakes with contrasting ambient metal levels. *Aquat. Toxicol. Amst. Neth.* 132-133, 73–83. doi:10.1016/j.aquatox.2013.01.021
- Cooper, S., Hare, L., Campbell, P.G.C., 2010. Modeling cadmium uptake from water and food by the freshwater bivalve *Pyganodon grandis*. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 67, 1874–1888. doi:10.1139/F10-103
- Correia, A. d., Pereira, A. l., Costa, M. h., Carrapiço, F., 2002. Functional anatomy of the midgut gland of *Gammarus locusta* (Crustacea: Amphipoda). *J. Mar. Biol. Assoc. U. K.* 82, 201–204. doi:10.1017/S0025315402005362
- Couillard, Y., Campbell, P.G.C., Tessier, A., Auclair, J.C., Pellerin-Massicotte, J., 1995. Field transplantation of a freshwater bivalve, *Pyganodon grandis*, across a metal contamination gradient. I. Temporal changes in metallothionein and metal (Cd, Cu, and Zn) concentrations in soft tissues. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 52, 690–702.
- Couture, P., Pyle, G., Campbell, P.G., Hontela, A., 2015. Using perca as biomonitors in ecotoxicological studies, in: *Biology of Perch*. P. Couture and G.G. Pyle, Boca Raton, FL, USA, pp. 271–303.
- Cresswell, T., Simpson, S.L., Smith, R.E.W., Nuggeoda, D., Mazumder, D., Twining, J., 2014. Bioaccumulation and retention kinetics of cadmium in the freshwater decapod *Macrobrachium australiense*. *Aquat. Toxicol.* 148, 174–183. doi:10.1016/j.aquatox.2014.01.006
- Croteau, M.-N., Hare, L., Tessier, A., 1998. Refining and testing a trace metal biomonitor (*Chaoborus*) in highly acidic lakes. *Environ. Sci. Technol.* 32, 1348–1353. doi:10.1021/es970705+
- Croteau, M.-N., Luoma, S.N., 2008. A biodynamic understanding of dietborne metal uptake by a freshwater invertebrate. *Environ. Sci. Technol.* 42, 1801–1806. doi:10.1021/es7022913
- Croteau, M.-N., Luoma, S.N., 2007. Characterizing dissolved Cu and Cd uptake in terms of the biotic ligand and biodynamics using enriched stable isotopes. *Environ. Sci. Technol.* 41, 3140–3145.

- Croteau, M.-N., Luoma, S.N., Pellet, B., 2007. Determining metal assimilation efficiency in aquatic invertebrates using enriched stable metal isotope tracers. *Aquat. Toxicol.* 83, 116–125.
- Decho, A.W., Luoma, S.N., 1996. Flexible digestion strategies and trace metal assimilation in marine bivalves. *Limnol. Oceanogr.* 41, 568–572. doi:10.4319/lo.1996.41.3.0568
- Dedourge-Geffard, O., Charron, L., Hofbauer, C., Gaillet, V., Palais, F., Lacaze, E., Geffard, A., Geffard, O., 2013. Temporal patterns of digestive enzyme activities and feeding rate in gammarids (*Gammarus fossarum*) exposed to inland polluted waters. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 97, 139–146. doi:10.1016/j.ecoenv.2013.07.016
- 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, 1569–1576. doi:10.1016/j.chemosphere.2009.09.042
- De Jonge, M., Lofts, S., Bervoets, L., Blust, R., 2014. Relating metal exposure and chemical speciation to trace metal accumulation in aquatic insects under natural field conditions. *Sci. Total Environ.* 496, 11–21. doi:10.1016/j.scitotenv.2014.07.023
- Deleebeeck, N.M.E., De Schamphelaere, K.A.C., Janssen, C.R., 2008. A novel method for predicting chronic nickel bioavailability and toxicity to *Daphnia magna* in artificial and natural waters. *Environ. Toxicol. Chem.* 27, 2097–2107. doi:10.1897/07-579.1
- De Schamphelaere, K.A.C., Janssen, C.R., 2004. Development and field validation of a biotic ligand model predicting chronic copper toxicity to *Daphnia magna*. *Environ. Toxicol. Chem.* 23, 1365–1375. doi:10.1897/02-626
- De Schamphelaere, K.A.C., Janssen, C.R., 2002. A biotic ligand model predicting acute copper toxicity for *Daphnia magna*: The effects of calcium, magnesium, sodium, potassium, and pH. *Environ. Sci. Technol.* 36, 48–54. doi:10.1021/es000253s
- De Schamphelaere, K.A.C., Lofts, S., Janssen, C.R., 2005. Bioavailability models for predicting acute and chronic toxicity of zinc to algae, daphnids, and fish in natural surface waters. *Environ. Toxicol. Chem.* 24, 1190–1197. doi:10.1897/04-229R.1
- De Schamphelaere, K.A.C., Nys, C., Janssen, C.R., 2014. Toxicity of lead (Pb) to freshwater green algae: Development and validation of a bioavailability model and inter-species sensitivity comparison. *Aquat. Toxicol.* 155, 348–359. doi:10.1016/j.aquatox.2014.07.008
- Directive 2000/60/EC of the European parliament and of the council of 23 October 2000 establishing a framework for Community action in the field of water policy, Official Journal of European Communities.
- Directive 2008/105/EC of the European parliament and of the council of 16 December 2008 on environmental quality standards in the field of water policy, amending and subsequently repealing Council Directives 82/176/EEC, 83/513/EEC, 84/156/EEC, 84/491/EEC, 86/280/EEC and amending Directive 2000/60/EC of the European Parliament and of the Council, Official Journal of European Communities.

- Directive 2013/39/EC of the European parliament and of the council of 12 August 2013 amending Directives 2000/60/EC and 2008/105/EC as regards priority substances in the field of water policy, Official Journal of European Communities.
- Di Toro, D.M., Allen, H.E., Bergman, H.L., Meyer, J.S., Paquin, P.R., Santore, R.C., 2001. Biotic ligand model of the acute toxicity of metals. 1. Technical basis. *Environ. Toxicol. Chem.* 20, 2383–2396.
- Eisler, R., 1998. Nickel hazards to fish, wildlife, and invertebrates: a synoptic review.
- Fechner, L.C., Gourlay-Francé, C., Tusseau-Vuillemin, M.-H., 2011. Low exposure levels of urban metals induce heterotrophic community tolerance: a microcosm validation. *Ecotoxicology* 20, 793–802. doi:10.1007/s10646-011-0630-4
- Felten, V., Charmantier, G., Mons, R., Geffard, A., Rousselle, P., Coquery, M., Garric, J., Geffard, O., 2008. Physiological and behavioural responses of *Gammarus pulex* (Crustacea: Amphipoda) exposed to cadmium. *Aquat. Toxicol.* 86, 413–425. doi:10.1016/j.aquatox.2007.12.002
- Ferreira, D., Ciffroy, P., Tusseau-Vuillemin, M.-H., Garnier, C., Garnier, J.-M., 2009. Modelling exchange kinetics of copper at the water-aquatic moss (*Fontinalis antipyretica*) interface: Influence of water cationic composition (Ca, Mg, Na and pH). *Chemosphere* 74, 1117–1124. doi:10.1016/j.chemosphere.2008.10.031
- Ferreira, D., Tousset, N., Ridame, C., Tusseau-Vuillemin, M.-H., 2008. More than inorganic copper is bioavailable to aquatic mosses at environmentally relevant concentrations. *Environ. Toxicol. Chem.* 27, 2108–2116. doi:10.1897/07-249.1
- Fialkowski, W., Fialkowska, E., Smith, B.D., Rainbow, P.S., 2003a. Biomonitoring survey of trace metal pollution in streams of a catchment draining a zinc and lead mining area of Upper Silesia, Poland using the amphipod *Gammarus fossarum*. *Int. Rev. Hydrobiol.* 88, 187–200.
- Fialkowski, W., Rainbow, P.S., 2006. The discriminatory power of two biomonitors of trace metal bioavailabilities in freshwater streams. *Water Res.* 40, 1805–1810.
- Fialkowski, W., Rainbow, P.S., Smith, B.D., Zmudzinski, L., 2003b. Seasonal variation in trace metal concentrations in three talitrid amphipods from the Gulf of Gdansk, Poland. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 288, 81–93. doi:10.1016/S0022-0981(02)00594-4
- Filella, M., Town, R.M., 2005. A framework for interpretation and prediction of the effects of natural organic matter heterogeneity on trace metal speciation in aquatic systems, in: Lichtfouse, D.E., Schwarzbauer, D.J., Robert, D.D. (Eds.), *Environmental Chemistry*. Springer Berlin Heidelberg, pp. 121–132.
- Foregs Geochemical Atlas, URL <http://weppi.gtk.fi/publ/foregsatlas/index.php> (accessed 8.31.15).
- Forrow, D.M., Maltby, L., 2000. Toward a mechanistic understanding of contaminant-induced changes in detritus processing in streams: Direct and indirect effects on detritivore feeding. *Environ. Toxicol. Chem.* 19, 2100–2106.
- Geffard, A., Quéau, H., Dedourge, O., Biagianti-Risboug, S., Geffard, O., 2007. Influence of biotic and abiotic factors on metallothionein level in *Gammarus pulex*. *Comp.*

- Biochem. Physiol. Part C Toxicol. Pharmacol. 145, 632–640.
doi:10.1016/j.cbpc.2007.02.012
- Geffard, A., Sartelet, H., Garric, J., Biagianti-Risbourg, S., Delahaut, L., Geffard, O., 2010. Subcellular compartmentalization of cadmium, nickel, and lead in *Gammarus fossarum*: Comparison of methods. Chemosphere 78, 822–829. doi:10.1016/j.chemosphere.2009.11.051
- Geffard, O., Besse, J.-P., Chaumot, A., François, A., Gahou, J., Grisot, G., Lopes, C., Recoura-Massaquant, R., Coquery, M., 2014. Rapport de synthèse de l'étude pilote : déploiement de l'outil gammare encagé au niveau national, résultats pour les métaux ciblés (Rapport final, 60 pp). Irstea - ONEMA.
- Goedmakers, A., 1981. Population dynamics of three gammarid species (Crustacea, Amphipoda) in a French chalk stream. Part IV. Review and implications. Bijdr. Tot Dierkd. 51, 181–190.
- Goldberg, E.D., 1975. The mussel watch — A first step in global marine monitoring. Mar. Pollut. Bull. 6, 111. doi:10.1016/0025-326X(75)90271-4
- Golding, L.A., Borgmann, U., George Dixon, D., 2013. Cadmium bioavailability to *Hyaella azteca* from a periphyton diet compared to an artificial diet and application of a biokinetic model. Aquat. Toxicol. 126, 291–298. doi:10.1016/j.aquatox.2012.09.016
- Grosell, M., Gerdes, R., Brix, K.V., 2006. Influence of Ca, humic acid and pH on lead accumulation and toxicity in the fathead minnow during prolonged water-borne lead exposure. Comp. Biochem. Physiol. Part C Toxicol. Pharmacol. 143, 473–483.
- Grosell, M., Wood, C.M., 2002. Copper uptake across rainbow trout gills mechanisms of apical entry. J. Exp. Biol. 205, 1179–1188.
- Guo, L., Hunt, B.J., Santschi, P.H., Ray, S.M., 2001. Effect of dissolved organic matter on the uptake of trace metals by american oysters. Environ. Sci. Technol. 35, 885–893. doi:10.1021/es0017581
- Hare, L., Tessier, A., 1996. Predicting animal cadmium concentrations in lakes. Nature 380, 430–432. doi:10.1038/380430a0
- Heijerick, D.G., De Schamphelaere, K.A.C., Van Sprang, P.A., Janssen, C.R., 2005. Development of a chronic zinc biotic ligand model for *Daphnia magna*. Ecotoxicol. Environ. Saf. 62, 1–10. doi:10.1016/j.ecoenv.2005.03.020
- Hemelraad, J., Kleinveld, H.A., Roos, A.M. de, Holwerda, D.A., Zandee, D.I., 1987. Cadmium kinetics in freshwater clams. III. Effects of zinc on uptake and distribution of cadmium in *Anodonta cygnea*. Arch. Environ. Contam. Toxicol. 16, 95–101. doi:10.1007/BF01055364
- Heugens, E.H., Jager, T., Creighton, R., Kraak, M.H., Hendriks, A.J., Van Straalen, N.M., Admiraal, W., 2003. Temperature-dependent effects of cadmium on *Daphnia magna*: accumulation versus sensitivity. Environ. Sci. Technol. 37, 2145–2151.
- Hollis, L., McGeer, J.C., McDonald, D.G., Wood, C.M., 1999. Cadmium accumulation, gill Cd binding, acclimation, and physiological effects during long term sublethal Cd

- exposure in rainbow trout. *Aquat. Toxicol.* 46, 101–119. doi:10.1016/S0166-445X(98)00118-0
- Hollis, L., Muench, L., Playle, R.C., 1997. Influence of dissolved organic matter on copper binding, and calcium on cadmium binding, by gills of rainbow trout. *J. Fish Biol.* 50, 703–720. doi:10.1111/j.1095-8649.1997.tb01966.x
- Issartel, J., Boulo, V., Wallon, S., Geffard, O., Charmantier, G., 2010. Cellular and molecular osmoregulatory responses to cadmium exposure in *Gammarus fossarum* (Crustacea, Amphipoda). *Chemosphere* 81, 701–710.
- Janssen, C.R., Heijerick, D.G., De Schamphelaere, K.A.C., Allen, H.E., 2003. Environmental risk assessment of metals: tools for incorporating bioavailability. *Environ. Int.*, *Secotox S.I.* 28, 793–800. doi:10.1016/S0160-4120(02)00126-5
- Kalman, J., Smith, B.D., Riba, I., Blasco, J., Rainbow, P.S., 2010. Biodynamic modelling of the accumulation of Ag, Cd and Zn by the deposit-feeding polychaete *Nereis diversicolor*: Inter-population variability and a generalised predictive model. *Mar. Environ. Res.* 69, 363–373. doi:10.1016/j.marenvres.2010.01.001
- Khan, F.R., Irving, J.R., Bury, N.R., Hogstrand, C., 2011. Differential tolerance of two *Gammarus pulex* populations transplanted from different metallogenic regions to a polymetal gradient. *Aquat. Toxicol.* 102, 95–103. doi:10.1016/j.aquatox.2011.01.001
- Khan, F.R., Misra, S.K., García-Alonso, J., Smith, B.D., Strekopytov, S., Rainbow, P.S., Luoma, S.N., Valsami-Jones, E., 2012. Bioaccumulation dynamics and modeling in an estuarine invertebrate following aqueous exposure to nanosized and dissolved silver. *Environ. Sci. Technol.* 46, 7621–7628. doi:10.1021/es301253s
- Khan, M. a. Q., Ahmed, S.A., Catalin, B., Khodadoust, A., Ajayi, O., Vaughn, M., 2006. Effect of temperature on heavy metal toxicity to juvenile crayfish, *Orconectes immunis* (Hagen). *Environ. Toxicol.* 21, 513–520. doi:10.1002/tox.20213
- Komjarova, I., Blust, R., 2009a. Effects of Na, Ca, and pH on the simultaneous uptake of Cd, Cu, Ni, Pb, and Zn in the zebrafish *Danio rerio*: A stable isotope experiment. *Environ. Sci. Technol.* 43, 7958–7963. doi:10.1021/es9016987
- Komjarova, I., Blust, R., 2009b. Effect of Na, Ca and pH on simultaneous uptake of Cd, Cu, Ni, Pb, and Zn in the water flea *Daphnia magna* measured using stable isotopes. *Aquat. Toxicol.* 94, 81–86. doi:10.1016/j.aquatox.2009.05.018
- Komjarova, I., Blust, R., 2008. Multi-metal interactions between Cd, Cu, Ni, Pb and Zn in water flea *Daphnia magna*, a stable isotope experiment. *Aquat. Toxicol.* 90, 138–144. doi:10.1016/j.aquatox.2008.08.007
- Kraak, M.H.S., Scholten, M.C.T., Peeters, W.H.M., de Kock, W.C., 1991. Biomonitoring of heavy metals in the Western European Rivers Rhine and Meuse using the freshwater mussel *Dreissena polymorpha*. *Environ. Pollut.* 74, 101–114. doi:10.1016/0269-7491(91)90107-8
- Kunz, P.Y., Kienle, C., Gerhardt, A., 2010. *Gammarus spp.* in aquatic ecotoxicology and water quality assessment: toward integrated multilevel tests, in: Whitacre, D.M. (Ed.), *Reviews of environmental contamination and toxicology Volume 205, Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*. Springer New York, pp. 1–76.

- Kutlu, M., Sümer, S., 1998. Effects of lead on the activity of δ -aminolevulinic acid dehydratase in *Gammarus pulex*. Bull. Environ. Contam. Toxicol. 60, 816–821.
- Kwan, K.H.M., Chan, H.M., Lafontaine, Y.D., 2003. Metal contamination in zebra mussels (*Dreissena Polymorpha*) along the St. Lawrence river. Environ. Monit. Assess. 88, 193–219. doi:10.1023/A:1025517007605
- Lacaze, E., 2011. Un biomarqueur de génotoxicité chez *Gammarus fossarum*: développement, signification fonctionnelle et application au milieu naturel. Thèse de l'Université de Metz.
- Lacaze, E., Devaux, A., Mons, R., Bony, S., Garric, J., Geffard, A., Geffard, O., 2011. DNA damage in caged *Gammarus fossarum* amphipods: A tool for freshwater genotoxicity assessment. Environ. Pollut. 159, 1682–1691. doi:10.1016/j.envpol.2011.02.038
- Landrum, P.F., Lydy, M.J., Lee, H., 1992. Toxicokinetics in aquatic systems: Model comparisons and use in hazard assessment. Environ. Toxicol. Chem. 11, 1709–1725. doi:10.1002/etc.5620111205
- Lebrun, J.D., Geffard, O., Urien, N., François, A., Uher, E., Fechner, L.C., 2015. Seasonal variability and inter-species comparison of metal bioaccumulation in caged gammarids under urban diffuse contamination gradient: Implications for biomonitoring investigations. Sci. Total Environ. 511, 501–508. doi:10.1016/j.scitotenv.2014.12.078
- Lebrun, J.D., Perret, M., Geffard, A., Gourlay-Francé, C., 2012. Modelling copper bioaccumulation in *Gammarus pulex* and alterations of digestive metabolism. Ecotoxicology 21, 2022–2030.
- Lebrun, J.D., Perret, M., Uher, E., Tusseau-Vuillemin, M.-H., Gourlay-Francé, C., 2011. Waterborne nickel bioaccumulation in *Gammarus pulex*: Comparison of mechanistic models and influence of water cationic composition. Aquat. Toxicol. 104, 161–167. doi:10.1016/j.aquatox.2011.04.011
- Lebrun, J.D., Uher, E., Tusseau-Vuillemin, M.-H., Gourlay-Francé, C., 2014. Essential metal contents in indigenous gammarids related to exposure levels at the river basin scale: Metal-dependent models of bioaccumulation and geochemical correlations. Sci. Total Environ. 466, 100–108.
- Lee, J.G., Roberts, S.B., Morel, F.M.M., 1995. Cadmium: A nutrient for the marine diatom *Thalassiosira weissflogii*. Limnol. Oceanogr. 40, 1056–1063. doi:10.4319/lo.1995.40.6.1056
- Luiders, C.D., Crusius, J., Playle, R.C., Curtis, P.J., 2004. Influence of natural organic matter source on copper speciation as demonstrated by Cu binding to fish gills, by ion selective electrode, and by DGT gel sampler. Environ. Sci. Technol. 38, 2865–2872. doi:10.1021/es030566y
- Luoma, S.N., Rainbow, P.S., 2005. Why is metal bioaccumulation so variable? Biodynamics as a unifying concept. Environ. Sci. Technol. 39, 1921–1931. doi:10.1021/es048947e
- Luoma, S.N., Rainbow, P.S., Luoma, S., others, 2008. Metal contamination in aquatic environments: science and lateral management. Cambridge University Press.

- Macdonald, A., Silk, L., Schwartz, M., Playle, R.C., 2002. A lead–gill binding model to predict acute lead toxicity to rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Comp. Biochem. Physiol. Part C Toxicol. Pharmacol.* 133, 227–242. doi:10.1016/S1532-0456(02)00107-2
- MacLean, R.S., Borgmann, U., Dixon, D.G., 1996. Bioaccumulation kinetics and toxicity of lead in *Hyalella azteca* (Crustacea, Amphipoda). *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 53, 2212–2220.
- Macneil, C., Dick, J.T.A., Elwood, R.W., 1997. The trophic ecology of freshwater *Gammarus* spp. (Crustacea: Amphipoda): Problems and perspectives concerning the functional feeding group concept. *Biol. Rev.* 72, 349–364.
- Macneil, C., Elwood, R.W., Dick, J.T.A., 2000. Factors influencing the importance of *Gammarus* spp. (Crustacea: Amphipoda) in riverine salmonid diets. *Arch. Für Hydrobiol.* 149, 87–107.
- Markich, S.J., King, A.R., Wilson, S.P., 2006. Non-effect of water hardness on the accumulation and toxicity of copper in a freshwater macrophyte (*Ceratophyllum demersum*): How useful are hardness-modified copper guidelines for protecting freshwater biota? *Chemosphere* 65, 1791–1800. doi:10.1016/j.chemosphere.2006.04.024
- Martin, J.M., Windom, H.L., 1991. Present and future roles of ocean margins in regulating marine biogeochemical cycles of trace elements. *Ocean Margin Process. Glob. Change* 45–67.
- Mason, A.Z., Jenkins, K.D., 1995. Metal detoxification in aquatic organisms. *Met. Speciat. Bioavailab. Aquat. Syst.* 3, 479–578.
- McGeer, J.C., Nadella, S., Alsop, D.H., Hollis, L., Taylor, L.N., McDonald, D.G., Wood, C.M., 2007. Influence of acclimation and cross-acclimation of metals on acute Cd toxicity and Cd uptake and distribution in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquat. Toxicol.* 84, 190–197. doi:10.1016/j.aquatox.2007.03.023
- McGeer, J., Group, E.R., 2004. Issue paper on the bioavailability and bioaccumulation of metals. US Environmental Protection Agency.
- Mersch, J., Reichard, M., 1998. *In situ* investigation of trace metal availability in industrial effluents using transplanted aquatic mosses. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 34, 336–341. doi:10.1007/s002449900327
- Monbet, P., Coquery, M., 2013. Approches analytiques pour l'évaluation de la biodisponibilité des métaux dans les milieux aquatiques (Rapport technique No. INERIS DRC-03-46820-PMo/JL-03.0672). INERIS, Verneuil en Halatte.
- Montuelle, B., Dorigo, U., Bérard, A., Volat, B., Bouchez, A., Tlili, A., Gouy, V., Pesce, S., 2010. The periphyton as a multimetric bioindicator for assessing the impact of land use on rivers: an overview of the Ardières-Morcille experimental watershed (France). *Hydrobiologia* 657, 123–141. doi:10.1007/s10750-010-0105-2
- Morel, F.M., Hering, J.G., 1993. Principles and applications of aquatic chemistry. John Wiley & Sons.

- Morel, F.M.M., 1983. Principles of aquatic chemistry, 1983. Wiley: New York.
- Mouneyrac, C., Amiard, J.C., Amiard-Triquet, C., 1998. Effects of natural factors (salinity and body weight) on cadmium, copper, zinc and metallothionein-like protein levels in resident populations of oysters *Crassostrea gigas* from a polluted estuary. Mar. Ecol. Prog. Ser. 162, 125–135.
- Mukherjee, A.B., 1998. Nickel: a review of occurrence, uses, emissions, and concentration in the environment in Finland. Environ. Rev. 6, 173–187. doi:10.1139/a99-001
- Mulliss, R.M., Revitt, D.M., Shutes, R.B.E., 1996. The determination of the toxic influences to *Gammarus pulex* (amphipoda) caged in urban receiving waters. Ecotoxicology 5, 209–215. doi:10.1007/BF00116341
- Murphy, E.M., Zachara, J.M., 1995. The role of sorbed humic substances on the distribution of organic and inorganic contaminants in groundwater. Geoderma 67, 103–124. doi:10.1016/0016-7061(94)00055-F
- Muyssen, B.T., Brix, K.V., DeForest, D.K., Janssen, C.R., 2004. Nickel essentiality and homeostasis in aquatic organisms. Environ. Rev. 12, 113–131. doi:10.1139/a04-004
- Nagel, P., 1989. Bildbestimmungsschlüssel der Saprobien: Makrozoobenthon. Fischer, Stuttgart; New York.
- Niyogi, S., Brix, K.V., Grosell, M., 2014. Effects of chronic waterborne nickel exposure on growth, ion homeostasis, acid-base balance, and nickel uptake in freshwater pulmonate snail, *Lymnaea stagnalis*. Aquat. Toxicol. doi:10.1016/j.aquatox.2014.02.012
- Niyogi, S., Wood, C.M., 2004. Biotic ligand model, a flexible tool for developing site-specific water quality guidelines for metals. Environ. Sci. Technol. 38, 6177–6192.
- Nordberg, G.F., Fowler, B.A., Nordberg, M., 2014. Handbook on the toxicology of metals. Academic Press.
- Pacaud, A., 1945. Les Amphipodes de la faune nutritive des eaux douces francaises. Bull. Fr. Piscic. 105–120.
- Palermo, F.F., Risso, W.E., Simonato, J.D., Martinez, C.B.R., 2015. Bioaccumulation of nickel and its biochemical and genotoxic effects on juveniles of the neotropical fish *Prochilodus lineatus*. Ecotoxicol. Environ. Saf. 116, 19–28. doi:10.1016/j.ecoenv.2015.02.032
- Pane, E.F., Richards, J.G., Wood, C.M., 2003. Acute waterborne nickel toxicity in the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) occurs by a respiratory rather than ionoregulatory mechanism. Aquat. Toxicol. 63, 65–82.
- Paquin, P.R., Santore, R.C., Wu, K.B., Kavvas, C.D., Di Toro, D.M., 2000. The biotic ligand model: a model of the acute toxicity of metals to aquatic life. Environ. Sci. Policy 3, 175–182.
- Paul, N., Chakraborty, S., Sengupta, M., 2014. Lead toxicity on non-specific immune mechanisms of freshwater fish *Channa punctatus*. Aquat. Toxicol. doi:10.1016/j.aquatox.2014.03.017

- Peakall, D., Burger, J., 2003. Methodologies for assessing exposure to metals: speciation, bioavailability of metals, and ecological host factors. *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, Special issue on methodologies for assessing exposures to metals: Speciation, bioaccessibility and bioavailability in the environment, food and feed 56, 110–121. doi:10.1016/S0147-6513(03)00055-1
- Peeters, E.T.H.M., Gardeniers, A.J.J.P., 1998. Logistic regression as a tool for defining habitat requirements of two common gammarids. *Freshw. Biol.* 39, 605–615. doi:10.1046/j.1365-2427.1998.00304.x
- Pellet, B., Ayrault, S., Tusseau-Vuillemin, M.-H., Gourlay-Francé, C., 2014. Quantifying diet-borne metal uptake in *Gammarus pulex* using stable isotope tracers. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 110, 182–189. doi:10.1016/j.ecoenv.2014.09.001
- Pellet, B., Geffard, O., Lacour, C., Kermoal, T., Gourlay-Francé, C., Tusseau-Vuillemin, M.-H., 2009. A model predicting waterborne cadmium bioaccumulation in *Gammarus pulex*: the effects of dissolved organic ligands, calcium, and temperature. *Environ. Toxicol. Chem.* 28, 2434–2442.
- Phillips, D.J.H., 1977. The use of biological indicator organisms to monitor trace metal pollution in marine and estuarine environments—a review. *Environ. Pollut.* 1970 13, 281–317. doi:10.1016/0013-9327(77)90047-7
- Ponton, D.E., Hare, L., 2010. Nickel dynamics in the lakewater metal biomonitor *Chaoborus*. *Aquat. Toxicol.* 96, 37–43. doi:10.1016/j.aquatox.2009.09.011
- Postma, J.F., VanNugteren, P., De Jong, M.B.B., 1996. Increased cadmium excretion in metal-adapted populations of the midge *Chironomus riparius* (diptera). *Environ. Toxicol. Chem.* 15, 332–339.
- Prygiel, É., Billon, G., Lesven, L., 2013. Développement et mise en oeuvre d'une approche biomarqueurs dans le bassin Artois-Picardie (Rapport scientifique). Agence de l'eau Artois-Picardie, Université de Lille Geosystèmes, CNRS.
- Pyatt, A., Pyatt, F., Pentreath, V., 2002. Lead toxicity, locomotion and feeding in the freshwater snail, *Lymnaea stagnalis* (L.). *Invert. Neurosci.* 4, 135–140.
- Rainbow, P.S., 2007. Trace metal bioaccumulation: models, metabolic availability and toxicity. *Environ. Int.* 33, 576–582. doi:10.1016/j.envint.2006.05.007
- Rainbow, P.S., 2002. Trace metal concentrations in aquatic invertebrates: why and so what? *Environ. Pollut.* 120, 497–507. doi:10.1016/S0269-7491(02)00238-5
- Rainbow, P.S., 1995. Biomonitoring of heavy metal availability in the marine environment. *Mar. Pollut. Bull.*, Selected papers from the International Conference on Marine Pollution and Ecotoxicology 31, 183–192. doi:10.1016/0025-326X(95)00116-5
- Rainbow, P.S., Blackmore, G., Wang, W., 2003. Effects of previous field-exposure history on the uptake of trace metals from water and food by the barnacle *Balanus amphitrite*. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 259, 201–213. doi:10.3354/meps259201
- Rainbow, P.S., Black, W.H., 2005. Cadmium, zinc and the uptake of calcium by two crabs, *Carcinus maenas* and *Eriocheir sinensis*. *Aquat. Toxicol.* 72, 45–65. doi:10.1016/j.aquatox.2004.11.016

- Rainbow, P.S., Malik, I., O'Brien, P., 1993. Physicochemical and physiological effects on the uptake of dissolved zinc and cadmium by the amphipod crustacean *Orchestia gammarellus*. *Aquat. Toxicol.* 15–30.
- Rainbow, P.S., Phillips, D.J.H., 1993. Cosmopolitan biomonitors of trace metals. *Mar. Pollut. Bull.* 26, 593–601. doi:10.1016/0025-326X(93)90497-8
- Rainbow, P.S., White, S.L., 1989. Comparative strategies of heavy metal accumulation by crustaceans: zinc, copper and cadmium in a decapod, an amphipod and a barnacle. *Hydrobiologia* 174, 245–262.
- Ramade, F., 1992. Précis d'écotoxicologie. Masson.
- R Core Team, 2013. R: A language and environment for statistical computing. (version 3.0.1). <http://www.R-project.org/>. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria.
- REACH Règlement 1907/2006/EC du Parlement européen, 2006.
- Règlement (CE) n°1881/2006 de la commission du 19 décembre 2006 portant fixation de teneurs maximales pour certains contaminants dans les denrées alimentaires.
- Reynders, H., Bervoets, L., Gelders, M., De Coen, W.M., Blust, R., 2008. Accumulation and effects of metals in caged carp and resident roach along a metal pollution gradient. *Sci. Total Environ.* 391, 82–95.
- Richards, J.G., Curtis, P.J., Burnison, B.K., Playle, R.C., 2001. Effects of natural organic matter source on reducing metal toxicity to rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and on metal binding to their gills. *Environ. Toxicol. Chem.* 20, 1159–1166. doi:10.1002/etc.5620200604
- Rinderhagen, M., Ritterhoff, J., Zauke, G.-P., 2000. Crustaceans as bioindicators, in: *Environmental Research Forum*. pp. 161–197.
- Ritterhoff, J., Zauke, G.-P., Dallinger, R., 1996. Calibration of the estuarine amphipods, *Gammarus zaddachi* Sexton (1912), as biomonitors: toxicokinetics of cadmium and possible role of inducible metal-binding proteins in Cd detoxification. *Aquat. Toxicol.* 34, 351–369. doi:10.1016/0166-445X(95)00048-9
- Rocha, T.L., Gomes, T., Cardoso, C., Letendre, J., Pinheiro, J.P., Sousa, V.S., Teixeira, M.R., Bebianno, M.J., 2014. Immunocytotoxicity, cytogenotoxicity and genotoxicity of cadmium-based quantum dots in the marine mussel *Mytilus galloprovincialis*. *Mar. Environ. Res.* 101, 29–37. doi:10.1016/j.marenvres.2014.07.009
- Roditi, H.A., Fisher, N.S., Sañudo-Wilhelmy, S.A., 2000. Field testing a metal bioaccumulation model for zebra mussels. *Environ. Sci. Technol.* 34, 2817–2825.
- Roesijadi, G., 1992. Metallothioneins in metal regulation and toxicity in aquatic animals. *Aquat. Toxicol.* 22, 81–113. doi:10.1016/0166-445X(92)90026-J
- Roesijadi, G., Robinson, W.E., 1994. Metal regulation in aquatic animals: mechanisms of uptake, accumulation and release. *Aquat. Toxicol.* 102, 125–133.
- Rogers, J.T., Richards, J.G., Wood, C.M., 2003. Ionoregulatory disruption as the acute toxic mechanism for lead in the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquat. Toxicol.* 64, 215–234.

- Rogers, J.T., Wood, C.M., 2004. Characterization of branchial lead-calcium interaction in the freshwater rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. *J. Exp. Biol.* 207, 813–825.
- Rollin, C., Quiot, F., 2006. Elements traces métalliques - Guide méthodologique Recommendations pour la modélisation des transferts des éléments traces métalliques dans les sols et les eaux souterraines.
- Roman, D.A., Rivera, L., 1992. The behaviour of a Cu (II) ion selective electrode in seawater; copper consumption capacity and copper determinations. *Mar. Chem.* 38, 165–184.
- Roussel, H., Chauvet, E., Bonzom, J.-M., 2008. Alteration of leaf decomposition in copper-contaminated freshwater mesocosms. *Environ. Toxicol. Chem.* 27, 637–644. doi:10.1897/07-168.1
- Roux, A.L., 1970. Le cycle de reproduction de deux espèces étroitement parentes de crustacés amphipodes : *Gammarus pulex* et *G. fossarum*. *Ann. Limnol. - Int. J. Limnol.* 6, 27–49. doi:10.1051/limn/1970011
- Sanders, J.G., Riedel, G.F., 1998. Metal accumulation and impacts in phytoplankton, in: Langston, W.J., Bebianno, M.J. (Eds.), *Metal Metabolism in Aquatic Environments*. Springer US, pp. 59–76.
- Santore, R.C., Di Toro, D.M., Paquin, P.R., Allen, H.E., Meyer, J.S., 2001. Biotic ligand model of the acute toxicity of metals. 2. Application to acute copper toxicity in freshwater fish and *Daphnia*. *Environ. Toxicol. Chem.* 20, 2397–2402.
- Schaller, J., Brackhage, C., Dudel, E.G., 2011. Invertebrates minimize accumulation of metals and metalloids in contaminated environments. *Water. Air. Soil Pollut.* 218, 227–233.
- Schecher, W.D., Driscoll, C.T., 1988. An evaluation of the equilibrium calculations within acidification models: the effect of uncertainty in measured chemical components. *Water Resour. Res.* 24, 533–540.
- Scheuhammer, A.M., Norris, S.L., 1996. The ecotoxicology of lead shot and lead fishing weights. *Ecotoxicology* 5, 279–295. doi:10.1007/BF00119051
- Serafim, M.A., Bebianno, M.J., 2001. Variation of metallothionein and metal concentrations in the digestive gland of the clam *Ruditapes decussatus*: Sex and seasonal effects. *Environ. Toxicol. Chem.* 20, 544–552. doi:10.1002/etc.5620200313
- Shi, D., Wang, W.-X., 2004. Modification of trace metal accumulation in the green mussel *Perna viridis* by exposure to Ag, Cu, and Zn. *Environ. Pollut.* 132, 265–277. doi:10.1016/j.envpol.2004.04.023
- Simkiss, K., Taylor, M.G., 1995. Transport of metals across membranes. *Met. Speciat. Bioavailab. Aquat. Syst.* 3, 1–44.
- SOGREAH, 2007. Bilan des flux de contaminants entrant sur les sols agricoles de France métropolitaine - Bilan qualitatif de la contamination par les éléments traces métalliques et les composés traces organiques et application quantitative pour les éléments traces métalliques (Rapport final). ADEME, Angers.
- Stuhlbacher, A., Maltby, L., 1992. Cadmium resistance in *Gammarus pulex* (L.). *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 22, 319–324.

- Tachet, H., Richoux, P., Bournaud, M., Usseglio-Polatera, P., 2000. Invertébrés d'eau douce: systématique, biologie, écologie. CNRS éditions Paris.
- Taylor, H.H., Anstiss, J.M., 1999. Copper and haemocyanin dynamics in aquatic invertebrates. *Mar. Freshw. Res.* 50, 907–931.
- Templeton, D.M., Ariese, F., Cornelis, R., Danielsson, L.-G., Muntau, H., van Leeuwen, H.P., Lobinski, R., 2000. Guidelines for terms related to chemical speciation and fractionation of elements. Definitions, structural aspects, and methodological approaches (IUPAC Recommendations 2000). *Pure Appl. Chem.* 72. doi:10.1351/pac200072081453
- Tercier Waeber, M.-L., Stoll, S., Slaveykova, V., 2012. Trace metal behavior in surface waters: emphasis on dynamic speciation, sorption processes and bioavailability. *Arch. Sci.* 65, 119–142.
- Tessier, A., Turner, D.R., others, 1995. Metal speciation and bioavailability in aquatic systems. J. Wiley.
- Thévenot, D., Lestel, L., Tusseau-Vuillemin, M.-H., Gonzales, J.-L., Meybeck, M., 2009. Les métaux dans le bassin de la Seine. Comprendre d'où proviennent et comment circulent les métaux dans un bassin versant fortement exposé aux pressions humaines. Agence de l'Eau Seine-Normandie.
- Tilghman, A., Coquery, M., Garric, J., 2008. La mesure des contaminants dans le biote : avantages et inconvénients pour la surveillance chimique du milieu continental. Cemagref.
- Tipping, E., 1994. WHAMC—A chemical equilibrium model and computer code for waters, sediments, and soils incorporating a discrete site/electrostatic model of ion-binding by humic substances. *Comput. Geosci.* 20, 973–1023. doi:10.1016/0098-3004(94)90038-8
- Tsui, M.T.-K., Wang, W.-X., 2007. Biokinetics and tolerance development of toxic metals in *Daphnia magna*. *Environ. Toxicol. Chem.* 26, 1023–1032. doi:10.1897/06-430R.1
- Tusseau-Vuillemin, M.-H., Gourlay, C., Lorgeoux, C., Mouchel, J.-M., Buzier, R., Gilbin, R., Seidel, J.-L., Elbaz-Poulichet, F., 2007. Dissolved and bioavailable contaminants in the Seine river basin. *Sci. Total Environ.* 375, 244–256.
- Uher, E., Zhang, H., Santos, S., Tusseau-Vuillemin, M.-H., Gourlay-Francé, C., 2012. Impact of biofouling on diffusive gradient in thin film measurements in water. *Anal. Chem.* 84, 3111–3118. doi:10.1021/ac2028535
- Urien, N., Uher, E., Billoir, E., Geffard, O., Fechner, L.C., Lebrun, J.D., 2015. A biodynamic model predicting waterborne lead bioaccumulation in *Gammarus pulex*: Influence of water chemistry and in situ validation. *Environ. Pollut.* 203, 22–30. doi:10.1016/j.envpol.2015.03.045
- US EPA, 2000. Assessing values to non-detected/non-quantified pesticides residues in human health food exposure assessments (No. 6047), Office of Pesticide Programs. U.S. Environmental Protection Agency, Washington, DC.

- Van Hattum, B., Korthals, G., Van Straalen, N.M., Govers, H.A.J., Joosse, E.N.G., 1993. Accumulation patterns of trace metals in freshwater isopods in sediment bioassays— Influence of substrate characteristics, temperature and pH. *Water Res.* 27, 669–684. doi:10.1016/0043-1354(93)90177-J
- Vellinger, C., Parant, M., Rousselle, P., Immel, F., Wagner, P., Usseglio-Polatera, P., 2012. Comparison of arsenate and cadmium toxicity in a freshwater amphipod (*Gammarus pulex*). *Environ. Pollut.* 160, 66–73. doi:10.1016/j.envpol.2011.09.002
- Verboost, P.M., Rooij, J.V., Flik, G., Lock, R. a. C., Bonga, S.E.W., 1989. The movement of cadmium through freshwater trout branchial epithelium and its interference with calcium transport. *J. Exp. Biol.* 145, 185–197.
- Verschoor, A.J., Hendriks, A.J., Vink, J.P.M., de Snoo, G.R., Vijver, M.G., 2012. Multimetal accumulation in crustaceans in surface water related to body size and water chemistry. *Environ. Toxicol. Chem.* 31, 2269–2280. doi:10.1002/etc.1941
- Vijver, M.G., van Gestel, C.A., Lanno, R.P., van Straalen, N.M., Peijnenburg, W.J., 2004. Internal metal sequestration and its ecotoxicological relevance: a review. *Environ. Sci. Technol.* 38, 4705–4712.
- Voets, J., Bervoets, L., Blust, R., 2004. Cadmium bioavailability and accumulation in the presence of humic acid to the zebra mussel, *Dreissena polymorpha*. *Environ. Sci. Technol.* 38, 1003–1008. doi:10.1021/es034742e
- Wang, W., Rainbow, P.S., 2006. Subcellular partitioning and the prediction of cadmium toxicity to aquatic organisms. *Environ. Chem.* 3, 395–399.
- Wang, W.-X., Fisher, N.S., 1999. Assimilation efficiencies of chemical contaminants in aquatic invertebrates: A synthesis. *Environ. Toxicol. Chem.* 18, 2034–2045. doi:10.1002/etc.5620180923
- Wang, W.-X., Rainbow, P.S., 2005. Influence of metal exposure history on trace metal uptake and accumulation by marine invertebrates. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 61, 145–159.
- Wijnhoven, S., Riel, M.C. van, Velde, G. van der, 2003. Exotic and indigenous freshwater gammarid species: physiological tolerance to water temperature in relation to ionic content of the water. *Aquat. Ecol.* 37, 151–158. doi:10.1023/A:1023982200529
- Wright, D.A., 1980. Cadmium and calcium interactions in the freshwater amphipod *Gammarus pulex*. *Freshw. Biol.* 10, 123–133. doi:10.1111/j.1365-2427.1980.tb01187.x
- Wright, D.A., Frain, J.W., 1981. The effect of calcium on cadmium toxicity in the freshwater amphipod, *Gammarus pulex* (L.). *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 10, 321–328.
- Xu, Q., Pascoe, D., 1994. The importance of food and water as sources of zinc during exposure of *Gammarus pulex* (Amphipoda). *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 26, 459–465.
- Xu, Q., Pascoe, D., 1993. The bioconcentration of zinc by *Gammarus pulex* (L.) and the application of a kinetic model to determine bioconcentration factors. *Water Res.* 27, 1683–1688. doi:10.1016/0043-1354(93)90132-2

- Yang, H.-N., Chen, H.-C., 1996. Uptake and elimination of cadmium by Japanese eel, *Anguilla japonica*, at various temperatures. Bull. Environ. Contam. Toxicol. 56, 670–676. doi:10.1007/s001289900098
- Zhang, H., Davison, W., 1995. Performance characteristics of diffusion gradients in thin films for the *in situ* measurement of trace metals in aqueous solution. Anal. Chem. 67, 3391–3400. doi:10.1021/ac00115a005
- Zubrod, J.P., Englert, D., Rosenfeldt, R.R., Wolfram, J., Lüderwald, S., Wallace, D., Schnetzer, N., Schulz, R., Bundschuh, M., 2015. The relative importance of diet-related and waterborne effects of copper for a leaf-shredding invertebrate. Environ. Pollut. 205, 16–22. doi:10.1016/j.envpol.2015.05.015

Table des matières

Liste des publications et des communications.....	I
Liste des documents en annexe.....	IV
Liste des abréviations utilisées (par ordre alphabétique).....	V
Introduction.....	1
Objectif de la thèse.....	5
Démarche scientifique et organisation du manuscrit.....	5
<i>I. État des connaissances.....</i>	9
1. Les métaux : sources, occurrences et interactions avec les organismes aquatiques.....	11
1.1. Généralités sur les éléments traces métalliques (ETM).....	11
1.2. Sources et niveaux de contamination des ETM dans les milieux aquatiques d'eau douce.....	11
1.2.1. Le plomb (Pb).....	11
1.2.2. Le cadmium (Cd).....	12
1.2.3. Le nickel (Ni).....	12
1.2.4. Le cuivre (Cu).....	13
1.3. Interaction des ETM avec les organismes aquatiques.....	13
1.3.1. Internalisation des ETM par voie dissoute.....	14
1.3.2. Internalisation des ETM par voie trophique.....	16
1.3.3. Le devenir des ETM internalisés et mécanismes de détoxification.....	17
1.4. Effets toxiques des ETM sur les organismes aquatiques.....	18
1.5. Règlementation.....	22
2. Notions de spéciation, de biodisponibilité et facteurs de contrôle de la biodisponibilité des ETM dans les milieux aquatiques.....	25
2.1. Notion de spéciation métallique.....	25
2.2. Notions de biodisponibilité des ETM dans les milieux aquatiques.....	26
2.3. Facteurs environnementaux influençant la biodisponibilité des ETM.....	27
2.3.1. Influence des facteurs physicochimiques.....	27
2.3.2. Influence des facteurs biotiques.....	30
3. Estimation de la spéciation et biodisponibilité des ETM en milieu aquatique.....	34
3.1. Méthodes d'analyse de la spéciation des ETM.....	34
3.1.1. Méthodes électrochimiques.....	34
3.1.2. Méthodes séparatives.....	35
3.1.3. Modèles de spéciation.....	37
3.2. Suivi des ETM dans le biote : la biosurveillance.....	38
3.2.1. La biosurveillance passive.....	38
3.2.2. La biosurveillance active.....	39
4. Modélisation cinétique de la bioaccumulation des ETM dans les organismes aquatiques.....	41
4.1. Modèle biodynamique.....	42
4.2. Paramètres du modèle cinétique.....	43
4.2.1. Constantes d'accumulation et de dépuration : k_{in} et k_{out}	44
4.2.2. Les paramètres de la voie trophique : AE et IR.....	46
4.3. Cas du cuivre : modèle de saturation.....	46
4.4. Validation des modèles cinétiques <i>in situ</i>	47

II. Matériels et méthodes.....	49
1. Modèles biologiques : <i>Gammarus pulex</i> et <i>Gammarus fossarum</i>	51
1.1. Morphologie générale et identification	51
1.2. Écologie du gammare	54
1.3. Utilisation des gammares en écotoxicologie et pour le suivi de la qualité chimique des milieux aquatiques	54
2. Expérimentations au laboratoire : cinétiques de bioaccumulation et modélisation	58
2.1. Résumé des expériences réalisées.....	58
2.2. Choix des populations de gammares	63
2.2.1. Populations de référence (chapitre IV)	64
2.2.2. Populations pré-exposées (chapitre V)	66
2.3. Pêche des individus.....	68
2.3.1. Tri des gammares et transport au laboratoire	68
2.3.2. Acclimatation des gammares aux conditions de laboratoire	70
2.4. Cinétiques de bioaccumulation	71
2.4.1. Principe	71
2.4.2. Avant l'exposition	73
2.4.3. Phase d'accumulation	76
2.4.4. Phase de dépuration	78
2.5. Exposition long terme de gammares naïfs au Cd ou au Pb en laboratoire, puis suivi des cinétiques de bioaccumulation (chapitre V.2)	79
2.5.1. Acclimatation long terme des gammares naïfs au Cd ou au Pb en laboratoire	79
2.5.2. Cinétiques de bioaccumulation en microcosmes	80
3. Expérimentations <i>in situ</i> : Procédure de transplantation (encagement)	81
3.1. Principe	81
3.2. Prélèvement de gammares issus d'une population de référence pour la transplantation	81
3.3. Transplantation <i>in situ</i>	81
3.4. Prélèvement dans le milieu	84
4. Analyses chimiques.....	85
4.1. Traitement des échantillons de gammares	85
4.2. Physicochimie des milieux	85
4.3. Analyse des métaux	86
4.3.1. Analyse des échantillons acquis lors des cinétiques de bioaccumulation	86
4.3.2. Analyse des métaux dans la colonne d'eau et dans les gammares transplantés	87
III. Modélisation de la bioaccumulation des métaux par voie dissoute chez le gammare : influence des facteurs physicochimiques et validation des modèles <i>in situ</i>	89
1. Modélisation de la bioaccumulation du Pb chez <i>Gammarus pulex</i> et influence des facteurs physicochimiques.	91
2. Validation <i>in situ</i> des modèles cinétiques de bioaccumulation du Cd, du Cu, du Ni et du Pb chez le gammare : expérimentation à l'échelle de la France.	103
2.1. Introduction	108
2.2. Materials and methods.....	110
2.2.1. Field data.....	110
2.2.2. Predictions of waterborne metal bioaccumulation in gammarids	112
2.2.3. Model validation	117
2.3. Results and discussion	117
2.3.1. Metal concentrations in water and 7d-transplanted gammarids	117
2.3.2. Kinetic model performances for predicting metal bioaccumulation in the field	120
2.4. Conclusion.....	124

2.5. Supporting information (SI)	125
<i>IV. Variabilité naturelle inter-populations des capacités de bioaccumulation des métaux par voie dissoute chez le genre Gammarus</i>	139
1. Introduction	145
2. Materials and methods.....	146
2.1. Choice, collection and maintenance of the reference populations.....	146
2.2. Physicochemical parameters of the water column at each site	148
2.3. Laboratory experiments	149
2.3.1. Kinetics of accumulation and depuration	149
2.3.2. Metal analyses in waters and in gammarids	150
2.4. Bioaccumulation modeling and kinetic parameters determination	150
2.4.1. Theory	150
2.4.2. Fitting to bioaccumulation data and statistical analyses	151
3. Results and discussion	152
3.1. Bioaccumulation kinetics	152
3.2. Kinetic parameters: uptake and elimination rate constants	155
3.3. Towards a generalized model	158
3.4. Uncertainty for model predictions	159
4. Conclusion	159
5. Supporting information	161
<i>V. Effet d'une exposition métallique chronique sur la capacité de bioaccumulation des métaux chez Gammarus</i>	165
1. Capacité de bioaccumulation des métaux chez des gammares issus de milieux contaminés	167
1.1. Introduction	171
1.2. Materials and methods.....	172
1.2.1. Choice, collection and maintenance of the impacted populations	172
1.2.2. Uptake and elimination kinetic experiments	174
1.2.3. Metal analyses	175
1.2.4. Biodynamic modeling of metal bioaccumulation	176
1.3. Results and discussion	176
1.3.1. Bioaccumulation kinetics	176
1.3.2. Comparison of the uptake and elimination rate constants	179
1.4. Conclusion.....	183
1.5. Supporting information	185
2. Capacité de bioaccumulation des métaux chez des gammares naïfs acclimatés à long terme en laboratoire au Pb ou au Cd	187
2.1. Bref rappel du « Matériels et méthodes ».....	187
2.1.1. Exposition long terme des gammares naïfs au Cd ou au Pb (en laboratoire)	188
2.1.2. Cinétiques de bioaccumulation en microcosmes	188
2.2. Résultats	189
2.2.1. Exposition long terme des gammares naïfs au Cd ou au Pb	189
2.2.2. Cinétiques de bioaccumulation en microcosmes	193
2.3. Conclusions et perspectives.....	198
<i>VI. Discussion générale</i>	201
1. Intérêt du gammare pour le suivi de la contamination métallique biodisponible dans les milieux aquatiques.....	203
2. Capacité du modèle cinétique à relier la contamination du milieu à celle des organismes.....	206
Conclusion et perspectives	211

Table des matières

Annexes	214
Références	219
Table des matières	238

Résumé

L'utilisation du biote dans le suivi de la contamination métallique des milieux aquatiques est aujourd'hui une approche pertinente, car elle permet (i) de répondre aux difficultés analytiques liées à la présence des métaux à faible dose dans l'eau, (ii) d'intégrer la contamination dans le temps et (iii) de renseigner sur la biodisponibilité des métaux, et leur potentiel toxique. Toutefois, l'interprétation des niveaux de contamination des organismes en termes de contamination biodisponible des milieux est difficile, car elle dépend de facteurs confondants (physicochimiques et biologiques). Dans ce contexte, l'objectif de ce travail de thèse est d'étudier la variabilité des capacités de bioaccumulation des métaux par voie dissoute chez le gammare, en s'appuyant sur un modèle cinétique. Des expérimentations en laboratoire ont permis d'étudier l'influence de facteurs physicochimiques (cations majeurs de l'eau) et biologiques (histoire de vie) sur les constantes d'accumulation et d'élimination du modèle pour le Cd, le Cu, le Ni et le Pb. Les résultats de ces travaux ont montré l'importance de prendre en compte l'influence des teneurs calciques du milieu et la pré-exposition des gammarides à certains métaux dans l'interprétation de la bioaccumulation. Des suivis de la contamination dans des gammarides transplantés *in situ* à l'échelle de la France ont montré les limites du modèle pour relier la contamination du milieu à celle des organismes. Ainsi, pour une meilleure caractérisation de la contamination biodisponible des milieux, il est nécessaire d'approfondir les connaissances sur l'influence d'autres facteurs physicochimiques et sur l'importance de la voie trophique comme source de contamination biodisponible pour les gammarides.

Mot clés : Bioaccumulation, biodisponibilité, métaux traces, modèle cinétique, *Gammarus*, facteurs environnementaux, histoire de vie

Abstract

The use of biota in order to monitor metallic contamination in freshwaters is a relevant tool to (i) overcome difficulties of measuring low concentrations in water, (ii) integrate metal fluctuations over time and, (iii) quantify the bioavailable fraction of metals, considered as potentially toxic. However, the interpretation of metal contents in aquatic organisms in terms of bioavailable contamination in freshwaters remains complex because it depends on confounding factors (physicochemical and biotic factors). In this context, the aim of this work was to study the variability of waterborne metal bioaccumulation abilities in gammarids, using the kinetic model. In the laboratory, the influence of water chemistry (major ions) and biological factors (local acclimation) on the accumulation and elimination rate constants of the kinetic model was assessed. The results showed that the consideration of calcium concentrations in water and the pre-exposure of gammarids to some metals were crucial for a reliable interpretation of bioaccumulation. Meanwhile, metal contamination was followed in transplanted gammarids at the national-scale (France) and showed the limits of kinetic modelling to link metal contamination in water to bioaccumulation. Therefore, to better characterize the bioavailable contamination in freshwaters, it is necessary to further study the influence of other physicochemical factors, such as temperature, and the importance of food as a source of bioavailable metals for gammarids.

Key-words: Bioaccumulation, bioavailability, trace metal, kinetic model, *Gammarus*, environmental factors, life history
