



Accumulation de l'argent et du cuivre chez l'huître japonaise *Crassostrea gigas* : outils géochimiques pour une optimisation du message environnemental

Mathilde Mikolaczyk

► To cite this version:

Mathilde Mikolaczyk. Accumulation de l'argent et du cuivre chez l'huître japonaise *Crassostrea gigas* : outils géochimiques pour une optimisation du message environnemental. Biodiversité et Ecologie. Université de Bordeaux, 2016. Français. NNT : 2016BORD0203 . tel-01423911

HAL Id: tel-01423911

<https://theses.hal.science/tel-01423911>

Submitted on 1 Jan 2017

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.

THÈSE

Présentée à

L'UNIVERSITÉ DE BORDEAUX

ÉCOLE DOCTORALE SCIENCES et ENVIRONNEMENTS

Par **Mathilde MIKOLACZYK**

POUR OBTENIR LE GRADE DE

DOCTEUR

SPECIALITE : Géochimie et Ecotoxicologie

**Accumulation de l'argent et du cuivre chez l'huître japonaise
Crassostrea gigas : outils géochimiques pour une optimisation du
message environnemental**

Sous la direction de : Pr. Jörg SCHÄFER
co-directeur : Pr. Gérard BLANC

Soutenue le 25 octobre 2016

Membres du jury :

M. Antonio COBELO-GARCIA, Directeur de Recherche, IIM-CSIC, Vigo, Espagne
M. Stefan NORRA, Professeur, KIT, Karlsruhe, Allemagne
Mme Marina COQUERY, Directrice de Recherche, IRSTEA, Lyon
Mme. Gaëtane LESPES, Professeur, Université de Pau et des Pays de l'Adour
M. Laurent LANCELEUR, Chercheur, Université de Pau et des Pays de l'Adour
M. Jean-François CHIFFOLEAU, Chercheur, IFREMER, Nantes

Rapporteur
Rapporteur
Examinatrice
Présidente
Co-Encadrant
Invité

Titre : Accumulation de l'argent et du cuivre chez l'huître japonaise *Crassostrea gigas*: outils géochimiques pour une optimisation du message environnemental

Résumé :

L'analyse des données de biosurveillance (RNO/ROCCH, IFREMER, 2003-2014) des concentrations en argent (Ag) et cuivre (Cu) dans les huîtres sauvages de 13 sites de la côte atlantique française a montré des variations spatio-temporelles reflétant les pressions locales. De fortes relations entre Ag et Cu semblent en partie dues à des facteurs physiologiques impliqués dans leur bioaccumulation chez les huîtres. Le rapport élémentaire Cu/Ag a montré un potentiel intéressant pour détecter des sources de Ag et Cu, invisibles à travers les concentrations absolues qui sont caractérisées par une très forte variabilité inter-individuelle. Les mesures chimiques et les observations histologiques dans les huîtres sauvages de la Gironde, ont montré une accumulation préférentielle de Ag et Cu dans la glande digestive, accompagnée d'importantes dégradations cellulaires. La méthode innovante du dopage isotopique est très sensible et précise pour observer les cinétiques rapides d'accumulation *in vivo* de Ag et Cu par voie directe à des niveaux d'exposition réalistes. Les signaux isotopiques ont permis de quantifier l'accumulation rapide des ETM dans les différents organes et d'observer des phénomènes de co-régulation entre Ag et Cu. De plus, elle représente une réelle avancée pour des expérimentations écotoxicologiques permettant d'analyser l'état de contamination initial et après exposition dans le même individu. L'étude de la voie trophique suggère une accumulation de Ag supérieure à celle de Cu chez les algues. La fraction de Ag et Cu particulaire potentiellement biodisponible des particules estuariennes a été estimée à 60% et 82%, respectivement. Les résultats ont montré que cette estimation dépend du temps d'exposition et de la concentration en sédiment, pouvant entraîner d'importantes sous-estimations.

Mots clés : *Cuivre ; Argent ; Biosurveillance ; Cinétiques d'accumulation ; Biodisponibilité*

Title : Silver and copper accumulation in oyster *Crassostrea gigas*: geochemical tools for environmental message optimization

Abstract :

The data-base analyses of the French biomonitoring program (RNO/ROCCH, IFREMER, 2003-2014) in terms of silver (Ag) and copper (Cu) concentrations accumulation in oysters from 13 sites along the French Atlantic Coast showed spatial and time-dependent variations reflecting local pressures. The high Ag and Cu relations seems to be partly due to physiological processes involved in their bioaccumulation by oysters. The Cu/Ag elementary ratios showed an interesting potential for Ag and Cu sources detection, which were invisible through the use of only absolute concentrations characterized by a high individual variability. Chemical measurements and histological observations performed in wild oysters from Gironde Estuary showed a preferential Ag and Cu accumulation in the digestive gland with important cellular damages. The innovative isotope spiking method is highly sensitive and precise to observe rapid *in vivo* Ag and Cu accumulation kinetics through direct pathway using close-to-real exposure concentrations. The isotopic signals allowed to quantify the rapid MTE accumulation in the different organs and to observe the Ag and Cu co-regulation. Furthermore, it represents a real step forward in ecotoxicological experiments allowing to obtain the initial and final contamination state inside the same organism. The study of the trophic pathway suggested a higher Ag accumulation in algae than for Cu. The Ag and Cu potentially bioavailable fraction in estuarine particles was estimated respectively at 60% and 82%. The results showed that this estimation depends on the exposure time and sediment concentration, which can lead to important under-estimations.

Keywords : *Copper ; Silver ; Biomonitoring ; Accumulation kinetics ; Bioavailability*

Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier Jörg Schäfer et Gérard Blanc, mes directeurs de thèse, pour m'avoir accordé leur confiance depuis mes débuts en master, et donné l'opportunité de me lancer dans cette aventure. J'ai beaucoup appris auprès de vous, aussi bien au niveau scientifique que personnel. Merci de m'avoir fait découvrir et partager votre passion, et de m'avoir accompagnée dans l'accomplissement de ce projet en me laissant la liberté de faire mon propre chemin et mes propres erreurs. J'espère avoir fourni un travail à la hauteur de votre enseignement et de vos attentes, et que cette thèse sera aussi utile à d'autres que celles dont j'ai pu me servir pour la mienne à son terme.

Je voudrais particulièrement remercier Laurent Lanceleur pour son encadrement et ses conseils précieux depuis mes débuts sur ce sujet. Laurent, rien de ce que je pourrais écrire ici ne serait suffisant pour décrire l'étendue de ma reconnaissance. Merci d'avoir cru en moi dès le début, et surtout d'y avoir cru pour deux quand c'était nécessaire. Je n'en serais pas là sans ton soutien sans faille, qui t'aura coûté beaucoup de Temps, de Patience (les majuscules sont méritées), et de bières...et de temps...et de patience...

Lionel et Cécile vous êtes les piliers de ce travail, et je ne vous l'ai jamais assez dit. Bravo pour votre self-control, et merci d'avoir été là chaque jour derrière moi, à réparer mes bêtises, vérifier mes calculs, dompter l'ICP, et éviter les catastrophes en tous genres (et j'ai pourtant de la ressource dans le domaine). Les machines ne sont pas amies, mais grâce à vous la guerre fut plus douce.

Ane, that was an amazing experience to work with you... Hope you enjoyed it too. We did it! Franchement you rock!

Je n'oublie pas ceux et celles qui ont permis de près ou de loin l'aboutissement de ce projet :

- celles qui ont été là à chaque instant, et sans qui je serais bien peu de choses : Fred, Melina, Régine, Teba, Mélanie, Cécile C, Zaza, Tiff. Vous avez été mes rayons de soleil, si précieuses dans tous les moments difficiles. Vous avez rendu ces années de thèse inoubliables, et je ne vous en remercierai jamais assez...
- mes coéquipières de galère : Léo, et Léa. J'ai adoré partager ces derniers mois avec vous

- les autres soutiens au sein d'EPOC : Hervé, Alex (merci pour tes conseils et ton regard neuf), Eric, Thomas (t'as géré, merci de m'avoir supportée sans broncher), Nicole, et Laureline
- toute l'équipe de la station marine de PLentzia et de la promo 2013 du Master MER pour l'accueil toujours chaleureux (et les dissections !)

Ces 3 années n'auraient eu aucun intérêt sans toutes ces belles rencontres, donc si nos vies sont des chemins à parcourir, alors vive le heureux hasard qui aura fait croiser les nôtres.

Enfin, tout le mérite de ce travail revient à ma famille pour leur amour et leur soutien : Papa, Mamy, Papy, Ciocia, Dziadzia. Maman, merci pour ton soutien, ton écoute, et pour tout le reste depuis toujours. Edou, tu mérites cette thèse autant que moi. Merci pour ta présence à mes côtés, de me supporter et me soutenir au quotidien entre les écueils et les joies, et de m'aimer quand c'est drôle et quand ça l'est moins.

Sommaire

<u>INTRODUCTION GENERALE</u>	1
<u>CHAPITRE 1</u>	5
<u>CONTEXTE SCIENTIFIQUE</u>	5
<u>1.1. Présentation des métaux étudiés (Ag et Cu)</u>	6
<u>1.1.1. Généralités</u>	6
<u>1.1.2. Production, domaines d'application, demandes mondiales</u>	6
<u>1.1.3. Sources anthropiques régionales</u>	9
<u>1.1.4. Toxicité</u>	11
<u>1.1.5. Normes</u>	13
<u>1.2. Comportements de Ag et Cu dans l'estuaire de la Gironde</u>	14
<u>1.2.1. L'estuaire de la Gironde</u>	14
<u>1.2.2. Réactivité et spéciation</u>	18
<u>1.3. L'huître japonaise <i>Crassostrea gigas</i> : enjeux socio-économique local et modèle d'étude idéal</u>	26
<u>1.3.1. Généralités</u>	26
<u>1.3.2. Outil de biosurveillance et enjeu régional</u>	27
<u>1.4. Biodisponibilité, mécanismes de contamination et biomarqueurs</u>	30
<u>1.4.1. Biodisponibilité</u>	30
<u>1.4.2. Contamination et biomarqueurs</u>	31
<u>CHAPITRE 2 : MATERIEL ET METHODES</u>	39
<u>2.1. Décontamination de la vaisselle de laboratoire</u>	40
<u>2.2. Les huîtres comme outil bio-indicateur de la pollution métallique environnementale</u>	40
<u>2.2.1. Suivi d'observation de la contamination chimique du littoral français (RNO/ROCCH, Ifremer).</u>	40
<u>2.2.2. Cinétique de la bioaccumulation de Ag et Cu chez l'huître <i>Crassostrea gigas</i> (Thunberg) par dopage isotopique</u>	43
<u>2.3. Cinétique de désorption de Ag et Cu dans l'estuaire de la Gironde</u>	48
<u>2.3.1. Echantillonnage des laisses de crue</u>	48

2.3.2. Echantillonnage de l'eau de mer	48
2.3.3. Déroulement de l'expérimentation	49
2.4. Méthodes analytiques	53
2.4.1. Dosage des ETM par spectrométrie de masse (ICP-MS)	53
2.4.2. Mesure des concentrations en Ag et Cu dans la phase dissoute	53
2.4.3. Mesure des concentrations en Ag et Cu dans la phase particulaire et dans le matériel biologique.....	57
2.4.4. Etude des atteintes histologiques dans la glande digestive chez l'huître <i>Crassostrea gigas</i>	60
 CHAPITRE 3 : ETUDE SPATIO-TEMPORELLE DE LA CONTAMINATION EN AG ET CU DES HUITRES SAUVAGES LE LONG DE LA COTE ATLANTIQUE FRANÇAISE.....	 61
3.1. Introduction	62
3.2. Article #1	64
3.3. Conclusion	92
 CHAPITRE 4 : ETUDE DE LA BIOACCUMULATION DE AG ET CU CRASSOSTREA GIGAS PAR DOPAGE ISOTOPIQUE (¹⁰⁷AG ET ⁶³CU).....	 95
4.1. Introduction	96
4.2. Article #2	97
4.3. Etude préliminaire de la bioaccumulation de Ag et Cu après une contamination par voie trophique / Preliminary study of copper and silver bioaccumulation in oyster <i>Crassostrea gigas</i> , after trophic exposure to stable isotopes).....	108
4.3.1. Experimental study on Ag and Cu uptake by the marine algae <i>Isochrysis galbana</i> , a primary producer, after direct exposure to stable isotopes	108
4.3.2. Experimental study on Ag and Cu uptake by pacific oyster <i>Crassostrea gigas</i> after trophic exposure to contaminated brown algae <i>Isochrysis galbana</i>	111
4.3.3. Summary and improvement perspectives	112
4.4 Conclusion	113

<u>CHAPITRE 5 : MOBILISATION DE AG ET CU A PARTIR DE PARTICULES FLUVIALES : CINETIQUES ET ESTIMATIONS OPERATIONNELLES DE LA FRACTION POTENTIELLEMENT BIODISPONIBLE EN MILIEU ESTUARIEN - CAS DE LA GIRONDE</u>	117
<u>5.1. Introduction</u>	118
<u>5.2. Cas de Ag : Article #3</u>	120
<u>5.3. Cas de Cu</u>	144
<u>5.4. Conclusion</u>	149
<u>CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES</u>	151
<u>BIBLIOGRAPHIE</u>	157
<u>ANNEXES</u>	177

Liste des figures

Chapitre 1 : Contexte scientifique

- Figure 1.1 :** Carte de l'estuaire de la Gironde avec ses subdivisions arbitraires et ses principaux affluents, la Dordogne et la Garonne. PK : Point Kilométrique (Allen, 1972).....p.15
- Figure 1.2 :** Bassin de Decazeville, source de pollution polymétallique de l'estuaire de la Gironde (Lanceleur, 2011).....p.18
- Figure 1.3 :** Distribution des différents types de particules présentes dans le milieu aquatique en fonction de leur taille (μm) (d'après Buffle and Van Leeuwen, 1990).....p.19
- Figure 1.4 :** Diagramme de mélange représentant deux droites de dilution théorique en fonction de la concentration de l'élément X dans le pôle fluvial et dans le pôle marin.....p.20
- Figure 1.5 :** Distribution des chlorocomplexes en fonction des concentrations en chlorures dans la gamme (a) 0-0,55 mol/L et (b) 0-055 mol/L (Barriada et al., 2007).....p.21
- Figure 1.6 :** Concentrations en Ag (Ag_d et $\text{Ag}_d\text{-UV}$) et MES le long du gradient de salinité de l'estuaire de la Gironde, pour les mois d'Avril 2008, Mars 2009 et Juin 2009. La droite noire représente la droite de régression linéaire pour le flux net en $\text{Ag}_d\text{-UV}$ (Boyle et al., 1974, 1982) avec un coefficient de corrélation (R), la p value pour un intervalle de confiance de 95%, n le nombre de points mesurés, et l'équation de la droite de dilution (Lanceleur et al., 2013).....p.23
- Figure 1.7 :** Distribution des concentrations dissoutes en Cu labile et des concentrations en MES en fonction du gradient de salinité pour les conditions d'étiage, de débits moyens et de crues. Les cercles blancs correspondent aux eaux de surface, les cercles noirs aux eaux de fond et les surfaces grises à la distribution des MES en surface.....p.25
- Figure 1.8 :** Production mondiale d'huîtres *Crassostrea gigas* en Ktonnes entre 1950 et 2014 (FAO, 2016).....p.26
- Figure 1.9 :** Concentration en Cd (A) et Ag (B) mesurées dans les huîtres de l'estuaire de la Gironde entre 1979 et 2010 au site de La Fosse (tiré de Lanceleur et al., 2011b).....p.28
- Figure 1.10 :** Concentrations en Ag ($\mu\text{g.g}^{-1}$ ps) mesurées dans les huîtres sauvages le long de la côte atlantique française (modifié d'après Chiffolleau et al., 2005).....p.29
- Figure 1.11 :** Schéma général des courbes dose-réponse typiquement observées chez un organisme vivant pour i) un macro-élément nutritif (e.g. Ca), ii) un micro-élément nutritif

(e.g. Cu), et iii) un élément toxique non essentiel (e.g. Pb, Ag) (modifié d'après Wright and Welbourn, 2002).....	p.31
Figure 1.12 : Modèle conceptuel des interactions entre les métaux et les organismes aquatiques (Campbell and Couillard, 2004).....	p.32
Figure 1.13 : Représentation schématique du i) transport facilité de cations, du ii) transport accidentel de cations liés à des anions, et de la iii) diffusion passive de complexes métalliques lipophiles (Campbell and Couillard, 2004).....	p.34
Figure 1.14 : Biomarqueurs de dommage: évolution théorique de la relation dose/effet en fonction du niveau d'organisation biologique (Amiard and Amiard-Triquet, 2008).....	p.36

Chapitre 2 : Matériel et méthodes

Figure 2.1 : Carte des sites de prélèvements d'huîtres effectués dans le cadre du RNO/ROCCH étudiés dans cette thèse.....	p.42
Figure 2.2 : Conditions de contamination des algues appliquées pour chaque bouteille de contamination dans le cadre de l'expérimentation sur le transfert des métaux par voie trophique	p.46
Figure 2.3 : Carte des sites d'échantillonnage de sédiments (La Réole) et d'eau de mer (Biscarosse) utilisés pour l'expérimentation visant à étudier la cinétique de désorption de Ag et Cu (cf. Chapitre 4). Le site de La Fosse (Estuaire de la Gironde) où se trouvent les bancs d'huîtres sauvages ainsi que la ville de Bordeaux ont été placés à titre indicatif.....	p.49
Figure 2.4 : Schéma de la mise en place de l'expérimentation de désorption de Ag et Cu pour un réactif donné; R : réactif renouvelé, NR : réactif non renouvelé, PC R : réplica pour les mesures de physico-chimie dans le cas du réactif renouvelé, PC NR : réplica pour les mesures de physico-chimie dans le cas du réactif non renouvelé.....	p.51
Figure 2.5 : Schéma du protocole expérimental de désorption de Ag et Cu pour un milieu de désorption donné; R : réactif renouvelé, NR : réactif non renouvelé, PC R : réplica pour les mesures de physico-chimie dans le cas du réactif renouvelé, PC NR : réplica pour les mesures de physico-chimie dans le cas du réactif non renouvelé.....	p.52
Figure 2.6 : Principe de la dilution isotopique (modifié d'après Lanceleur, 2011).....	p.54
Figure 2.7 : Photographie d'une valve droite d'huître contenant le corps mou de l'animal (légendé pour les tissus étudiés).....	p.59

Chapitre 3 : Etude spatio-temporelle de la contamination en Ag et Cu des huîtres sauvages le long de la Côte Atlantique Française.

Figures Article #1:

Figure 3.1: Map of oyster sampling sites for histological study.....	p.68
Figure 3.2: Map of oyster sampling sites of the French National Mussel Watch program (RNO/ROCCH) (modified from Mikolaczyk et al., 2015).....	p.70
Figure 3.3: Micrographs of the digestive glands of oysters sampled in the La Fosse (A and C) and Murueta (B and D) sites in November 2011 (hematoxylin-eosin staining).....	p.74
Figure 3.4: Autometallographical localization of metals in the digestive gland (A and C) and connective tissue (B and D) of oysters sampled in the La Fosse (A and B) and Murueta (C and D) sites in November 2011. Note the presence of metals as black silver deposits in the basal lamina of the epithelium of digestive tubules (arrows) and in the digestive cell lysosomes (asterisks) (A and C) and in the hemocytes (immune system cells) of the connective tissue close to the stomach (arrows;B) and in the neighbouring of digestive tubules (arrows; D).....	p.75
Figure 3.5: Copper concentrations over Ag concentrations in wild oyster soft body pools from the French Atlantic coast (2003-2014 data; RNO/ROCCH; Ifremer-envlit).....	p.77
Figure 3.6: Copper and Ag concentration data over time (1981-2014 period) measured in oyster pools from La Fosse site (Gironde Estuary) provided by the RNO/ROCCH program. The sampling frequency was 4 times per year from 1981 to 2002, twice a year from 2003 to 2007 and once a year since 2008. Note that the decrease in the sampling frequency in the Mussel watch program from 4 to 1 sampling per year has masked the seasonal variability in Cu and Ag concentrations resulting in a smoothed curve for the two metals.	p.80
Figure 3.7: Variations of Cu/Ag ratios over time measured in oyster pools from the Gironde Estuary and the Brest Bay provided by the RNO/ROCCH program.....	p.81
Figure 3.8: Cu/Ag concentration data in terms of Ag and Cu concentration data from oyster pools provided by the RNO/ROCCH program for the 2003-2014 period.....	p.82
Figure 3.9: Map of the main Aulne River tributaries.....	p.84
Figure 3.10: ANOVA test on Cu/Ag values (2003-2014) for each studied sites along the French Atlantic Coast.	p.86

Chapitre 4 : Etude de la bioaccumulation de Ag et Cu *Crassostrea gigas* par dopage isotopique (^{107}Ag et ^{63}Cu)

Figures Article #2:

Figure 1: Map of oyster sampling sites of the RNO/ROCCH program (the French national mussel watch program; IFREMER) with average Cu/Ag ratios and standard deviations indicated for each site.....p.100

Figure 2: Isotopic ratios $^{63/65}\text{Cu}$ and $^{107/109}\text{Ag}$ over time in different organs (a-e) and organisms (f), for different exposure conditions (tanks A, B, C and D).....p.102

Figure 3: Ag_T and Cu_T concentrations ($\mu\text{g/g}$; A) and loads (μg) in total organisms over time, and for different exposure conditions. Symbols represent average values ($n = 3$); bars represent min and max values.....p.103

Figure 4: Accumulated mortality through time in different experimental groups. Different letters in the lines indicated statistically different groups at $p < 0.05$ level.....p.104

Figure 5: Total metal accumulation (expressed as % of initially present metal loads) over time for the different exposure conditions to isotopically-labeled metal solutions (tanks A, B, C, and D) (S.L. = Significant Limit of visibility for classical concentration-based methods) for both Cu and Ag metals in a same scale (a) and with a zoom (x10) for Cu accumulation only (b).p.105

Figure 6: Average ratios ($\text{Cu}_{T\text{ acc}}/\text{Ag}_{T\text{ acc}}$) of metals accumulated in total organisms, calculated for each sampling group ($n = 3$), over time for different experimental conditions (tanks A, B, C, and D).....p.105

Autre figure:

Figure 4.1: Average isotopic ratios and standard deviations measured in algae *Isochrysis galbana* sampled at T0, T7, T14 and T21 ($n=4$) of the experimentation after 24 hours of exposure for each experimental condition (groups D and H: controls).....p.109

Chapitre 5 : Mobilisation de Ag et Cu à partir de particules fluviales : cinétiques et estimations opérationnelles de la fraction potentiellement biodisponible en milieu estuarien - cas de la Gironde

Figures Article #3:

Figure 5.1: Map of the South West France, with the sampling sites for sediments (La Réole) and water (Biscarrosse), and the main site of wild oysters sampling in the Gironde Estuary (La Fosse).....p.123

Figure 5.2: Average Ag desorption rates (%) in desorption media supernatants obtained after 10 minutes, 2, 4, 6, and 24 hours of exposure to HCl 1M (A) and seawater (B).....p.129

Figure 5.3: Desorption rates obtained after 24 hours for extractions by seawater and BSA-solution.....p.130

Figure 5.4: Released Ag concentrations with standard deviations obtained after 24 hours of sediment extractions in 200 ml of reagent supernatant at different sediment concentrations (SLRs) by HCl 1M (A) and seawater (B) with (R) and without (NR) renewing the reagent (after 2, 4, and 6 hours).....p.131

Autres Figures:

Figure 5.5: Average Cu desorption rates (%) in desorption media supernatants obtained after 10 minutes, 2, 4, 6, and 24 hours of exposure to HCl 1M (A) and seawater (B).....p.145

Figure 5.6: Released Ag concentrations with standard deviations obtained after 24 hours of sediment extractions in 200 ml of reagent supernatant at different sediment concentrations (SLRs) by HCl 1M (A) and seawater (B) with (R) and without (NR) renewing the reagent (after 2, 4, and 6 hours).....p.147

Liste des tableaux

Chapitre 1 : Contexte scientifique

Tableau 1.1 : Offre et demande mondiales en Ag par secteur d'application en K.onces (1 once =28,3 g) (The Silver Institute).....p.8

Tableau 1.2 : Production et demande en Cu et alliages à l'échelle mondiale pour l'année 2014 (en K.tonnes) (source : coppercouncil.org).....p.9

Tableau 1.3 : Valeurs moyennes de Cu dans divers milieux biologiques humains (INERIS, 2005).....p.13

Tableau 1.4 : Concentration en Ag_d mesurées en surface et en profondeur dans plusieurs masses d'eaux océaniques (Flegal et al., 1995 et Martin et al., 1983).....p.22

Chapitre 2 : Matériel et méthodes

Tableau 2.1 : Conditions d'exposition des huîtres appliquées pour chaque aquarium de contamination dans le cadre de l'expérimentation sur le transfert des métaux par voie directe.....p.44

Tableau 2.2 : Valeurs moyennes obtenues pour les analyses de matériaux certifiés dans cette thèse (*) et communiquées par les laboratoires fournisseurs.....p.60

Chapitre 3 : Etude spatio-temporelle de la contamination en Ag et Cu des huîtres sauvages le long de la Côte Atlantique Française.

Tableaux Article #1:

Tableau 3.1: Ag and Cu concentrations measured in wild oysters from the Gironde Estuary (La Fosse site) in 2011 and 2013, and calculated Cu/Ag ratios.....p.72

Tableau 3.2: Minimum and maximum Ag and Cu concentrations (mg.kg⁻¹) and calculated Cu/Ag ratios (* values updated from Mikolaczyk et al., 2015) in oyster pools (n > 10) from the French Atlantic coast (2003-2014 data from RNO/ROCCH).....p.78

Chapitre 4 : Etude de la bioaccumulation de Ag et Cu *Crassostrea gigas* par dopage isotopique (^{107}Ag et ^{63}Cu)

Tableaux Article #2:

Table 1: Minimum and maximum $^{107/109}\text{Ag}$ and $^{63/65}\text{Cu}$ ratios for each exposure condition (tanks A, B, C, D, and control E) and over time. According to Wilcoxon-Mann-Whitney U test, a black star (*) indicates a statistically significant ($\alpha \leq 0.05$) difference from the initial isotope ratio (time 0 days) for concerned values.....p.101

Autre tableau:

Table 4.1: Isotope ratios ($^{107/109}\text{Ag}$ and $^{63/65}\text{Cu}$) in oysters at the beginning of the experiment (T0) and after 21 days of exposure.....p.109

Chapitre 5 : Mobilisation de Ag et Cu à partir de particules fluviales : cinétiques et estimations opérationnelles de la fraction potentiellement biodisponible en milieu estuarien - cas de la Gironde

Tableau Article #3:

Tableau 5.1: Overview of desorption times and sediment amounts used for the assessment of metal fractions mobilized by HCl 1M extractions on freshwater sediments in different published studies.....p.133

Tableau 5.2: Silver dissolved and particular gross fluxes into the Gironde Estuary, and respective estimated potentially bioavailable fractions for the 2013-2015 period.....p.139

Tableau 5.3: Copper dissolved and particular gross fluxes into the Gironde Estuary, and respective estimated potentially bioavailable fractions for the 2013-2015 period.....p.148

INTRODUCTION GENERALE

L'activité humaine est responsable de l'introduction et la dissémination dans l'environnement de nombreuses substances dont les éléments traces métalliques (ETM). Les contextes industriel et agricole actuels qui utilisent des métaux de manière croissante s'ajoutant aux activités minières et métallurgiques passées, constituent des sources importantes de pollution métallique pour le milieu aquatique. Les environnements côtiers et estuariens constituant des zones de transition à l'interface entre le continent et l'océan, ils représentent des terrains d'études idéaux pour l'observation des transferts de métaux entre les différents compartiments. La dégradation de ces environnements côtiers entraîne des conséquences économiques et sociales importantes, notamment lorsque les concentrations mesurées dans les organismes aquatiques frôlent voire dépassent les normes de consommation. Au niveau régional, les mesures effectuées sur les huîtres sauvages de l'estuaire de la Gironde dans le cadre du programme de biosurveillance de l'IFREMER (RNO/ROCCH) ont permis de révéler sa forte pollution polymétallique dans les années 1980 (Boutier, 1981; Claisse, 1989). Cette période correspond à l'essor des réseaux de biosurveillance à échelle internationale, en réponse à la prise de conscience collective d'une pollution environnementale croissante, et d'une nécessité de développer des outils concrets de suivi de l'état des écosystèmes aquatiques. Le fonctionnement de ces programmes se base sur l'analyse quantitative des concentrations absolues en ETM (et autres polluants) dans les organismes appartenant à des espèces sentinelles. De nombreuses espèces de bivalves, telles que l'huître japonaise *Crassostrea gigas* ou la moule *Mytilus edulis*, sont particulièrement appréciées des programmes de biosurveillance grâce à leur grande capacité d'accumulation des métaux et des polluants organiques (Bova, 2011; Kim et al., 2008). Cependant, de nombreuses études ont mis en évidence l'existence de processus physiologiques induits par une exposition aux contaminants (des atteintes histologiques, la sécrétion de substances, des mécanismes de détoxification et de tolérance), dont l'expression peut amener à une modulation du comportement et donc de la réponse des organismes ciblés (Amiard and Amiard-Triquet, 2008, 2008; Baudrimont et al., 1999; Dagnino et al., 2007; Marchand et al., 2004; Riba et al., 2005; Ross et al., 2002a). Par ailleurs, de précédents travaux ont montré que l'exposition simultanée à plusieurs ETM peut conduire à des phénomènes de co-régulation (e.g. synergies, antagonismes) de l'accumulation de ces métaux (Amiard et al., 2004; Ettajani et al., 1992a; Mikolaczyk et al., 2015). Les programmes de biosurveillance, outils actuellement incontournables dans le suivi

des pressions côtières, permettent la collecte de données essentielles dans l'observation de la qualité environnementale. Il convient à présent de s'interroger sur le sens de leur message.

Cette interprétation nécessite (i) l'évaluation de la vulnérabilité des organismes et de la biodisponibilité des ETM dans le milieu, (ii) la compréhension des mécanismes d'accumulation des métaux par les organismes (e.g. voie directe et voie trophique) et des conséquences sur leur état physiologique, et (iii) l'utilisation d'outils complémentaires afin d'affiner la visibilité sur les niveaux d'exposition et l'identification des sources potentielles. Ces trois points constituent les principaux axes d'orientation de ce travail de thèse.

Dans ce contexte, l'estuaire de la Gironde est apparu comme un terrain d'étude particulièrement adéquat par sa pollution polymétallique historique, et par l'existence de la banque de données du RNO-ROCCH sur les concentrations en ETM mesurées dans les huîtres sauvages de l'embouchure, montrant les valeurs les plus élevées de toute la côte atlantique pour plusieurs d'entre eux (Cd, Ag, Cu) (Boutier, 1981; Chiffolleau et al., 2005; Mikolaczyk et al., 2015). Par ailleurs, le choix de focaliser le travail de cette thèse sur Ag et Cu s'appuie sur quatre faits principaux :

- Cu et Ag offrent tous deux un fort intérêt au niveau régional par leur utilisation intensive en agriculture (bouillie bordelaise pour Cu et « cloud-seeding » pour Ag),
- contrairement à Cd qui présente un enregistrement dans les huîtres en forte diminution depuis les années 1990, les concentrations en Ag et Cu sont en augmentation,
- plusieurs travaux préliminaires ont permis de révéler des phénomènes de co-régulation dans l'accumulation de ces deux métaux chez les organismes aquatiques,
- l'intérêt de comparer le comportement d'un élément connu pour être toxique mais ne faisant l'objet d'aucune norme environnementale tel que Ag à celui de Cu, un élément essentiel pouvant pourtant se révéler toxique à forte dose.

Partant de ces constatations, les objectifs spécifiques de cette thèse ont donc été de :

- préciser le message environnemental mis à disposition par les réseaux de biosurveillance en ce qui concerne la bioaccumulation dans les huîtres, en prenant en compte les variables inhérentes aux organismes biologiques
- étudier la co-accumulation de Ag et Cu chez l'huître japonaise *Crassostrea gigas* en utilisant la technique du traçage par isotopes stables pour permettre un modèle expérimental au plus proche des conditions réelles en isolant les voies de contamination directe et trophique

- optimiser un protocole d'estimation de la biodisponibilité potentielle en Ag et Cu associés aux particules sédimentaires en essayant de s'approcher au mieux des conditions environnementales tout en éliminant certains biais liés aux conditions expérimentales.

Afin de répondre à ces objectifs, ce travail repose sur le recours à un large éventail d'outils tels que (i) les données mises à disposition par les réseaux de biosurveillance, (ii) les outils géochimiques (e.g. traçage isotopique, utilisation de rapports élémentaires), et (iii) les expérimentations en laboratoire. Ceci permet une approche globale de la problématique environnementale de Ag et Cu, depuis leur arrivée dans l'estuaire jusqu'à leur accumulation dans les organismes qui y sont exposés. Cette thèse s'inscrit par ailleurs dans le cadre d'une étroite collaboration avec l'Université du Pays Basque (Espagne), et a été effectuée en complémentarité avec la thèse de Ane Rementeria Ugalde (en co-tutelle entre l'Université de Bordeaux, et l'Université du Pays Basque) qui sera soutenue prochainement (décembre 2016). Cette collaboration a rendu possible la réalisation d'expérimentations *in vivo* à la station marine de Plentzia (Pays Basque espagnol) ainsi qu'une approche pluridisciplinaire par la réalisation d'observations histologiques en complément des mesures géochimiques effectuées à l'université de Bordeaux.

L'ensemble des travaux de recherche effectués dans le cadre cette thèse est réparti en 5 chapitres, qui s'articulent autour de la problématique de l'accumulation de Ag et Cu dans les huîtres *Crassostrea gigas* et sa signification environnementale :

- *le premier chapitre* présente dans un premier temps les métaux étudiés, leurs comportements dans l'environnement, ainsi que la zone d'étude en se focalisant sur l'estuaire de la Gironde. Dans un second temps, il présente l'espèce étudiée et l'historique de la biosurveillance au niveau national. Pour terminer, il décrit les mécanismes d'accumulation des métaux et leurs conséquences chez les organismes aquatiques.
- *Le second chapitre* détaille les stratégies d'échantillonnage utilisées notamment par l'IFREMER (dans le cadre du réseau de biosurveillance RNO/ROCCH), la mise en place des expérimentations en microcosmes, et les techniques analytiques utilisées dans le cadre de cette thèse à l'université du Pays Basque, et au sein de l'équipe TGM (Transferts Géochimiques des Métaux) de l'université de Bordeaux.

- *Le troisième chapitre* constitue une analyse critique des concentrations en Ag et Cu mesurées dans les huîtres sauvages le long de la côte atlantique française par le programme de biosurveillance RNO/ROCCH, alimentée par des analyses chimiques et histologiques complémentaires.
- *Le quatrième chapitre* présente dans un premier temps la cinétique d'accumulation des isotopes stables de Ag et Cu chez l'huître japonaise *Crasostrea gigas* exposée par voie directe. Dans un second temps, nous analysons les résultats expérimentaux de l'accumulation de Ag et Cu chez l'algue *Isochrysis galbana* exposée par voie directe, et chez l'huître japonaise *Crasostrea gigas* exposée par voie trophique. Ce chapitre constitue également un travail de réflexion sur l'optimisation du protocole de traçage des voies de contamination par dopage isotopique.
- *Le cinquième et dernier chapitre* présente les résultats expérimentaux d'extractions sélectives parallèles de Ag et Cu à partir de sédiments frais de rivière, visant à estimer la fraction potentiellement biodisponible de Ag et Cu dans l'estuaire de la Gironde, tout en discutant les conditions expérimentales adéquates afin d'approcher au mieux les conditions environnementales (e.g. turbidité, salinité, chlorinité, renouvellement du milieu).

Chapitre 1

Contexte scientifique

1.1. Présentation des métaux étudiés (Ag et Cu)

1.1.1. Généralités

L'argent (Ag ; numéro atomique 47) est un métal rare, présent dans la croûte terrestre à une concentration de 0,055 mg/kg (Wedepohl, 1995). Il possède deux isotopes stables (^{107}Ag à 51,8% et ^{109}Ag à 49,2%) et 48 radioisotopes artificiels (Calmon et al., 2002). Dans la nature, il peut se trouver à l'état natif (Ag), sous forme d'argentite Ag_2S (sulfate d'argent), ou encore sous forme de minerais où il est associé à d'autres métaux chalcophiles tels que Pb, Cu, Fe, Zn, Au et As (US PHS, 1990). C'est sous cette forme qu'il est le plus couramment rencontré, puisque les mines exploitant exclusivement l'argent ne représentent que 30% de la production mondiale (The Silver Institute). La plupart du temps, il constitue un produit secondaire de l'exploitation d'autres métaux, comme aux Etats-Unis (mines de Pb, Cu, et Zn), en Afrique du Sud (exploitation de Pt et Au) ou encore au Canada (fonderies de Ni) (Smith and Carson, 1977).

Le cuivre (Cu ; numéro atomique 29) est un oligo-élément essentiel à la présence de la vie sur Terre, et indispensable au bon fonctionnement de nombreuses fonctions physiologiques chez les plantes supérieures et les animaux (Underwood and Suttle, 1999). Il possède deux isotopes stables (^{63}Cu à 69,2% et ^{65}Cu à 30,8%) et 27 radioisotopes qui n'existent pas à l'état naturel. Sa concentration dans la croûte terrestre est d'environ 55 mg/kg (Institut Européen du Cuivre). Il est présent à l'état natif, mais cela ne constitue pas sa forme majoritaire. La plupart du temps, le cuivre se présente sous forme de sulfures (chalcoppyrite, chalcocite), de carbonates (azurite, malachite), d'oxydes (mélancolise), de chlorures (atacamite) ou de sulfates (brochantite). Sa forte affinité pour la matière organique et sa capacité à se lier aux minéraux expliquent sa forte accumulation dans les sols (Flemming and Trevors, 1989).

1.1.2. Production, domaines d'application, demandes mondiales

1.1.2.1. Argent

L'extraction minière de l'argent a débuté vers 3000 ans avant J-C en Anatolie (sur les terres de l'actuelle Turquie) (The Silver Institute). Sa rareté et sa résistance à la corrosion ont suscité l'intérêt de l'Homme depuis l'Antiquité où il était utilisé dans la fabrication de pièces de monnaies, de bijoux et d'argenterie. Cette dernière application témoigne par ailleurs de la

connaissance d'une autre de ses propriétés : le pouvoir antibactérien de Ag. En effet, les denrées périssables ainsi que les boissons telles que le lait, l'eau et le vin étaient stockés dans des récipients en Ag afin d'en optimiser la conservation. Jusque dans les années 2000, les émissions produites par l'industrie de la photographie argentique constituaient une source importante de pollution environnementale en Ag (Amiard, 2011). Après l'arrivée de la photographie numérique, d'autres sources en Ag ont émergé (Lanceleur et al., 2011a a). De nos jours, Ag est utilisé dans de nombreux domaines (INERIS, 2014; The Silver Institute) :

- en électronique, où ses propriétés électrochimiques sont prisées pour la fabrication e.g. de connecteurs (très utilisés dans l'industrie automobile), cellules photovoltaïques, batteries, encres,...
- en métallurgie pour la fabrication d'alliages très prisés en soudure
- en photographie, via l'utilisation de certains sels d'argent (e.g. AgNO_3) dotés d'une forte photosensibilité et d'une grande solubilité dans l'eau
- en médecine, où il est utilisé pour ses propriétés biocides (efficaces sur plus de 650 types de bactéries) et sous forme d'alliages (amalgames dentaires)
- en agriculture, avec l'utilisation de générateurs de nuclei de condensation à iodure d'argent pour lutter contre la grêle (« *cloud seeding* »)
- au niveau urbain, où Ag est utilisé dans les filtres domestiques ou les solutions de traitement d'eau potable sous forme de Ag^+ (60 $\mu\text{g/l}$) en remplacement du chlore. Ag est également présent dans bien d'autres produits domestiques accessibles dans le commerce, tels que les textiles (chaussettes anti-odeurs), déodorants anti-transpirants, lave-linges (Ag^+ , système Silver Wash chez Samsung) et lessives anti-moisissures, ...

Toutes ses applications constituent des sources additionnelles de Ag pour l'environnement, touchant particulièrement le compartiment aquatique via les effluents urbains. Parmi toutes ces sources, nombreuses sont celles qui utilisent Ag sous forme nanoparticulaire (particules de taille nanométrique), notamment présent dans les produits domestiques. Les nanotechnologies sont en plein essor depuis quelques années, et constituent une source émergente non négligeable de pollution environnementale. Bien que leur utilisation soit connue, aucun dispositif ne permet de les séparer des autres colloïdes ou des nanoparticules naturelles d'Ag (Fabrega et al., 2011). Ce gap analytique empêche donc leur quantification dans l'environnement et la détermination de la part anthropique des apports en Ag. La mise en place de méthodes analytiques permettant

de résoudre ce problème constitue aujourd'hui un enjeu majeur pour la compréhension des cycles des polluants métalliques dans l'environnement à l'échelle mondiale.

Tableau 1.1: Offre et demande mondiales en Ag par secteur d'application en K.onces (1 once =28,3 g) (The Silver Institute).

TABLE 1 - WORLD SILVER SUPPLY AND DEMAND

(million ounces)	2006	2007	2008	2009	2010	2011	2012	2013	2014	2015
Supply										
Mine Production	643.4	667.7	684.7	717.3	753.0	757.6	790.8	823.7	868.3	886.7
Net Government Sales	78.5	42.5	30.5	15.6	44.2	12.0	7.4	7.9	-	-
Scrap	207.1	204.2	202.0	201.2	227.5	261.5	255.5	192.1	168.3	146.1
Net Hedging Supply	-11.6	-24.1	-8.7	-17.4	50.4	12.2	-47.1	-34.8	16.8	7.8
Total Supply	917.3	890.3	908.6	916.7	1,075.2	1,043.3	1,006.6	988.9	1,053.3	1,040.6
Demand										
Jewelry	174.5	182.3	177.6	176.9	190.0	187.9	185.4	217.8	224.0	226.5
Coins & Bars	50.7	56.1	192.3	91.6	144.4	210.4	160.5	242.1	236.1	292.3
Silverware	62.1	60.2	58.4	53.2	51.6	47.2	43.7	58.8	60.7	62.9
Industrial Fabrication	648.9	661.0	656.8	542.6	650.3	676.3	615.0	619.1	611.2	588.7
...of which Electrical & Electronics	242.3	262.5	271.7	227.4	301.2	290.8	266.7	266.0	263.4	246.7
...of which Brazing Alloys & Solders	54.7	58.3	61.6	53.6	60.9	62.7	60.6	63.2	66.1	61.1
...of which Photography	142.2	117.0	98.2	76.4	67.5	61.2	54.2	50.5	48.5	46.7
...of which Photovoltaic*	-	-	-	-	-	75.8	62.9	62.5	63.2	77.6
...of which Ethylene Oxide	6.6	7.9	7.4	4.8	8.7	6.2	4.7	7.7	5.0	10.2
...of which Other Industrial*	203.1	215.3	217.9	180.4	212.1	179.4	165.8	169.3	165.1	146.4
Physical Demand	936.3	959.6	1,085.1	864.2	1,036.4	1,121.8	1,004.6	1,137.9	1,131.9	1,170.5
Physical Surplus/Deficit	-19.0	-69.3	-176.6	52.5	38.8	-78.5	2.0	-149.0	-78.6	-129.8
ETP Inventory Build	126.8	54.8	101.3	156.9	129.5	-24.0	55.3	2.5	1.5	-17.7
Exchange Inventory Build	-9.0	21.5	-7.1	-15.3	-7.4	12.2	62.2	8.8	-8.8	0.3
Net Balance	-136.8	-145.5	-270.7	-89.2	-83.3	-66.7	-115.5	-160.2	-71.3	-112.5
Silver Price, \$ per oz.	11.55	13.38	14.99	14.67	20.19	35.12	31.15	23.79	19.08	15.68
*Photovoltaic demand included in "Other Industrial" prior to 2011										
© GFMS, Thomson Reuters / The Silver Institute										

1.1.2.2. Cuivre

La première utilisation du cuivre remonte au Néolithique vers 5000 ans avant J-C, époque à laquelle il était utilisé pour la fabrication d'outils et d'armes de chasse. Son origine géographique est multiple, mais c'est sa présence sur l'île de Chypre qui lui a valu son nom (*Aes Cyprium*). Vers 3500 ans avant J-C, les anciennes civilisations utilisaient déjà le bronze (cuivre et étain). De nos jours, le cuivre est un métal très prisé, notamment grâce à sa conductivité électrique et thermique. Il est utilisé en métallurgie pour la fabrication d'alliages (e.g. laiton: cuivre-zinc, bronze : cuivre-étain, constantan : cuivre-nickel,...) servant à la production de matériels électriques, de plomberie, dans la joaillerie, et dans les peintures anti-

salissures. Actuellement, le domaine de l'électricité représente 50% de l'utilisation du cuivre. En agriculture et en médecine, Cu est employé pour ses propriétés fongicides. Si les domaines d'application cités ci-avant sont les plus importants, le cuivre est également utilisé dans d'autres secteurs comme catalyseur de réactions chimiques, agent désodorisant et purifiant (industrie pétrolière), et pigment (céramiques, industrie textile) (Amiard, 2011).

En 2014, la production minière mondiale en cuivre atteignait 27520.10^3 tonnes, pour une consommation mondiale de 27496.10^3 tonnes (Tab. 1.2). Depuis les années 1960, la consommation mondiale en Cu raffiné a augmenté de plus de 250%, avec une tendance qui se confirme pour les années à venir (Institut Européen du Cuivre).

Tableau 1.2: Production et demande en Cu et alliages à l'échelle mondiale pour l'année 2014 (en K.tonnes)
(Institut Européen du Cuivre)

2014

	Production			Demand		
	Copper	Alloy	Total	Copper	Alloy	Total
EU28	2860	1448	4308	2699	1292	3991
Western Europe	2463	1396	3859	2257	1239	3497
ASEAN	963	156	1119	941	251	1192
Central & Eastern Europe (Ex Russia)	1115	266	1381	1135	280	1415
ROW	802	40	842	895	59	954
Latin America (ex Mexico & Brazil)	162	33	195	187	31	218
Mexico	437	154	591	487	190	677
Brazil	377	101	478	370	102	472
Russia	390	37	428	403	30	432
China	9266	2472	11738	9312	2594	11907
India	791	262	1053	877	302	1179
Japan	1078	396	1474	1043	314	1357
South Korea	763	432	1195	688	324	1013
Taiwan	408	164	572	300	129	429
Middle East	628	30	658	704	41	745
Australasia	38	0	38	69	7	76
North America	1784	455	2238	1838	517	2354
Latin America	977	288	1265	1044	323	1367
Africa	346	10	356	352	48	399
Europe	3968	1699	5667	3795	1549	5344
All Asia and Australasia	14072	3922	17994	14058	3973	18031
WORLD ALL	21146	6373	27520	21086	6410	27496

1.1.3. Sources anthropiques régionales

1.1.3.1. Le bassin de Decazeville : une source historique

L'érosion des terrils produits par l'activité minière et industrielle située sur le bassin de Decazeville a constitué une source majeure en ETM (Cd, Pb, Hg, Zn, Ag, Cu) (Audry et al., 2004a ; Lanceleur et al., 2011b) pour le bassin versant de l'estuaire de la Gironde pendant plus

d'un siècle jusqu'à l'arrêt des activités sur le site en 1986. Les analyses de carottes sédimentaires effectuées en amont sur le Lot (Marcenac) et en aval (Cajarc) ont montré que les travaux de remédiation sur les déchets industriels ont permis une diminution progressive des concentrations en Ag particulaire (Ag_p) de 6,7 mg/kg (atteints juste après une pollution accidentelle issue du site industriel) à 0,4 mg/kg en 1998 (Audry et al., 2004a). Cependant, et ce malgré les efforts de remédiations, les apports importants en ETM provenant du lessivage des terrils dans le bassin de Decazeville continuent d'affluer venant polluer l'estuaire. En effet, entre 1999 et 2009, le Riou-Mort qui draine le bassin de Decazeville a présenté des concentrations maximales 20 à 200 fois supérieures aux maximas rencontrés dans les autres affluents de la Gironde étudiés (Lot, Garonne, Dordogne et Isle) qui variaient entre 0,13 et 14 mg/kg pour Ag_p et entre <0,5 ng/l et 5,7 ng/l pour Ag_d (Lanceleur et al., 2011a). Un suivi d'observation depuis 1991 du continuum Riou Mort-Lot-Garonne-Gironde a été maintenu par l'équipe TGM de l'Université de Bordeaux jusqu'à ce jour afin de quantifier les contributions en ETM des différents tributaires de l'estuaire.

1.1.3.2. Sources contemporaines

Au niveau régional, le secteur agricole est très présent puisque près de 50% du bassin versant de la Gironde est exploité pour la production céréalière, maraîchère ou viticole (Veyssy et al., 1998). Afin de protéger les récoltes contre les orages de grêle, une partie des agriculteurs utilisent la méthode d'ensemencement des nuages avec des générateurs de nucléi de condensation à iodure d'argent. En 2011, le réseau national ANELFA (Association Nationale d'Etude et de Lutte contre les Fléaux Atmosphériques) comprenait 210 générateurs en activité sur le bassin versant de l'estuaire de la Gironde (Lanceleur et al., 2011a), ce qui correspond au rejet de 100 à 120 kg de Ag dans l'atmosphère pour les 12 à 25 jours annuels d'alerte à la grêle. L'agriculture constitue également une source importante de Cu pour l'estuaire. En effet, il est massivement utilisé dans la lutte contre le mildiou en viticulture (sous forme de bouillie bordelaise) et entre dans la composition d'aliments pour animaux d'élevage où il est utilisé comme additif. On trouve également une utilisation massive de Cu dans les peintures antifouling biocides notamment utilisées pour la protection des coques de bateaux, impactant dans ce cas directement le système aquatique (Katrantsas et al., 2003; Turner, 2010).

Les effluents urbains représentent également une source importante en ETM pour le système fluvio-estuarien (e.g. Deycard et al., 2014). Les rejets en Ag des stations d'épuration de Toulouse et de Bordeaux ont été estimés à 42 et 57 kg/an respectivement (Lanceleur et al.,

2011a). Les effluents des stations d'épuration (STEP) de la Communauté Urbaine de Bordeaux (CUB) devenue Bordeaux Métropole en 2016, sont responsables d'un apport en Ag total (Ag_t) de $16,4 \text{ g.jour}^{-1}$ (dont $4,2 \text{ g.jour}^{-1}$ de Ag_d) pour la station Louis Fargue, et de $6,3 \text{ g.jour}^{-1}$ (dont $4,3 \text{ g.jour}^{-1}$ de Ag_d) pour la station Clos de Hilde (Deycard, 2015), ainsi que de 3900 g.jour^{-1} de Cu_t pour l'année 2011 (Deycard et al., 2014). Le traitement des eaux usées par les STEP permet cependant une rétention $>85 \%$ de Ag_t et de 81% du Cu_t par rapport aux flux bruts arrivant dans les STEP.

1.1.4. Toxicité

La toxicité relative des ETM les plus fréquemment rencontrés dans l'environnement peut être exprimée de la manière suivante : $Hg > Ag > Cd > Cu > Zn > Ni > Pb > Cr > Cr > Sn$ (Amiard, 2011).

Les métaux Cu et Ag sont considérés comme faisant partie des métaux les plus toxiques pour le biote aquatique. Le cuivre, bien qu'étant un élément essentiel (Debelius et al., 2009), peut être toxique pour des organismes soumis à des fortes doses d'exposition ; l'argent est quant à lui un élément toxique même à faible dose (Luoma et al., 1995; Ratte, 1999; Tappin et al., 2010).

La seule mesure des concentrations en Ag et Cu ne permet pas d'appréhender leur toxicité sur les organismes. Chez certains organismes marins, la toxicité des ETM se traduit par une modification de leur métabolisme (ralentissements, dysfonctionnements, adaptations) et des dégradations tissulaires (c.f. 1.4.2.). Chez les mollusques marins, le stress métallique (notamment Cd, Ag, Cu) peut induire une augmentation de sécrétion de mucus, dont la production représente un coût énergétique significatif pour l'organisme (Davies et al., 1990). En effet, le coût énergétique de la production de mucus chez un gastéropode est plus important que celui de la locomotion pour un reptile ou un mammifère de taille équivalente (Leung et al., 2000). Chez les poissons, l'accumulation de Ag (sous forme de Ag^+) est facilitée par la similarité de charge entre l'ion Ag^+ et les éléments essentiels Cu^+ , Na^+ . L'argent s'introduit alors dans les « cellules à chlorures » responsables de l'osmorégulation, où il inhibe les enzymes responsables du transport et donc de l'assimilation de Na^+ et Cl^- (Bielmyer et al., 2008). Chez l'huître, l'accumulation de Ag peut entraîner une diminution de la croissance (Sanders et al., 1990). Enfin, certains paramètres physiologiques, tels que le stade de développement des gonades, peuvent avoir une influence importante sur les concentrations en ETM mesurées chez les bivalves (Páez-Osuna et al., 1995).

Certains organismes estuariens peuvent développer une tolérance face à une exposition chronique à un polluant. Cette tolérance peut être définie par la capacité à faire face au stress d'origine naturelle (changements de salinité, température, taux d'oxygénation) ou anthropique (contamination par une large gamme de polluants) auquel ils sont soumis dans leur environnement (Amiard-Triquet and Dauvin, 2009). Cette tolérance peut être une conséquence d'adaptations physiologiques mises en place par l'organisme pour s'acclimater lors d'une exposition à des concentrations subléthales (e.g. production de métallothionéines ; c.f. 1.4.2.) et n'est, dans ce cas, pas transmissible à la génération suivante. Cependant, certaines adaptations résultant d'une sélection face à la pression environnementale peuvent engendrer des modifications génétiques qui seront alors transmises aux générations futures (Amiard-Triquet, 2009).

Chez l'Homme, une exposition chronique à Ag peut entraîner une « argynie » se traduisant par une coloration bleu-grise de la peau due à la déposition de Ag dans les tissus (Smith and Carson, 1977). Brook et al. (2004) ont corrélié la pollution atmosphérique au nano-Ag avec diverses maladies respiratoire, cardiovasculaire, ainsi que des cas de cancers. Une exposition chronique de l'Homme aux vapeurs de « bouillie bordelaise » (Cu) entraîne une augmentation de l'absorption de Cu dans l'organisme (OMS IPCS, 1998) ainsi qu'une pneumopathie nommée « Vineyard Sprayers' Lung ». Ce syndrome pulmonaire peut parfois être accompagné de lésions hépatiques (INERIS, 2005). Les intoxications au Cu par de l'eau de boisson peuvent fréquemment conduire à des troubles gastro-intestinaux. Des cas de syndrome de « fièvre des fumées de métaux » (se traduisant par des symptômes de fièvre, céphalée, sécheresse buccale, douleurs musculaires et sueurs froides) ont été observés chez des personnes exposées de manière chronique à des poussières et des fumées de Cu à des concentrations de 0,075 à 0,12 mg/m³ (Gleason, 1968).

Pour Ag et Cu, les cas d'intoxications aiguës sont rares et essentiellement dues à des ingestions accidentelles (Smith and Carson, 1977) ou volontaires (e.g. suicide au sulfate de Cu, Chuttani et al., 1965).

En outre, Ag est suspecté de provoquer des dysfonctionnements dans les STEP dus à son action biocide qui amoindrirait l'efficacité d'épuration (INERIS, 2014). Par ce biais, la présence de Ag et de nano-Ag (Ag sous forme nano-particulaire) constitue un enjeu majeur de santé publique au niveau urbain et périurbain.

1.1.5. Normes

En France, Ag et ses composés ne font l'objet d'aucune norme ou valeur d'exposition de la population. Au niveau Européen, Ag n'est pas concerné par la directive 2008/105/EC des substances prioritaires du parlement Européen, ni par la liste des substances potentiellement préoccupantes définies par l'OSPAR. Cependant il appartient à la liste II de la Directive n°76/464/CEE du 4 mai 1976. Les substances figurant sur cette liste « ont sur le milieu aquatique un effet nuisible qui peut cependant être limité à une certaine zone et dépend des caractéristiques des eaux de réception et de leur localisation ». Le règlement REACH (Registration, Evaluation, Authorization and restriction of Chemicals) de l'Union Européenne, autorise l'utilisation du nitrate de Ag dans les produits cosmétiques mais uniquement dans les colorants pour cils et sourcils à une concentration maximale de 4 % (REACH 1223/2009, annexe III). Le règlement européen UE 2012/231 autorise l'utilisation de Ag dans les additifs alimentaires (notamment E 175 et E 174). L'argent n'est pas concerné par la liste des micropolluants à mesurer dans les stations de traitement des eaux usées traitant une charge brute de pollution ≥ 6000 kg DBO5/jour (INERIS, 2005).

En France et en Europe la valeur seuil relative aux eaux destinées à la consommation humaine (à l'exclusion des eaux minérales) est de 2 mg/L pour Cu. Cette valeur est également préconisée par l'OMS dans le cadre de sa Directive de qualité pour l'eau de boisson (2004). Le cuivre n'est pas concerné par la Directive de qualité pour l'air de l'OMS (2000). Des exemples de valeurs moyennes recensées dans plusieurs milieux biologiques sont décrits ci-après dans le tableau 1.3. Les concentrations ubiquitaires (i.e. rencontrées majoritairement dans les milieux pas ou peu contaminés) de Cu sont <10 ng.m⁻³ dans l'air, comprises entre 1 et 10 µg.L⁻¹ dans l'eau douce, $<0,25$ µg.L⁻¹ dans l'eau de mer, comprise entre 10 et 40 mg.kg⁻¹ dans les sols, et <50 mg.kg⁻¹ dans les sédiments (INERIS, 2005). La PNEC (Predicted No Effect Concentration) est une valeur seuil utilisée dans l'évaluation des risques chimiques environnementaux, et est définie par la concentration maximale d'un élément sans effet prévisible pour l'environnement (INERIS, 2015). Elle est de 1,6 µg/L en eau douce et 0,8 µg/L en eau salée pour Cu (PNEC Ag non disponible ; INERIS, 2015).

Tableau 1.3: Valeurs moyennes de Cu dans divers milieux biologiques humains (INERIS, 2005)

Milieux biologiques	Valeurs de référence
Sang (sérum)	800-1200 µg/L (OMS, 1996)
Urine	30-60 µg/L (Harris, 1991)
Cheveux	8,9 mg/g (Finelli <i>et al.</i> , 1981)

1.2. Comportements de Ag et Cu dans l'estuaire de la Gironde

1.2.1. L'estuaire de la Gironde

1.2.1.1. Géographie

Situé dans le Sud-Ouest de la France, l'estuaire de la Gironde (Fig. 1.1) est le plus vaste d'Europe Occidentale avec une superficie de 450 km² à marée basse et de 635 km² à marée haute (Salomon, 2002). Il est issu de la convergence de la Garonne (647 km de long) et de la Dordogne (490 km de long), et s'étend sur ~175 km depuis la limite de marée dynamique jusqu'à l'embouchure. L'estuaire de la Gironde draine le bassin versant de la Garonne d'une superficie de 79000 km². Ce bassin est constitué de trois sous bassins principaux : i) celui de la Garonne (51500 km²), ii) de la Dordogne (15000 km²), et iii) celui de l'Isle (7000 km²) (Schafer and Blanc, 2002). Dans ces trois sous bassins, la limite de marée dynamique se trouve respectivement à La Réole, Pessac sur Dordogne et Guîtres (Fig. 1.1).

L'estuaire de la Gironde est peu profond, et présente une morphologie en entonnoir. Il peut être subdivisé en quatre parties de l'amont vers l'aval (Fig. 1.1) : i) l'estuaire fluvial, ii) l'estuaire amont (qui comprend des îles et des barres sableuses formant ainsi un système de chenaux mais avec un seul chenal de navigation), iii) l'estuaire aval (zone avec deux chenaux de navigation), iv) et l'embouchure (avec deux passes, la Passe Sud et la Passe Ouest).

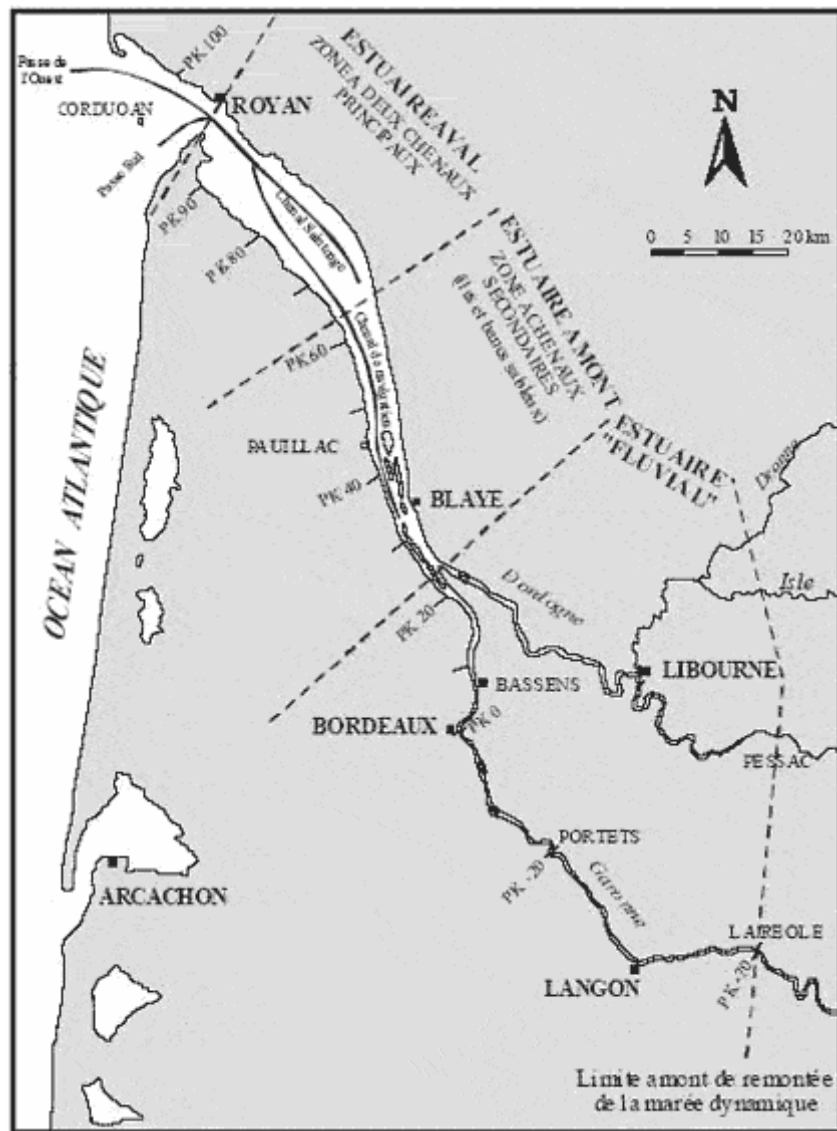


Figure 1.1 : Carte de l'estuaire de la Gironde avec ses subdivisions arbitraires et ses principaux affluents, la Dordogne et la Garonne. PK : Point Kilométrique (Allen, 1972).

1.2.1.2. Hydrodynamisme

Le cycle de marée dans l'estuaire de la Gironde est semi-diurne, avec un marnage variant de 1,5 à 5,5 mètres. Il s'agit donc d'un estuaire méso à macro-tidal d'après la nomenclature de Hayes (1975).

La forme en entonnoir de l'estuaire de la Gironde facilite la pénétration de la marée au niveau de l'embouchure, et permet une accélération des courants grâce au rétrécissement en amont (Salomon, 2002). L'effet de ce rétrécissement en amont prime sur les forces de frottement exercées par la marée, ce qui engendre une asymétrie de l'onde de marée avec une amplitude qui augmente de l'amont vers l'aval. On parle alors d'estuaire hypersynchrone d'après la

classification de Le Floch (1961). Ainsi, la vitesse du courant est plus importante lors du flot par rapport au jusant, entraînant une importante remise en suspension des particules sédimentaires qui sont emmenées vers l'amont et seront ensuite redéposées durant l'étal au point nodal de marée. Ces particules sédimentaires en suspension piégées en amont constituent le « bouchon vaseux » de l'estuaire de la Gironde. Il s'agit d'une zone maximale de turbidité (ZMT) présentant une forte concentration en MES à sa surface ($<1 \text{ g/L}$) dont la charge totale en particules représente 4.10^6 à 6.10^6 tonnes, variant en fonction des différentes conditions hydrologiques et du cycle saisonnier (Jouanneau, 1982). La matière organique y subit d'importants processus de dégradation entraînant la libération de Cu dissous (et d'autres métaux) en grande quantité dans cette zone (Masson et al., 2011). La position du bouchon vaseux est contrôlée par les conditions hydrologiques, avec un déplacement vers l'aval en période de forts débits pouvant être expulsé de l'estuaire en période de crue sous forme de panache turbide (Castaing and Allen, 1981; Sottolichio and Castaing, 1999). Malgré la présence de cette ZMT, l'estuaire de la Gironde reste relativement bien oxygéné (Abril et al., 1999), ce qui s'explique par de faibles teneurs en matière organique (Abril et al., 2002).

1.2.1.3. Anthropisation

La pression anthropique impacte le système estuarien de manière directe (e.g. rejets industriels et/ou urbains, activité agricole,...) et de manière indirecte (e.g. changements globaux, crues,...). Les effets de ces modifications environnementales influencent les paramètres physico-chimiques de l'estuaire, tels que :

- la turbidité de la colonne d'eau : les années de sécheresse, les zones de courants faibles et les retenues d'eau par des barrages, sont propices au dépôt des particules en profondeur, constituant ainsi d'importants stocks de métaux et autres polluants potentiellement remobilisables lors du retour du courant (e.g. crue, ouverture de barrage ; Coynel et al., 2007).
- la température de l'eau en surface peut être impactée par les aménagements industriels utilisant l'eau de l'estuaire. En Gironde, le circuit de refroidissement de la centrale nucléaire du Blayais est alimenté par l'eau de l'estuaire. La température de surface à cet endroit augmente de 1°C par rapport aux sites avoisinants (David, 2006).
- l'oxygénation de la colonne d'eau : elle peut être modifiée par des rejets urbains (e.g. rejets des stations d'épuration) ou les fluctuations des conditions climatiques. Au niveau de Bordeaux, le temps de résidence des masses d'eau est plus long en période estivale,

pouvant atteindre 14 à 23 jours (Castaing and Allen, 1981) et recevant durant cette période des apports réguliers de MO par les effluents urbains. Les processus de dégradation de la MO sont alors très importants dans cette ZTM (Etcheber et al., 2007; Goosen et al., 1999), provoquant des périodes d'hypoxie, avec un taux de saturation en dioxygène pouvant être inférieur à 20% en surface (Etcheber et al., 2009). Cette modification saisonnière du gradient redox vertical dans la colonne d'eau impacte la concentration et la spéciation des métaux dans l'estuaire (Michel et al., 2000).

Le bassin versant de l'estuaire de la Gironde est faiblement industrialisé et urbanisé en comparaison avec d'autres estuaires français (Abril et al., 2002). Son principal affluent, le continuum fluvial Lot-Garonne, est connu pour subir une forte pollution polymétallique. Celle-ci est principalement due aux activités de traitements métallurgiques ayant eu lieu sur le site de Decazeville (Aveyron) dans le bassin versant du Riou-Mort (Fig. 1.2). Les contaminants métalliques (principalement Cu, Cd, Zn, Pb, Hg, Ba) issus du lessivage des terrils par les pluies (Jouanneau et al., 1990), étaient majoritairement transportés par le Riou-Mort puis par le Lot pour finir par atteindre la Gironde (Audry et al., 2004b b; Blanc et al., 1999; Jouanneau et al., 1993; Lapaquellerie et al., 1995; Roux and Simonet, 1987; Schäfer et al., 2006). De plus, le Lot compte de nombreux barrages, qui ont piégé des métaux issus du bassin versant de Decazeville dans les sédiments, et qui constituent ainsi un stock important d'ETM potentiellement remobilisables lors des phénomènes de crue, d'ouverture de barrages (Coynel et al., 2009). Les stocks sédimentaires dans l'estuaire sont également partiellement remobilisés lors du dragage de l'estuaire pour l'entretien des chenaux de navigation (e.g. Audry et al., 2007; Robert et al., 2004). Grâce aux efforts entrepris par les autorités territoriales et l'usine responsable de cette pollution, une nette diminution des flux de métaux dus à ces rejets directs a été observée par Audry et al. (2004c), résultant en une baisse des concentrations en Cd dans les huîtres sauvages de l'embouchure de l'estuaire de la Gironde (RNO/ROCCH ; Lanceleur et al., 2011b, cf. p. 28). Cependant, Lanceleur et al. (2011b) ont montré une récente tendance à la hausse des concentrations en Ag mesurées dans les huîtres de l'embouchure de l'estuaire de la Gironde, témoignant de la contribution de sources émergentes. En outre, certaines sources additionnelles dues à des gîtes métallifères et d'anciens sites d'extraction et de traitements miniers situés dans les Pyrénées et le Massif Central ont été identifiées (Masson et al., 2006; Schafer and Blanc, 2002).

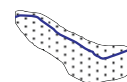


Figure 1.2 : Bassin de Decazeville, source de pollution polymétallique de l'estuaire de la Gironde (Lanceleur, 2011).

1.2.2. Réactivité et spéciation

1.2.2.1. Définitions et généralités

En chimie environnementale, la spéciation d'un élément trace métallique (ETM) peut être définie par son état d'oxydation, sa forme moléculaire et sa phase porteuse (Amiard et al., 2011 ; Dabrin, 2009). Cette dernière comprend la phase dissoute ou la phase particulaire, les échanges entre ces deux phases définissant en grande partie la réactivité de l'ETM. On appelle « fraction labile » la fraction de l'élément qui est capable d'être mobilisée pour passer d'une phase porteuse à l'autre, la « fraction résiduelle » étant la fraction de l'élément qui n'est pas mobilisable.

La limite physique entre les deux phases porteuses a été définie par convention telle que phase dissoute $< 0,45\mu\text{m}$ $<$ phase particulaire (Buffle and Leppard, 1995), la séparation entre les deux s'effectuant généralement par filtration. Cette séparation est cependant arbitraire et ne tient pas compte des particules fines organiques ou inorganiques (colloïdes) pourtant rencontrées dans les milieux estuariens comme décrit dans la figure 1.3.

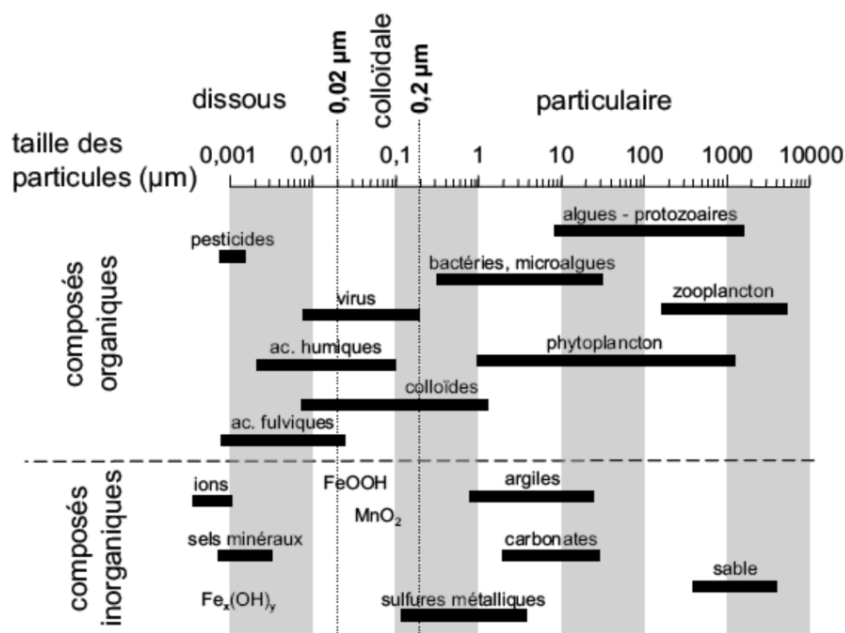


Figure 1.3 : Distribution des différents types de particules présentes dans le milieu aquatique en fonction de leur taille (µm) (d'après Buffle and Van Leeuwen, 1992).

La réactivité d'un ETM dans le milieu aquatique est influencée par de nombreux paramètres tels que la température (qui peut avoir une action sur les réactions biologiques, e.g. l'activité microbienne), la turbidité et le débit, la salinité, le pH, le potentiel redox du milieu, ainsi que l'affinité de l'élément pour la matière organique. Ces paramètres peuvent conduire à quatre types de réactions (Olsen et al., 1982) :

- réactions de sorption : adsorption ou absorption / désorption
- floculation (agrégation de petites particules entre elles) / défloculation
- processus biologiques : la production primaire estuarienne induisant des phénomènes de « soustraction » (e.g. matériel consommé par la production primaire), ou d' « addition » lors de la dégradation de matière organique
- précipitation / dissolution

Ces processus d'échanges sont les moteurs de la réactivité puisqu'ils conditionnent le passage d'une phase à l'autre. La réactivité estuarienne peut être illustrée à l'aide de diagrammes de mélanges (Fig. 1.4) décrivant le comportement des ETM dits conservatifs qui correspond à un mélange physique de masses d'eaux marines et continentales suivant une droite de dilution théorique (Boyle et al., 1974). Les écarts à cette droite représentent les phénomènes d'addition (passage de la phase particulaire à la phase dissoute) et de soustraction (passage de la phase

dissoute à la phase particulaire) pour un ETM donné se produisant dans l'estuaire en fonction de sa concentration dans la phase dissoute et de la salinité de l'eau.

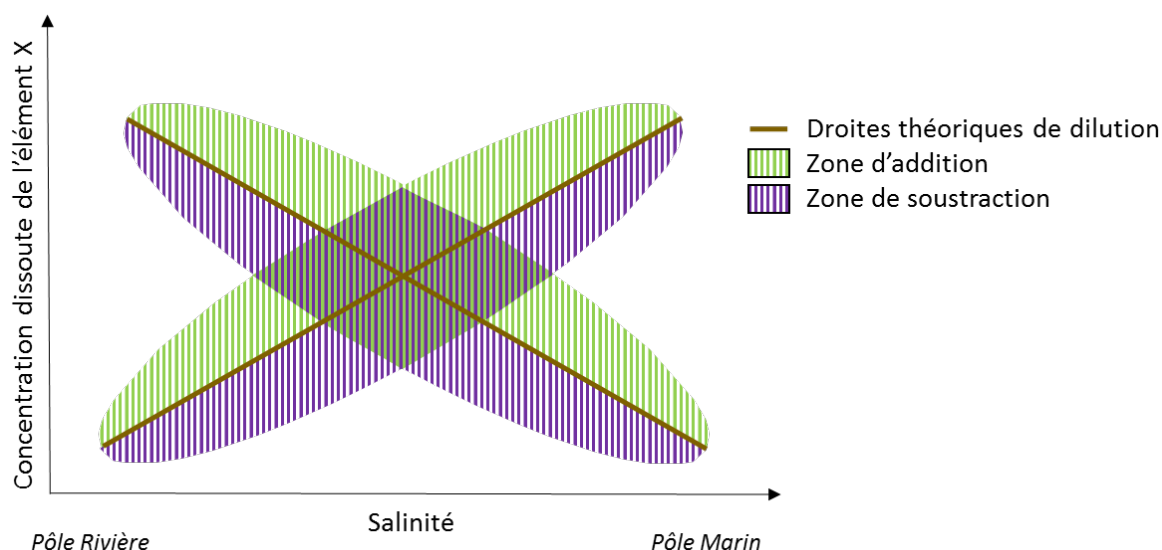


Figure 1.4 : Diagramme de mélange représentant deux droites de dilution théorique en fonction de la concentration de l'élément X dans le pôle fluvial et dans le pôle marin.

1.2.2.2. Comportement de l'argent

Dans le milieu naturel, la spéciation de Ag est contrôlée par son interaction avec la matière organique ou inorganique à travers des réactions de sorption, complexation et précipitation (cf. 1.2.2.1.). Dans le milieu aquatique, Ag se trouve principalement dans la phase colloïdale (Bell and Kramer, 1999), sachant que la phase particulaire reste 10^5 fois plus concentrée en Ag par rapport à la phase dissoute (Tappin et al., 2010; Wen et al., 1997). L'ion libre Ag^+ peut se complexer avec des anions tels que des chlorures (Cl^-), des sulfures (SH^-), des fluorures (F^-), des hydroxydes (OH^-) et des carbonates (CO_3^{2-}) formant ainsi des complexes inorganiques, mais il peut également se lier à de la MO pour former des complexes organiques.

En rivière, la spéciation de Ag est contrôlée par sa complexation avec i) les sulfates (en milieu oxydé) ou les sulfures (en milieu réduit), ii) la MO (principalement avec des colloïdes organiques qui portent des groupements thiols ; Adams and Kramer, 1998; Bell and Kramer, 1999; Wen et al., 2002), iii) les chlorures (formation de chlorocomplexes, Fig. 1.5).

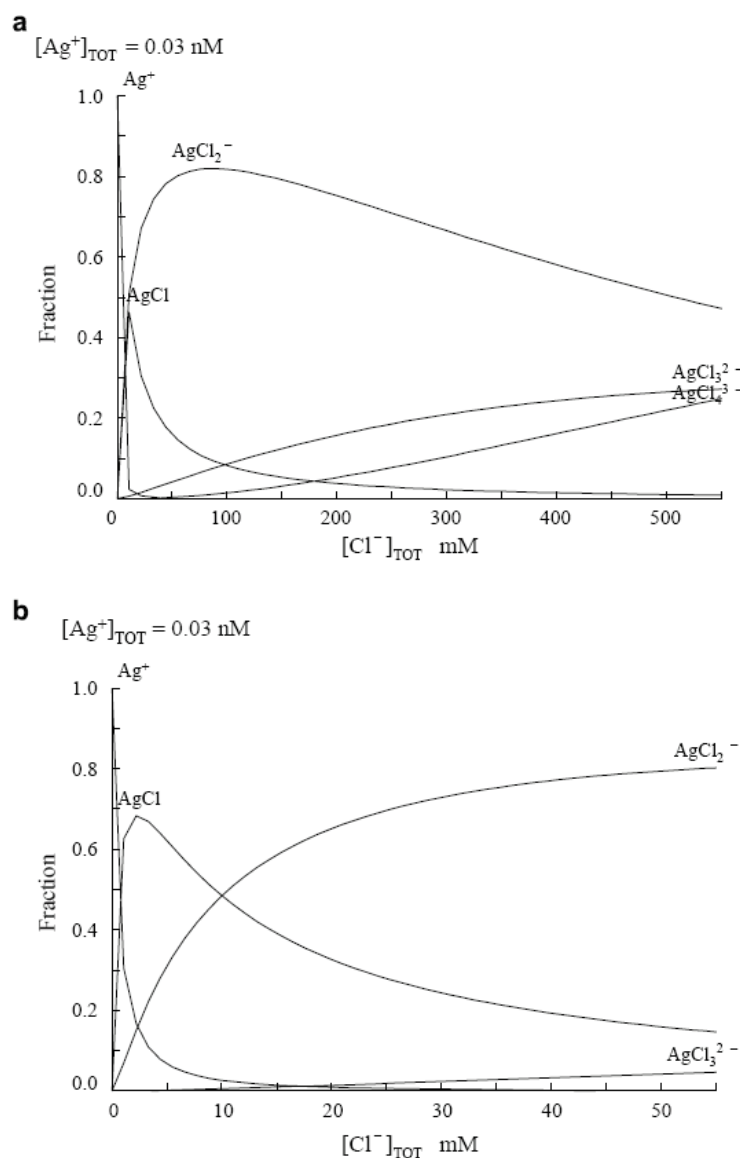


Figure 1.5 : Distribution relative des chlorocomplexes en fonction des concentrations en chlorures dans la gamme (a) 0-0,55 mol/L et (b) 0-0,055 mol/L (Barriada et al., 2007).

En milieu estuarien, la spéciation de Ag est contrôlée par i) les chlorures, à travers la formation de chlorocomplexes qui maintiennent Ag sous forme dissoute (Barriada et al., 2007; Cowan et al., 1985), ii) des processus de désorption après quoi Ag_d peut à nouveau s'adsorber ou être consommé (absorbé) par du phytoplancton (Eisler, 1996), iii) la diminution de sa complexation avec des colloïdes organiques lorsque la salinité augmente (Wen et al., 1997). Lorsqu'il est sous forme particulaire, Ag_p est principalement (à $77 \pm 6\%$) porté par des oxyhydroxides de Fe/Mn et des sulfures (Wen et al., 1997).

En milieu marin ouvert, Ag présente un enrichissement systématique dans les eaux profondes à l'échelle globale (Tab.1.4), avec parfois des anomalies positives de concentration en surface

attribuées par différents auteurs à des upwellings (Ndung'u et al., 2001; Rivera-Duarte et al., 1999; Zhang et al., 2004) ou à des masses d'eaux côtières contaminées par des rejets urbains (Sanudo-Wilhelmy and Flegal, 1992) et/ou des apports atmosphériques (Ranville and Flegal, 2005). Dans le Pacifique Nord-Ouest, les profils verticaux de Ag dans la colonne d'eau décrivent un comportement « nutrient-like » (Zhang et al., 2001) similaire à celui de SiO₂.

Tableau 1.4: Concentration en Ag_d mesurées en surface et en profondeur dans plusieurs masses d'eaux océaniques (Flegal et al., 1995 et Martin et al., 1983).

Localisation	Concentration en surface	Concentration en profondeur
Atlantique Est	0,03 ng.L ⁻¹	1,04 ng.L ⁻¹
Atlantique Nord	0,07 ng.L ⁻¹	0,78 ng.L ⁻¹
Atlantique Equatorial et Sud-Ouest	0,58 ng.L ⁻¹	3,5 ng.L ⁻¹
Pacifique	0,11 ng.L ⁻¹	5,9 ng.L ⁻¹
Mer de Béring	0,29 ng.L ⁻¹	11 ng.L ⁻¹

Au niveau des bassins versants de l'estuaire de la Gironde, les concentrations en Ag_d varient entre <0,5 à 5,7 ng.L⁻¹ et les concentrations en Ag_p varient de 0,13 à 14 mg.kg⁻¹, sans variabilité saisonnière ni pour la phase dissoute ni pour la phase particulaire (Lanceleur et al., 2011a). Ces valeurs sont très inférieures à celles du Riou-Mort qui représente un cas particulier de contamination polymétallique avec des concentrations qui atteignent 1260 ng.L⁻¹ pour Ag_d et 261 mg.kg⁻¹ pour Ag_p. Sur l'ensemble du bassin versant, le transport de Ag est principalement assuré par la phase particulaire qui représente 73-99% de l'argent total (Lanceleur et al., 2013). L'apport de Ag à l'estuaire se fait essentiellement sous forme particulaire, puisque la phase particulaire représente 96% du flux brut (flux entrant) de Ag mesuré à La Réole. Ces apports de Ag_p sont en partie d'origine naturelle (on parle alors de bruit de fond géochimique), avec une contribution anthropique comprise entre 35 et 80% par complémentarité avec la part naturelle, et s'étendant de 24 à 90% dans les différents sous bassins-versants (Lanceleur et al., 2013). Dans l'estuaire de la Gironde, Ag présente un comportement additif qui se traduit par une courbe en cloche reflétant le passage de Ag labile vers la phase dissoute le long du gradient salin (Fig. 1.6).

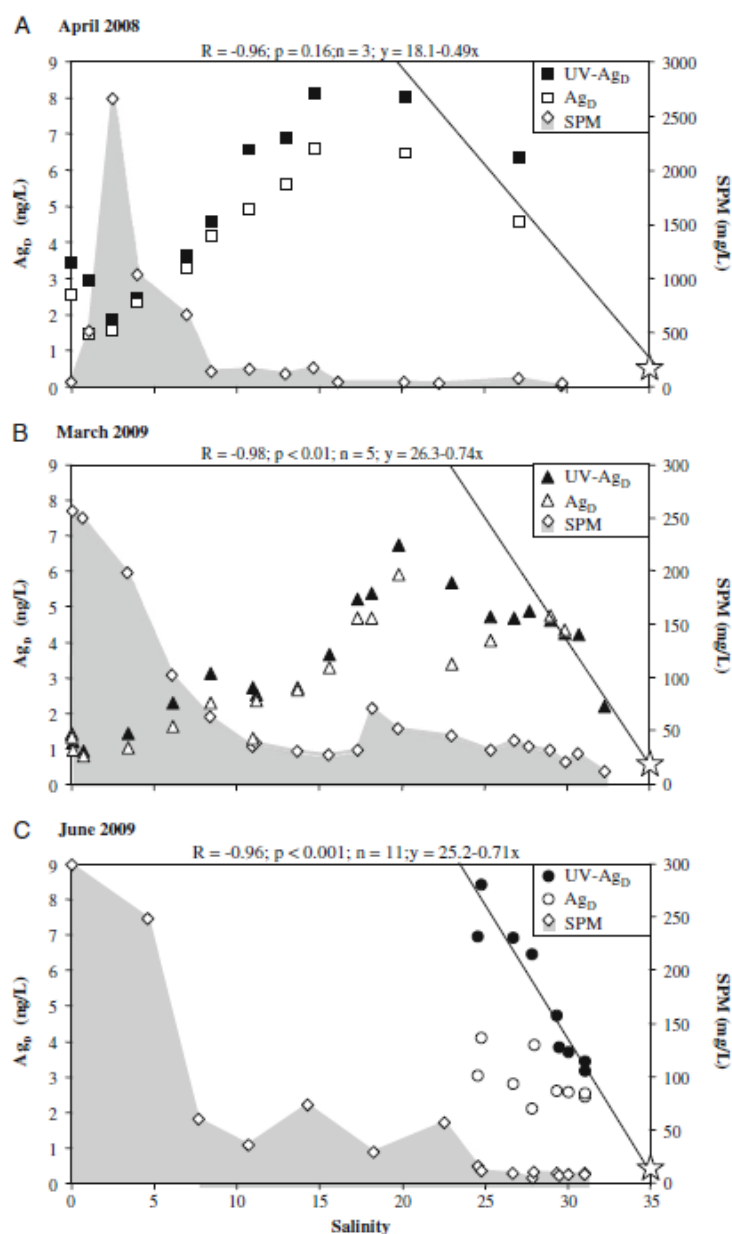


Figure 1.6: Concentrations en Ag (Ag_d et Ag_d-UV) et MES le long du gradient de salinité de l'estuaire de la Gironde, pour les mois d'Avril 2008, Mars 2009 et Juin 2009. La droite noire représente la droite de régression linéaire pour le flux net en Ag_d-UV (Boyle et al., 1974, 1982) avec un coefficient de corrélation (R), la p value pour un intervalle de confiance de 95%, n le nombre de points mesurés, et l'équation de la droite de dilution (Lanceleur et al., 2013).

1.2.2.3. Comportement du cuivre

Le cuivre, qui possède une forte affinité pour la MO, présente un comportement variable en fonction des conditions physico-chimiques rencontrées dans les différents estuaires. Il peut en effet présenter un comportement conservatif – e.g. Mississippi et Amazone (Boyle et al., 1982; Shiller and Boyle, 1991), Rhône (Elbaz-Poulichet et al., 1996), et Conwy (Zhou et al., 2003)

lorsque les complexes dissous formés entre Cu et des ligands organiques restent stables dans le continuum fluvio-estuarien (Apte et al., 1990; Coale and Bruland, 1988; Sedlak et al., 1997). Il peut également présenter un comportement soustractif lié à l'adsorption de Cu dissous sur les particules comme c'est le cas dans le Guadalquivir (García-Luque et al., 2003), ou encore un comportement additif, comme dans plusieurs estuaires au niveau mondial (Achterberg et al., 2003; Chiffoleau et al., 1994; Cobelo-García et al., 2004; Comber et al., 1995; Waeles et al., 2004) dont celui de la Gironde (Audry et al., 2006; Kraepiel et al., 1997; Masson et al., 2011). Ce comportement additif se caractérise par une zone d'addition située en amont de l'estuaire dans la fraction de faible salinité et de forte turbidité qui, selon les auteurs, serait attribuable à trois causes possibles : une désorption de Cu, une dégradation de la MO, ou encore la remobilisation de sédiments de fond pendant la marée libérant des eaux interstitielles chargées en Cu.

Dans l'estuaire de la Gironde, les concentrations en Cu_d dans le pôle continental varient de 600 à 1100 $ng.l^{-1}$, alors que pour le pôle marin elle a été estimée à 350 $ng.l^{-1}$ (Fig. 1.7; Dabrin, 2009). Cette variabilité peut être expliquée par plusieurs facteurs :

- Les variations de concentration en Cu dissous, attribuées à la dégradation de la MO dans la ZTM en amont de l'estuaire (Masson et al., 2011)
- La redistribution de Cu labile entre les phases dissoute et particulaire (complexée) lors de l'augmentation de la salinité
- L'effet de sources additionnelles en Cu_d (agriculture, rejets urbains, sédiments)

Le comportement de Cu dans l'estuaire de la Gironde est essentiellement additif (Dabrin, 2009; Kraepiel et al., 1997; Masson et al., 2011) (Fig. 1.7). En raison de la forte affinité de Cu pour la MO, et de sa faible affinité pour les chlorures et les sulfates, son comportement additif dans les zones de faible turbidité peut être principalement attribué à la dégradation de la MO. En effet, dans la ZMT, Cu se trouve majoritairement sous forme complexée avec de la MO, ce qui coïnciderait en suivant avec un relargage de Cu labile dans la phase dissoute entraînant une addition dans le pôle marin à plus faible turbidité.

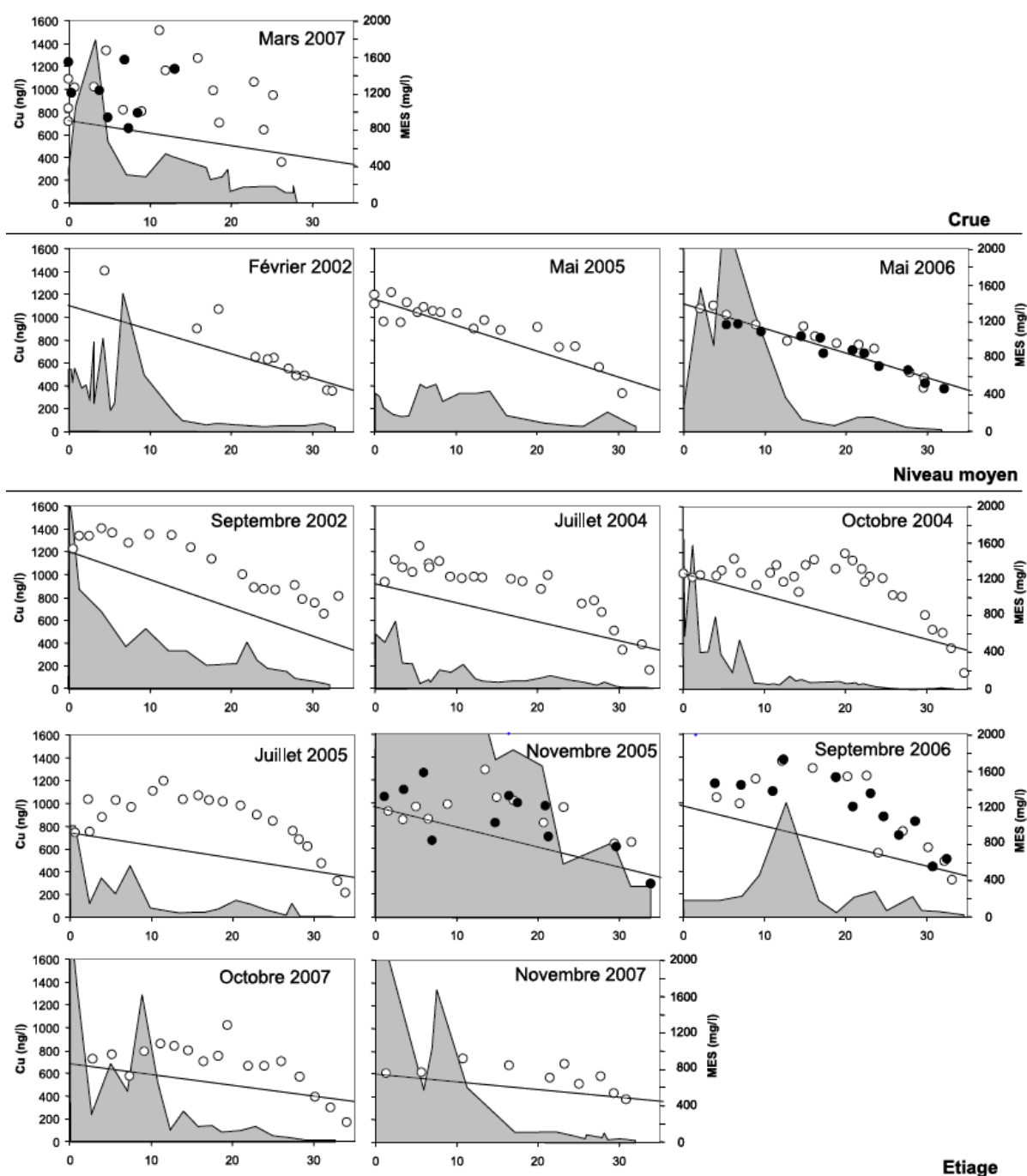


Figure 1.7: Distribution des concentrations dissoutes en Cu labile et des concentrations en MES en fonction du gradient de salinité pour les conditions d'étiage, de débits moyens et de crues. Les cercles blancs correspondent aux eaux de surface, les cercles noirs aux eaux de fond et les surfaces grises à la distribution des MES en surface, et les droites noires aux droites théoriques de dilution (Dabrin, 2009).

1.3. L'huître japonaise *Crassostrea gigas* : enjeux socio-économique local et modèle d'étude idéal

1.3.1. Généralités

L'huître japonaise *Crassostrea gigas* (Thunberg, 1973), originaire du Nord-Ouest du Pacifique, est un mollusque bivalve filtreur suspensivore importé en France depuis le Canada et le Japon en 1966 à des fins commerciales, afin de pallier au déclin de l'espèce indigène (l'huître portugaise, *Crassostrea angulata*) du à sa surexploitation et aux épisodes épidémiques (épizooties). Suite à la constitution de bancs sauvages d'organismes issus initialement d'installations ostréicoles, elle s'est vu attribuer le statut d'espèce invasive (GISD, 2016). L'espèce *Crassostrea gigas* possède une faculté d'adaptation à des conditions environnementales (rochers et débris dans les zones intertidales < 40m, fonds sablo-vaseux ou vaseux, salinité de 10 à 35) et climatiques (supporte une gamme de températures de 1,8°C à 35°C) très variées (FAO, 2016). Cette flexibilité ajoutée à sa croissance rapide en fait l'espèce la plus utilisée en aquaculture. En 2014, la production mondiale de l'huître japonaise atteignait 625 925 t (Fig. 1.8). En France, la production d'huîtres s'élevait à ~115 000 t en 2003 (FAO, 2016).

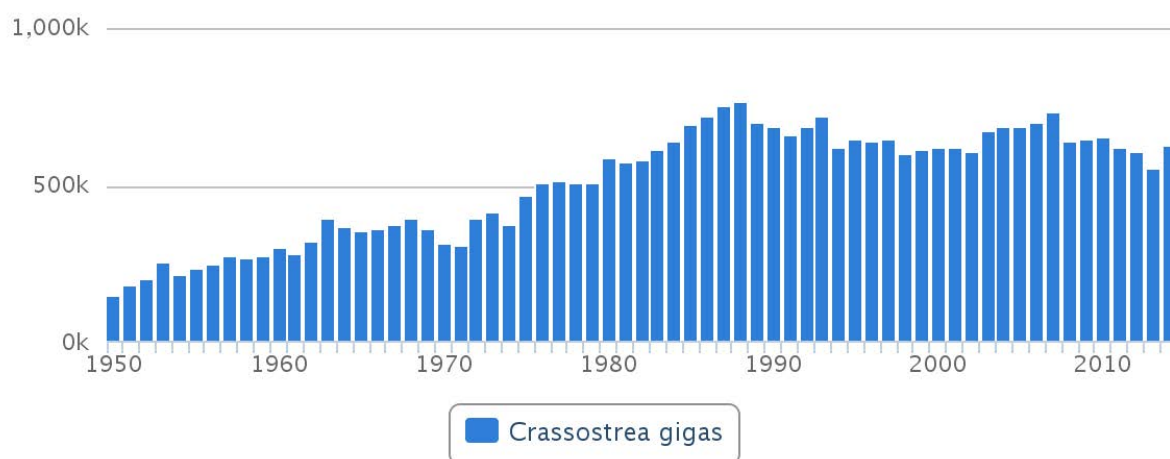


Figure 1.8: Production mondiale d'huîtres *Crassostrea gigas* en Ktonnes entre 1950 et 2014 (FAO, 2016).

Les fonctions nutritionnelle et respiratoire sont assurées par les branchies lamelleuses qui pompent l'eau avec une intensité variable. Celle-ci est fonction de plusieurs paramètres : le temps d'immersion (Bougrier et al., 1998; Soletchnik et al., 1996a), l'âge de l'huître et la

période de ponte (Barille et al., 1997; Bougrier et al., 1998), la charge en seston (Barillé et al., 1993, 1997), et la taille des particules (Barillé et al., 1993). La capacité de filtration de l'huître, optimale à une température de 20°C, varie de 3,5 à 4,8 l/h/g ps (Deslous-Paoli et al., 1987) bien qu'elle diminue dans le cas d'une charge sestonique importante (Deslous-Paoli et al., 1987; Soletchnik et al., 1991). Les huîtres de l'espèce *Crassostrea gigas* peuvent retenir des particules dont la taille est comprise entre 5 et 200 µm, ce qui les expose aux particules en suspension dans la colonne d'eau estuarienne. Elles se nourrissent de phytoplancton et de matière organique dissoute. Les particules sont acheminées vers la bouche et introduites dans le système digestif à l'aide de cils vibratiles. Les palpes labiaux vont trier le matériel particulaire dont une partie est éliminée sous forme de pseudofecès, et la matière organique est quant à elle ingérée (Soletchnik et al., 1996b). Le matériel ingéré sera ensuite digéré au niveau de la glande digestive, et la part non assimilée sera rejetée par l'organisme sous forme de fecès. Les premiers stades de la gamétogénèse apparaissent au printemps (mars-avril ; Goulletquer, 1995) puis la saison de reproduction (par fécondation externe) arrive au début de l'été avec une durée de 4 mois environ, de juin à septembre (His, 1975).

1.3.2. Outil de biosurveillance et enjeu régional

Les huîtres sont utilisées dans le suivi de la pression environnementale pour les polluants organiques et inorganiques (Dagnino et al., 2007), pour lesquels elles constituent un indicateur quantitatif (RNO, 2006). La large répartition mondiale de l'espèce *Crassostrea gigas*, son mode de vie sédentaire, sa tolérance à des conditions environnementales très variées ainsi que sa forte capacité de bioaccumulation de polluants, en font un modèle d'étude idéal pour le suivi de la qualité des eaux côtières (Baudrimont et al., 2005; Daskalakis, 1996; Geffard et al., 2007; Reinfelder et al., 1997). Elle est utilisée à échelle mondiale comme espèce sentinelle dans les programmes de surveillance de la qualité des milieux (e.g. Rainbow, 1995) tels que les programmes NOAA (National Oceanic and Atmospheric Administration), NS&T (National Status and Trends) américains, le Réseau National d'Observation RNO/ROCCH français, et le World Mussel Watch regroupant l'ensemble des données existantes à l'échelle internationale. Dans les années 1980, des analyses chimiques d'huîtres prélevées à l'embouchure de l'Estuaire de la Gironde dans le cadre du programme de biosurveillance RNO (Réseau National d'Observation, IFREMER) ont permis de mettre en évidence la pollution polymétallique de l'estuaire à travers des concentrations en Cd anormalement élevées (Boutier, 1981; Boutier et al., 1989; Claisse, 1989) par rapport aux valeurs observées dans les autres estuaires français

(Chiffolleau et al., 2005). Les concentrations mesurées à l'époque étaient supérieures à 100 $\mu\text{g/g}$ de poids sec (ps) et dépassaient donc largement la norme de consommation des bivalves marins (10 $\mu\text{g/g}$ ps jusqu'en 2001, puis 5 $\mu\text{g/g}$ ps jusqu'à ce jour; CE N° 466/2001). Cette découverte a eu pour conséquence le classement de l'estuaire en « zone D » par arrêté préfectoral et, *de facto* l'interdiction de la production, de la vente et de la consommation d'huîtres girondines. Après la forte baisse des émissions de Cd depuis les années 1980 (Audry et al., 2004c) ainsi que la mise en place de travaux de remédiation, les concentrations dans les huîtres ont fortement diminué dans les années 2000 d'un facteur 5 (Fig. 1.9; Lanceleur et al., 2011b) menant à la levée partielle de l'interdiction par un reclassement de l'estuaire en « zone B » par la préfecture du Gironde en juillet 2014. Contrairement à la diminution de la contamination des huîtres en Cd, les mesures effectuées dans ces mêmes organismes ont permis de révéler une contamination en Ag croissante depuis les années 1990 (Lanceleur et al., 2011b), suggérant l'existence de sources additionnelles inhérentes au bassin versant autour de l'estuaire (Fig. 1.9).

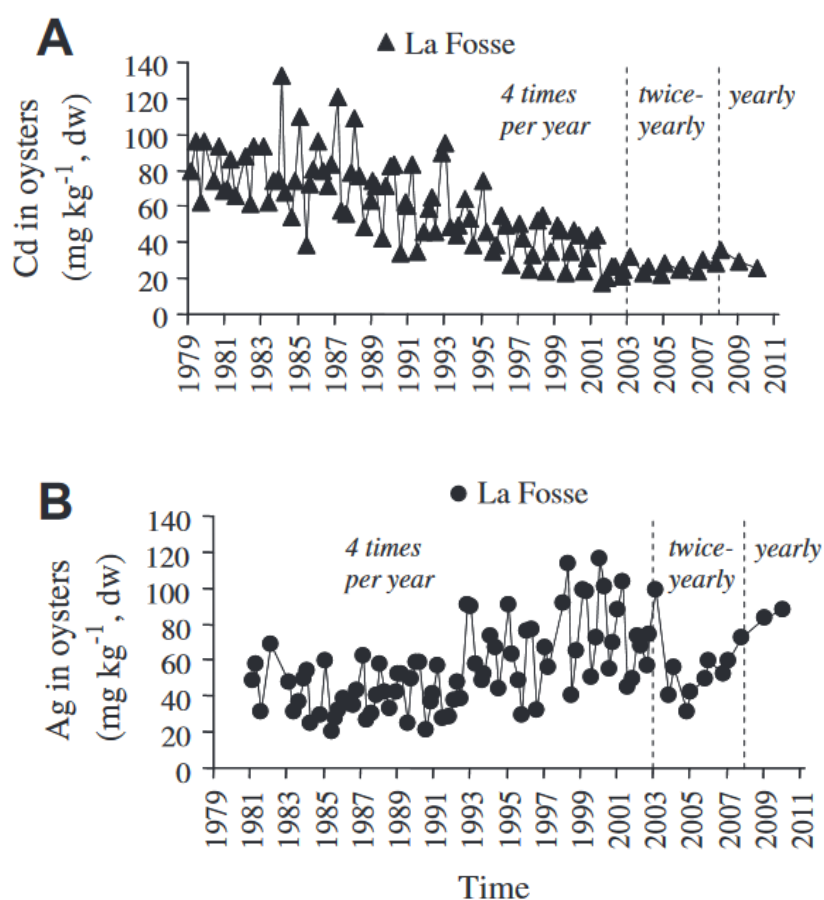


Figure 1.9: Concentration en Cd (A) et Ag (B) mesurées dans les huîtres de l'estuaire de la Gironde entre 1979 et 2010 au site de La Fosse (tiré de Lanceleur et al., 2011b).

Les calculs des coefficients de bioconcentration ont également permis de montrer que le transfert de Ag de l'eau vers les huîtres était 40 fois supérieure à celle de Cd, soulignant ainsi l'importance des concentration en Ag_d sur les huîtres sauvages de l'estuaire. Cette observation venait s'ajouter aux résultats précédemment publiés par Chiffoleau et al. (2005), montrant que les huîtres de l'estuaire de la Gironde présentaient les valeurs de loin les plus élevées en Ag (Fig. 1.10) et en Cd (Boutier et al., 1989) par rapport aux autres estuaires français.

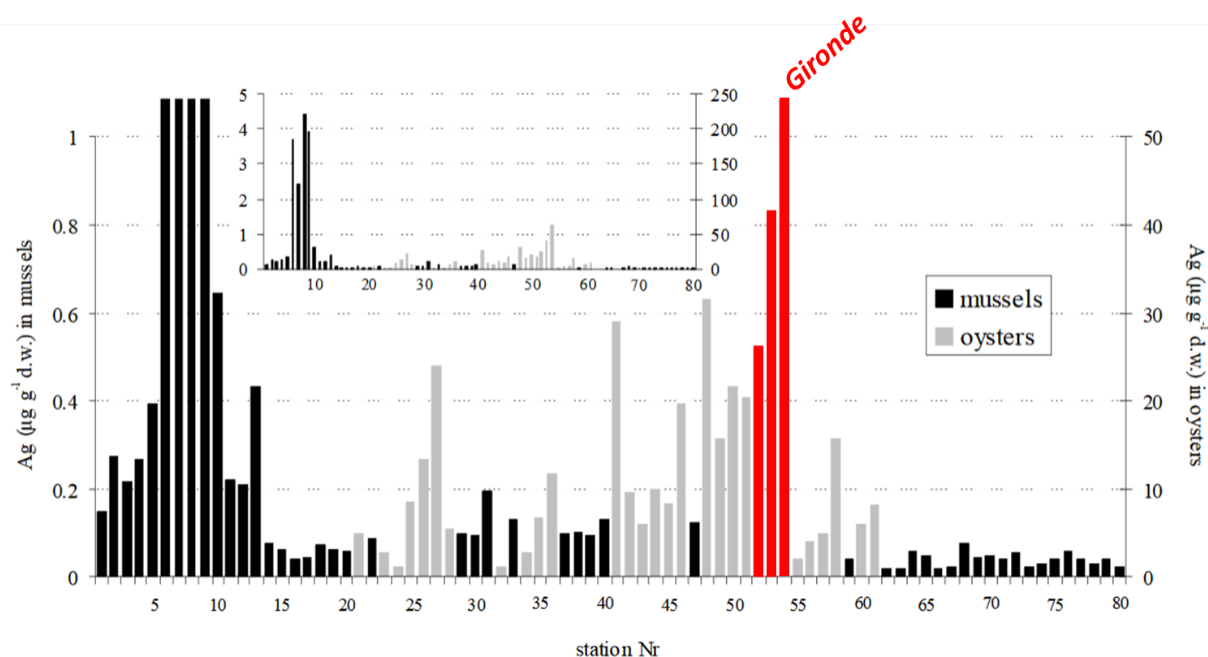


Figure 1.10: Concentrations en Ag ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ ps) mesurées dans les huîtres et les moules sauvages le long de la côte atlantique française (modifié d'après Chiffoleau et al., 2005).

A travers son impact sur l'activité conchylicole locale, l'intérêt scientifique et environnemental suscité par l'huître *Crassostrea gigas* constitue un enjeu socio-économique non négligeable pour la région, pouvant également affecter épisodiquement la Baie de Marennes-Oléron, site principal de production au niveau Européen (Dabrin, 2009; Strady, 2010). Le travail de biosurveillance du RNO (devenu ROCCH en 2008) se poursuit actuellement sur l'ensemble de la côte atlantique française, permettant d'alimenter sa banque de données publique et ainsi d'obtenir une visibilité sur les variations de concentrations dans les huîtres sauvages sur le long terme (cf. 2.2).

1.4. Biodisponibilité, mécanismes de contamination et biomarqueurs

1.4.1. Biodisponibilité

La biodisponibilité d'un élément (ou contaminant) dans un environnement est définie par sa forme absorbable et assimilable par les organismes quel que soit le compartiment concerné (eau, sédiment, matière organique...) (Amiard et Amiard-Triquet, 2008). Elle peut être déterminée et quantifiée par l'utilisation de trois approches méthodologiques complémentaires (Amiard-Triquet and Dauvin, 2009) :

- Le suivi chimique des concentrations et de la distribution de l'élément dans les différents compartiments environnementaux (e.g. eau, sédiments, sol, atmosphère) dans lesquels on prévoit sa présence (Ng et al., 2005)
- La mesure de l'accumulation de ce contaminant dans le biote préalablement exposé dans son milieu naturel (e.g. les programmes de biosurveillance) ou bien dans un laboratoire reproduisant les conditions environnementales en termes de concentrations.
- La quantification des réponses biologiques (e.g. histologiques, biochimiques,... ; c.f. 1.4.2 Contamination et biomarqueurs).

La spéciation des métaux joue un rôle primordial dans la manière d'appréhender leur biodisponibilité dans l'environnement et leur(s) effet(s) potentiels sur les organismes qui y vivent. En solution, phase la plus biodisponible pour les bivalves filtreurs comme l'huître, les métaux peuvent apparaître sous forme (i) d'ion métallique libre (e.g. Ag^+ , Cu^{2+}), (ii) liés à des complexes inorganiques (e.g. Cl^- , HCO_3^- ,...), ou encore (iii) liés à des complexes organiques (e.g. acides aminés, acides humiques, ...). Cependant la seule forme chimique d'un métal ne suffit pas à définir entièrement sa biodisponibilité dans un compartiment environnemental. En effet, même si un métal libéré dans l'environnement est susceptible de traverser les différentes membranes biologiques d'un organisme, celles-ci peuvent développer des stratégies pour servir de barrière à la contamination. Ainsi, certaines de ces stratégies peuvent consister à modifier la spéciation de l'élément et donc sa biodisponibilité par la sécrétion de modificateurs chimiques dans le milieu externe ou en provoquant sa précipitation à la surface cellulaire sous forme de microcristaux de sulfures métalliques (Amiard and Amiard-Triquet, 2008). Il existe également des barrières externes étanches (e.g. carapaces, test, téguments, écailles,...) qui recouvrent l'épithélium et ainsi affectent la biodisponibilité d'un élément en limitant ses chances d'entrer dans l'organisme (Mason and Jenkins, 1995). Certains organismes sont

également capables de sécréter des substances (e.g. mucopolysaccharides) ou de générer des changements de charges et de groupements réactifs susceptibles de modifier la biodisponibilité en interférant avec l'absorption du contaminant (Amiard and Amiard-Triquet, 2008).

1.4.2. Contamination et biomarqueurs

L'accumulation d'un métal par un organisme dépend non seulement de sa biodisponibilité, mais également d'autres facteurs environnementaux (e.g. saison, turbidité, conditions physico-chimiques) et inhérents à l'organisme lui-même (e.g. taille, âge, sex, maturité sexuelle, santé, physiologie). L'intensité de l'accumulation est également interspécifique. L'importance de ces facteurs dans la quantification de la bioaccumulation de contaminants ainsi que dans l'interprétation des données a donné lieu à l'élaboration de conventions et de publications dans l'élaboration des programmes de biosurveillance (e.g. NAS, 1980; OSPAR, 1992). Les programmes de biosurveillance (ou *biomonitoring* en Anglais) ont connu un réel essor dans les années 1980. Leur principe est basé sur l'observation et la quantification des réponses biologiques des organismes sentinelles aux polluants.

1.4.2.1. Mécanismes de contamination

Les ETM sont répartis suivant 3 catégories : les éléments essentiels (e.g. Na^+ , K^+ , Ca^{2+} , Mg^{2+} , ...), les essentiels toxiques (e.g. Cu^{2+} , Ni^{2+} , ...), et les toxiques (e.g. Ag^+ , Cd^{2+} , Pt^{4+} , ...). Les effets des métaux diffèrent suivant leur catégorie, induisant une réponse positive ou négative de l'organisme en fonction du niveau d'exposition (Fig. 1.11).

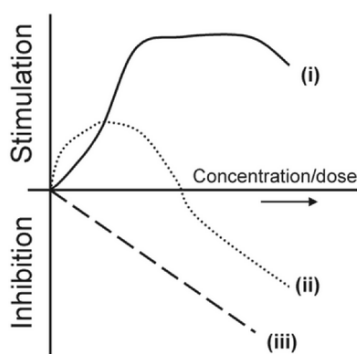
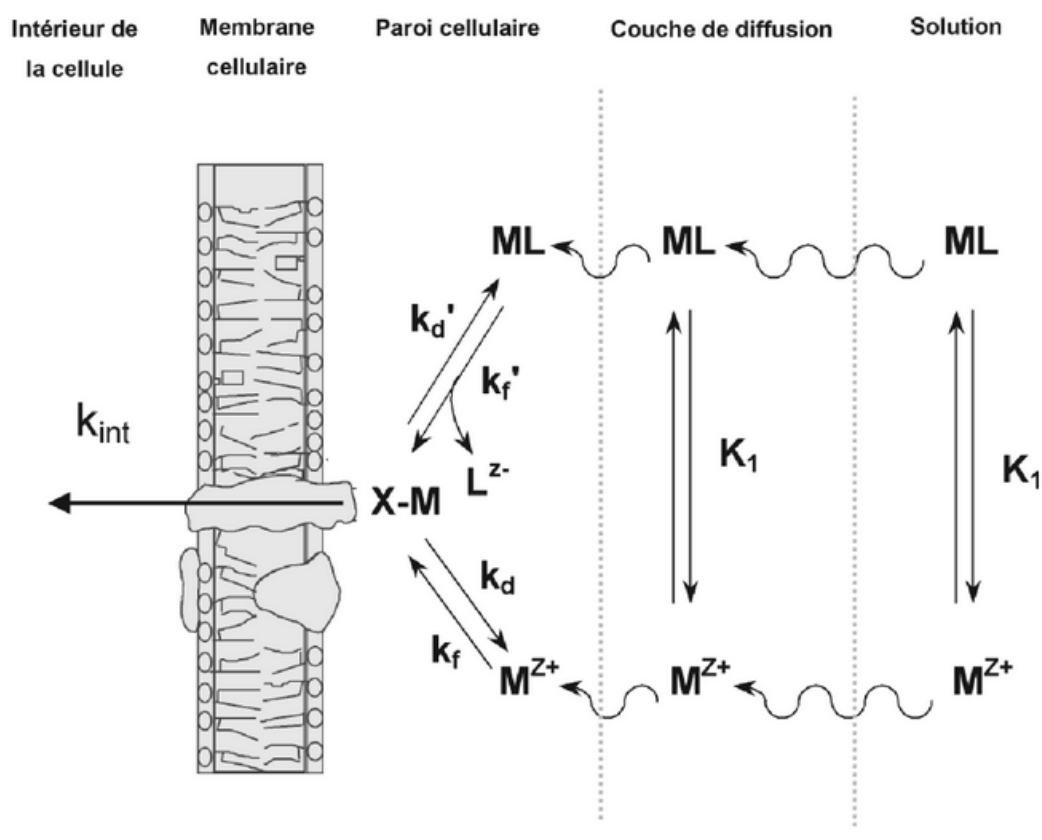


Figure 1.11: Schéma général des courbes dose-réponse typiquement observées chez un organisme vivant pour i) un macro-élément nutritif (e.g. Ca), ii) un micro-élément nutritif (e.g. Cu), et iii) un élément toxique non essentiel (e.g. Pb, Ag) (modifié d'après Wright and Welbourn, 2002).

Les cations métalliques (M^{Z+}) ainsi que leurs complexes formés avec des ligands (M-L) sont généralement pris en charge par transport facilité pour traverser les membranes biologiques. Campbell et al. (2002) ont décrit dans leur modèle conceptuel (Fig. 1.12) les quatre étapes impliquées dans l'internalisation d'un métal chez les organismes aquatiques: i) sa diffusion ou advection vers la surface biologique, ii) sa diffusion à travers la couche externe protectrice de la membrane, iii) sa complexation à des sites physiologiques, inertes (dans la couche protectrice externe de la membrane) ou actifs (sur la face apicale de la membrane cellulaire), puis iv) l'internalisation (*uptake*) de ce métal.



M^{Z+} = ion métallique libre ; ML = complexe métallique en solution ; K_1 = constante d'équilibre pour la formation de l'espèce ML ; M-X-membrane = complexe métallique de surface ; k_f , k_f' = constantes de vitesse pour la formation du complexe de surface ; k_d , k_d' = constantes de vitesse pour la dissociation du complexe de surface ; k_{int} = constante de vitesse pour l'internalisation du métal. Les charges sur les complexes ne sont pas indiquées.

Figure 1.12: Modèle conceptuel des interactions entre les métaux et les organismes aquatiques (Campbell and Couillard, 2004)

La réponse biologique globale de l'organisme affecté comprend non seulement la bioaccumulation du métal par l'organisme, mais également l'ensemble des effets secondaires

du métal sur les mécanismes essentiels à la survie de l'organisme, tels que la photosynthèse, la respiration, la mobilité, la croissance et la reproduction (Campbell and Couillard, 2004).

Certains modèles visent à prédire cette réponse biologique en fonction de la spéciation du métal dans un milieu d'exposition donné. Le modèle de l'ion libre (Morel, 1983) puis celui du ligand biotique (Di Toro et al., 2001; Paquin et al., 2002; Santore et al., 2001) ont pour but de prédire l'interaction d'un métal dissous avec un organisme aquatique et la manière dont il pourrait affecter le métabolisme. Cette interaction entre le métal (sous forme de cation libre M^{z+} ou de complexe ML) et la surface cellulaire, est représentée comme une réaction menant à la formation d'un complexe *M-X-cellule* (où *X-cellule* est un ligand cellulaire de la surface membranaire). D'après ces modèles, la réponse biologique induite par l'internalisation d'un métal est proportionnelle à la concentration de l'espèce *M-X-cellule* (Campbell and Couillard, 2004).

Lorsque les métaux se trouvent sous forme dissoute, on parle de contamination par voie directe. Les métaux sont alors pris en charge par la membrane épithéliale située au niveau des branchies. Cette membrane constitue la principale barrière transmembranaire entre les organismes aquatiques et leur milieu. L'internalisation des métaux dissous en milieu aquatique se fait selon 3 mécanismes principaux (Fig. 1.13; Campbell and Couillard, 2004):

- le transport facilité du cation M^{z+} grâce à des transporteurs transmembranaires protéiques ou des canaux transmembranaires (i) ;
- le transport facilité d'un complexe métallique anionique (métal + anion) (ii);
- le transport passif par simple diffusion d'un complexe lipophile M-L (iii).

Le mécanisme (i) est prédominant, aussi bien pour les métaux essentiels (e.g. Cu) que pour les métaux toxiques (e.g. Ag, Pb, Cd) qui réussissent à passer en « trompant » les systèmes de transport cationiques situés à la surface de la membrane épithéliale.

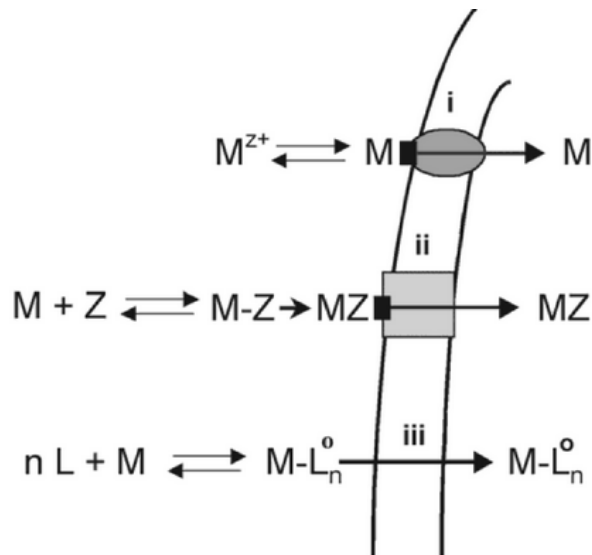


Figure 1.13: Représentation schématique du i) transport facilité de cations, du ii) transport accidentel de cations liés à des anions, et de la iii) diffusion passive de complexes métalliques lipophiles (Campbell and Couillard, 2004).

Lorsque les métaux sont associés aux particules, on parle de contamination par voie trophique. Leur internalisation comporte alors plusieurs étapes (Campbell and Couillard, 2004):

- l'ingestion des particules ;
- la solubilisation du métal, qui a lieu le plus souvent dans le tractus intestinal de l'animal consommateur. Parfois, l'assimilation de la particule et donc du métal se fait par un processus d'invagination de la membrane (e.g. phagocytose) conduisant à la formation d'une vacuole. Dans les deux cas, la solubilisation du métal est souvent facilitée par les nouvelles conditions de pH et d'oxydoréduction par rapport à celles qui étaient présentes dans le milieu ambiant ;
- le franchissement de la membrane digestive ou vacuolaire. Si la nature de ces membranes peut différer de celles qui sont exposées dans le cas des métaux dissous (e.g. branchies, téguments et membranes épithéliales), leur franchissement impliquera les trois même processus décrits ci-dessus.

1.4.2.2. Stockage des métaux

Chez les organismes aquatiques, après avoir franchi la membrane des cellules épithéliales des branchies, les métaux sont pris en charge suivant deux mécanismes possibles :

- traverser la cellule pour atteindre le milieu circulant (sang, hémolymphe) et se fixer ensuite aux protéines plasmatiques leur permettant d'être transportés jusqu'aux différents organes (séquestration tissulaire) (Martin and Rainbow, 1998a, 1998b)
- rester stockés à l'intérieur de la cellule (séquestration intracellulaire), ce type de séquestration étant dépendant du niveau et de la durée d'exposition, du type de cellule concernée, ainsi que de l'espèce et du cycle de vie de l'organisme lui-même (Wallace and Luoma, 2003; Wallace et al., 2003). Cette séquestration intracellulaire des métaux permet de limiter la dispersion du métal à l'intérieur de la cellule grâce à la formation de granules métalliques et concrétions insolubles (Marie, 2005).

1.4.2.3. Conséquences des contaminations : biomarqueurs

Les organismes vivants soumis à des stress tels qu'une exposition prolongée à un contaminant métallique peuvent développer des stratégies adaptatives (de défense et/ou de tolérance) suivant les différents types et les degrés d'exposition. Ces stratégies se traduisent par un contrôle de l'accumulation des métaux, par une diminution de leur absorption, une augmentation de leur excrétion (Mason and Jenkins, 1995). Ces effets biologiques des polluants sur les organismes, aussi appelés biomarqueurs sont assimilables à des indicateurs de la pression environnementale (Roméo and Giambérini, 2008).

De Lafontaine et al., (2000) ont proposé la catégorisation des biomarqueurs en biomarqueurs de défense et biomarqueurs de dommages.

Les biomarqueurs de défense regroupent l'ensemble des processus biochimiques qui permettent aux organismes de faire face aux stress chimiques auxquels ils sont exposés dans leur environnement. Parmi ce type de biomarqueurs figurent l'induction de métalloprotéines (e.g. métallothionéines - MT), d'enzymes de biotransformation, de protéines de stress (e.g. *Heat-Shock Proteins* - HSP), ou encore de défenses antioxydantes (Amiard and Amiard-Triquet, 2008). Si ces biomarqueurs de défense visent à avoir un effet positif sur les organismes leur permettant de lutter et de survivre dans un environnement pollué, cette capacité de résistance peut cependant représenter un coût énergétique appelé « coût de la tolérance » (Holloway et al., 1990) induisant une baisse de l'énergie disponible pour les autres besoins de l'organisme tels que le métabolisme de base, sa croissance et sa reproduction. Pour de nombreux biomarqueurs de défense la réponse dose-effet dévie de la linéarité lorsque les degrés de contamination deviennent trop importants (e.g. MT, HSP ; Baudrimont et al., 1999; Pyza et al., 1997).

Les biomarqueurs de dommages traduisent une atteinte biologique qui peut être plus ou moins importante, pouvant conduire à une incapacité de l'organisme à maintenir son métabolisme, à se reproduire, et pouvant compromettre sa survie (Amiard and Amiard-Triquet, 2008). Ils regroupent entre autres des marqueurs moléculaires (e.g. cortisol, stress oxydant, génotoxicité...), des marqueurs subcellulaires et cellulaires (e.g. stabilité de la membrane lysosomale, immunodéficiences...) et des marqueurs tissulaires et histologiques (e.g. altérations des structures hépatiques). L'importance des effets néfastes va varier en fonction de la relation dose-effet ainsi que du niveau d'organisation biologique (Fig. 1.14), pouvant à terme atteindre les niveaux supérieurs de la fonction, de l'individu, et de la population (Amiard and Amiard-Triquet, 2008). Plus le niveau d'organisation biologique est faible, plus la réponse biologique est sensible.

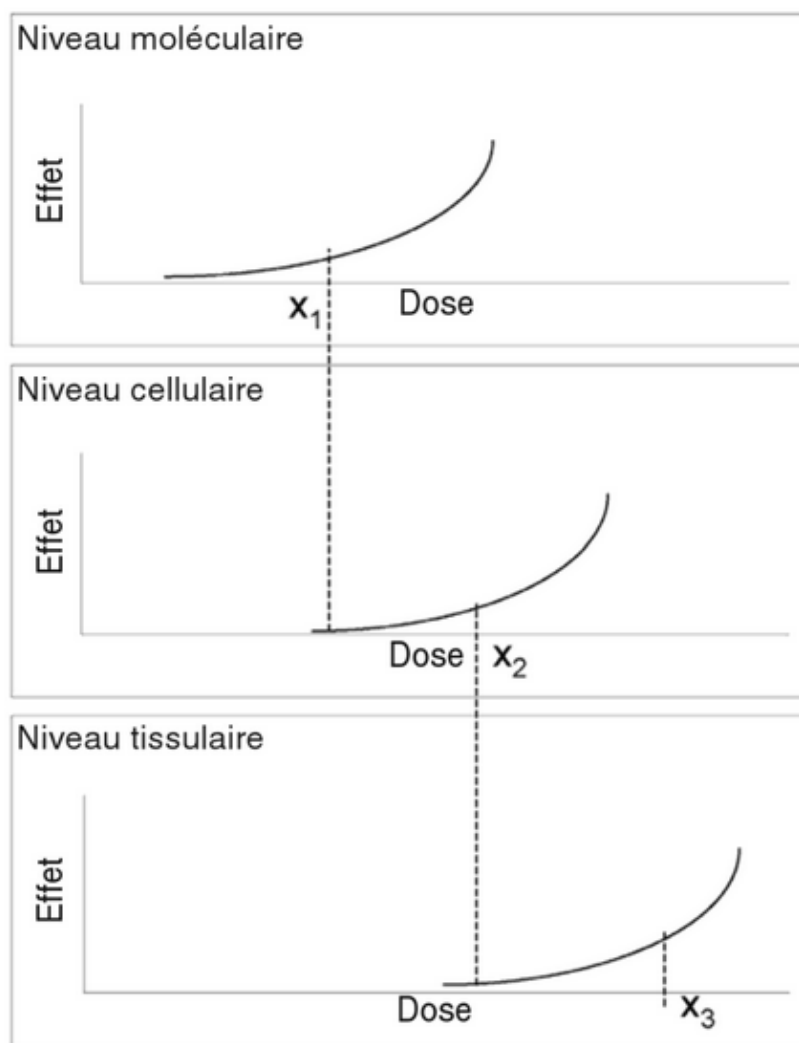


Figure 1.14: Biomarqueurs de dommage: évolution théorique de la relation dose/effet en fonction du niveau d'organisation biologique (Amiard and Amiard-Triquet, 2008).

Le phénomène de tolérance, manifesté par l'apparition des biomarqueurs de défense, représente un problème dans l'évaluation des risques chimiques environnementaux car les effets d'acclimatation des organismes à leur milieu pollué ne sont pas pris en compte par les décideurs politiques (e.g. Directive Cadre Européenne sur l'eau), risquant d'engendrer une sous-estimation des risques.

Les biomarqueurs de dommage sont des indicateurs de l'état de santé d'un individu d'une espèce donnée. Cependant leur valeur à l'échelle d'une population dépend de leur propagation aux niveaux d'organisation biologique supérieurs. Bien que certaines études présentent les marqueurs histologiques comme les plus pertinents chez les poissons et mollusques (Au, 2004), les connaissances sur les biomarqueurs histo-cytopathologiques ne sont pas assez approfondies pour que leur vocation écologique soit retenue (Amiard and Amiard-Triquet, 2008).

Chapitre 2

Matériel et méthodes

2.1. Décontamination de la vaisselle de laboratoire

Préalablement à toute campagne d'échantillonnage ou expérimentation, et par précaution afin d'éviter toute contamination des échantillons, l'ensemble de la vaisselle en polypropylène utilisée pour les expérimentations et les échantillonnages a été baignée durant 72 heures dans de l'acide nitrique (10% v/v HNO₃, Baker, 16M) puis rincée trois fois à l'eau déionisée et trois fois à l'eau Milli-Q (18,2 MΩ, Millipore). Elle a ensuite été séchée sous une hotte à flux laminaire, puis stockée dans des poches doubles en polyéthylène (PE) scellées hermétiquement jusqu'à son utilisation.

2.2. Les huîtres comme outil bio-indicateur de la pollution métallique environnementale

2.2.1. Suivi d'observation de la contamination chimique du littoral français (RNO/ROCCH, Ifremer).

Le « Réseau National d'Observation » (RNO) de l'Ifremer, devenu « Réseau d'Observation de la Contamination Chimique du milieu marin » (ROCCH, 2008), collecte et analyse les concentrations en contaminants dans les moules et les huîtres du littoral français depuis 1979, comptabilisant aujourd'hui environ 90 sites d'observation régulièrement échantillonnés et analysés (cf. 2.4.3.2). Répondant à une demande publique, les contaminants considérés sont ceux classés comme prioritaires par la Directive Cadre Européenne (V, Cr, Ni, Cu, Zn, Cd, Hg et Pb), cependant, un suivi des concentrations en Ag est disponible entre 2003 et 2014. Le choix de l'organisme sentinelle (huîtres et/ou moules) dépend de leur abondance sur les sites concernés. Bien qu'étant tous deux des organismes filtreurs suspensivores, ces bivalves n'accumulent pas les contaminants dans des proportions identiques, les huîtres étant considérés comme un hyper accumulateur (e.g. Chiffolleau et al., 2005). Ce travail s'est donc focalisé sur l'accumulation de Ag et Cu dans les huîtres au cours de la période 2003-2014. L'évolution temporelle de la contamination en Cu et Ag dans les huîtres de la baie de Morlaix, la rade de Brest, le Golfe du Morbihan, Marennes Oléron et l'estuaire de la Gironde (Fig. 2.1) a été déterminée à partir de l'exploitation de la banque de données partagées (<http://envlit.ifremer.fr/resultats/surval>). Les sites concernés sont situés dans le domaine

intertidal mais peuvent présenter des gammes de salinité différentes selon l'influence continentale.

En respect de la convention pour la protection du milieu marin de l'Atlantique du Nord-Est (OSPAR, 1998) et dans la perspective d'inter-comparaison des résultats obtenus entre les sites français, européens et mondiaux, le prélèvement des organismes est calibré. En France, les huîtres japonaises *Crassostrea gigas* âgées de 2 ans (8 cm de long) ont été échantillonnées 4 fois par an de 1979 à 2003, 2 fois par an (février et novembre) de 2003 à 2007, puis 1 fois par an (février) depuis 2008 (Lanceleur et al., 2011b). Cette fréquence d'échantillonnage a évolué au cours du temps afin de s'affranchir du signal de la variabilité saisonnière due au cycle de reproduction des huîtres. Pour chacun des 13 sites, l'analyse des contaminants est effectuée sur un regroupement d'un minimum de 10 organismes lyophilisés, broyés et homogénéisés (Chiffolleau et al., 2003; Claisse, 2012). Les analyses ont ensuite été effectuées par spectrométrie d'absorption atomique (cf. 2.4.1).

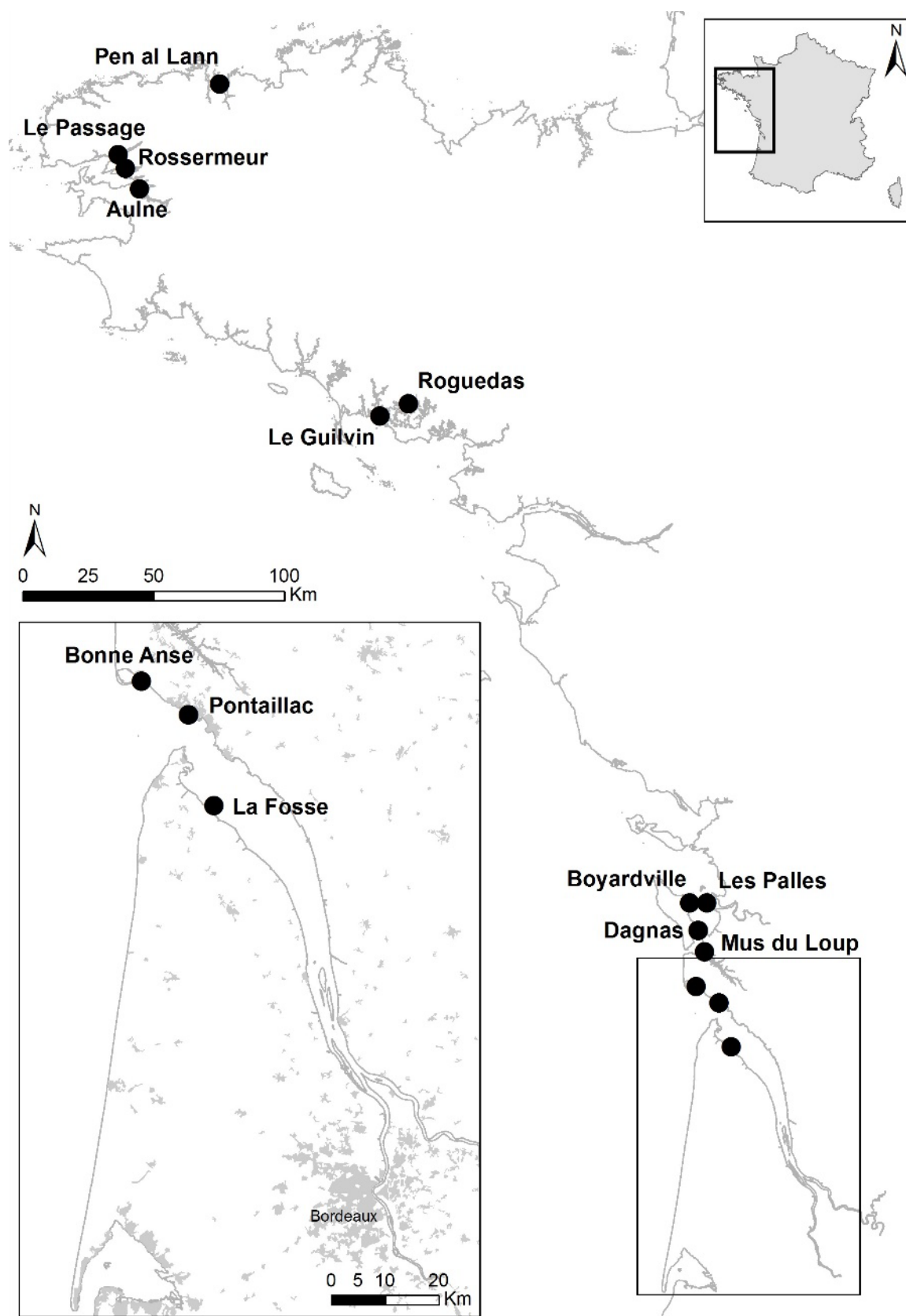


Figure 2.1 : Carte des sites de prélèvements d'huîtres effectués dans le cadre du RNO/ROCCH étudiés dans cette thèse.

2.2.2. Cinétique de la bioaccumulation de Ag et Cu chez l'huître *Crassostrea gigas* (Thunberg) par dopage isotopique

L'objectif des expérimentations de dopage isotopique *in vivo* mises en place était d'observer la cinétique d'accumulation de Ag et Cu chez les huîtres en intégrant une approche histologique. Cette série d'expérimentations visait à évaluer la faculté d'adaptation des huîtres aux conditions environnementales d'exposition par voie directe et trophique, en termes de rapidité et d'efficacité d'accumulation.

2.2.2.1. Origine et âge des huîtres

Les huîtres *Crassostrea gigas* de culture, de calibre 8 cm, utilisées dans les expérimentations de suivi de contamination en Cu et Ag par dopage isotopique (c.f. Chapitre 3) provenaient de la ferme ostréicole « OSTRANOR » située à San Vincente de la Baquera (Pays Basque, Espagne).

Dès leur arrivée au laboratoire, les huîtres utilisées pour les deux expérimentations ont été mises à dépurer durant 48 heures dans des aquariums d'eau de mer filtrée (OSPAR).

2.2.2.2. Préparation des solutions mono-isotopiques de dopage

Des grains de métaux solides de ^{63}Cu et ^{107}Ag (Oak Ridge National Laboratory, TN, EU) ont été dissous dans de l'acide nitrique ultra pur (HNO_3 ultrex 14M). Les solutions mono-isotopiques constituées ont par la suite été diluées. Leur concentration ainsi que leur pureté ont été contrôlées par spectrométrie de masse (ICP-MS, Thermo X7, Thermo Scientific). La pureté des solutions était respectivement de 99,2% et 99,9% pour ^{107}Ag et ^{63}Cu .

2.2.2.3. Déroulement des expérimentations *in-vivo* pour l'étude de la contamination par voie directe

L'ensemble des expérimentations *in vivo* s'est déroulé à la station marine de Plentzia (Université du Pays Basque), au Pays-Basque espagnol. Quatre cent huîtres calibrées (~8 cm) ont été uniformément réparties dans 5 aquariums en polypropylène remplis d'eau de mer côtière naturelle filtrée (Température = 17°C ; Salinité = 28 ; pH = 8) dans une salle thermostatée à 17°C et ont été soumises à un cycle jour/nuit par lumière artificielle (allumée de 9h à 21h). Quatre des cinq microcosmes ont été dopés par l'ajout des isotopes ^{107}Ag et ^{63}Cu selon des

conditions d'exposition différentes (^{63}Cu : 1000 et 2000 ng/l ; ^{107}Ag : 50 et 500 ng/l; Tab. 2.1), le cinquième aquarium étant désigné comme témoin était exempt d'ajout de contaminants. Pour éviter une contamination trophique sur la durée d'exposition de 28 jours, les huîtres ont été nourries pendant 4 heures (de 11h à 15h) chaque jour dans des aquariums différents contenant une eau de mer filtrée non contaminée à l'aide d'une alimentation pour mollusques filtreurs à base de plancton (SERA MARIN, « Coraliquid »). Pendant ce temps, l'ensemble des milieux d'exposition (conditions contaminées et témoin) a été renouvelé à partir d'eau de mer filtrée et d'ajout de ^{107}Ag et ^{63}Cu dissous, ceci afin de conserver des conditions nominales constantes d'exposition des organismes.

Tableau 2.1: Conditions d'exposition des huîtres appliquées pour chaque aquarium de contamination dans le cadre de l'expérimentation sur le transfert des métaux par voie directe.

Aquarium	A	B	C	D	E
^{107}Ag	50 ng.l ⁻¹	50 ng.l ⁻¹	500 ng.l ⁻¹	500 ng.l ⁻¹	CONTROL
^{63}Cu	1000 ng.l ⁻¹	2000 ng.l ⁻¹	1000 ng.l ⁻¹	2000 ng.l ⁻¹	CONTROL

Afin de suivre la cinétique d'accumulation de ces métaux dans les différents organes, quinze huîtres ont été prélevées aux temps 7, 14, 21 et 28 jours suivant le départ de l'exposition dans chaque aquarium. Cinq d'entre elles ont été disséquées pour l'analyse des concentrations métalliques dans les branchies, le muscle, la masse viscérale, le manteau, et les gonades au laboratoire EPOC, et 10 d'entre elles ont été préparées (inclusion dans la résine, coupes semi fines) pour leur analyse histologique en collaboration avec l'Université du Pays Basque (EHU/PiE, Plentzia, Espagne ; Rementeria et al., *in press* ; ANNEXE 2). Le contenu des aquariums a été ajusté au nombre d'huîtres : 80 huîtres/30L en semaine 1, 60 huîtres/20L en semaine 2, 40 huîtres/10L en semaine 3 et 20 huîtres/10L en semaine 4.

Après dissection, les échantillons ont été placés 24 heures au congélateur (-80°C) puis lyophilisés pour faciliter leur conservation jusqu'à leur digestion et leur analyse par ICP-MS (c.f. 2.3.3.2 ; Mikolaczyk et al., 2015).

2.2.2.4. Déroulement des expérimentations in-vivo pour l'étude de la contamination par voie trophique

- Culture et contamination des algues

Une souche du clone T-Iso de l'algue *Isochrysis galbana* a été mise en culture dans des photobioréacteurs de 30L en plexiglas (polyméthacrylate de méthyle). Les algues ont été exposées à une lumière blanche d'intensité constante (2 lampes de 36W par photobioréacteur), dans une pièce à une température constante de 18°C dont l'air était filtré (0,2 µm).

La densité de la culture algale a été vérifiée quotidiennement à l'aide d'un dispositif de numération cellulaire de Naubauer. Chaque fois que cette densité a atteint $8 \cdot 10^6$ cellules/ml la culture a été diluée (afin de permettre à la colonie algale de continuer sa croissance) et nourrie par un ajout de nutriments (F/2 Algae Food Part A and B, based on Guillard's formulation, Proline water conditioners ; Guillard, 1975).

A chaque jour de l'expérimentation, les algues des photobioréacteurs en phase de développement exponentiel ont été transférées dans 8 bouteilles en verre de 1L préalablement lavées à l'acide nitrique (16M, Baker Analysed) et rincées à l'eau milliQ puis à l'eau de mer filtrée. La densité d'algues dans les bouteilles a été ajustée à $3 \cdot 10^6$ cellules/ml pour chaque litre d'eau de mer filtrée. Les algues ont été soumises à 4 conditions d'exposition aux contaminants différentes (500 ng.L⁻¹ de ¹⁰⁷Ag, 8600 ng.L⁻¹ de ⁶³Cu, 500 ng.L⁻¹ de ¹⁰⁷Ag + 8600 ng.L⁻¹ de ⁶³Cu, et une bouteille de contrôle sans contamination), avec deux répliques pour chaque groupe expérimental, le tout distribué comme décrit dans la figure 2.2.

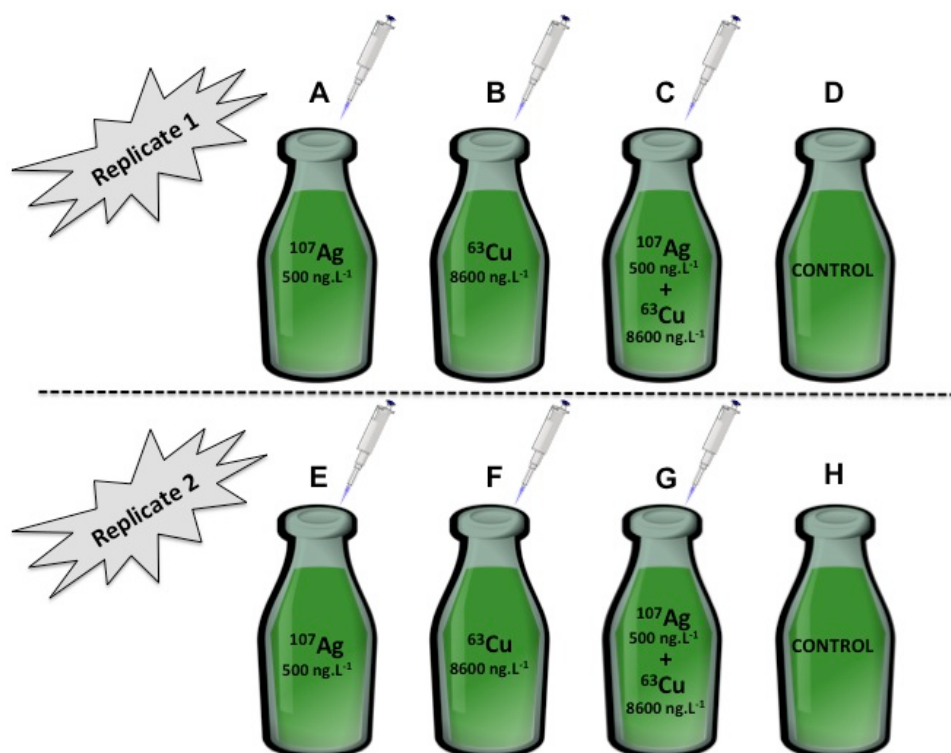


Figure 2.2: Conditions de contamination des algues appliquées pour chaque bouteille de contamination dans le cadre de l'expérimentation sur le transfert des métaux par voie trophique.

Le temps d'exposition des algues aux contaminants a été de 24 heures ce qui a permis une accumulation effective de Ag et Cu dans les algues exposées (bouteilles A, B, C, E, F, et G), sans pour autant accroître leur mortalité de manière significative. Cette phase de contamination des algues a été effectuée dans des conditions contrôlées d'air filtré, de lumière (activée sur l'ensemble de la durée de contamination : 24 heures) et de température ($T=17^{\circ}\text{C}$).

Avant de nourrir les huîtres avec les algues contaminées, ces-dernières ont été extraites de leur milieu de contamination (eau de mer dopée en ^{107}Ag ou ^{63}Cu) par centrifugation (6 minutes à 4000 rpm, modifié d'après Ettajani et al., 1992) puis remises en suspension manuellement dans de l'eau de mer filtrée nouvelle. Cette étape a été effectuée afin de « rincer » les algues et ainsi d'éliminer un biais potentiel qui aurait été induit par la présence de restes du milieu de culture à la surface des cellules. L'état des algues a été vérifié au microscope après centrifugation, et celles-ci ne présentaient pas de lésions. Au cours de l'expérimentation, le volume des algues centrifugées a été ajusté en fonction du nombre d'huîtres et du volume d'eau de mer présents dans les aquariums expérimentaux.

- Protocole expérimental d'exposition des huîtres

Après leur période de dépuración, les huîtres ont été réparties dans 8 aquariums distincts de 45 litres en polypropylène (3 conditions d'exposition + 1 aquarium de contrôle x 2 réplicats) pour commencer l'expérimentation, à raison de 30 huîtres par aquarium immergées dans 30 litres d'eau de mer.

Pour étudier les effets de la contamination par voie trophique, les huîtres ont été exposées aux algues contaminées, sur l'ensemble de la période expérimentale de 21 jours, chaque jour pendant 20h à raison d'une quantité de 3.10^6 cellules/ml. L'expérimentation était initialement programmée sur 28 jours d'expositions, mais face à une mortalité élevée des organismes, elle a été écourtée à 21 jours. L'ensemble de l'expérimentation s'est déroulé dans des conditions de lumière (photopériode de 12 heures, avec allumage de la lumière de 8 heures à 20 heures) et de température (17°C) contrôlées. Les paramètres physico-chimiques de l'eau de mer des aquariums étaient stables, avec une température de 14,5°C, un pH de 8 et une salinité de 31,1. Après cette période de contamination de 20 heures, l'eau de nourrissage contenant les algues contaminées de chaque aquarium a été vidée, les aquariums ont été rincés (ainsi que les huîtres) à l'eau de mer, avant d'être remplis à nouveau avec de l'eau de mer nouvelle. Les organismes ont ensuite été laissés dans cette eau nouvelle durant 4 heures, avant d'être à nouveau nourris avec les algues. Le renouvellement de l'eau a ainsi permis de contrôler la concentration auxquelles les huîtres étaient exposées quotidiennement (éliminant les restes d'algues de la veille).

- Prélèvement des échantillons

Les algues ont été prélevées dans chacune des bouteilles de contamination aux temps 7, 14 et 21 de l'expérimentation. Pour cela, le contenu de ces bouteilles a été centrifugé puis, tout comme les huîtres, congelé à -80°C pendant 24 heures avant d'être lyophilisées puis analysé par ICP-MS (cf. 2.3.3.2.). Les algues issues des bouteilles D et H (Fig. 2.2) ont servi de référence pour la valeur au temps 0.

La concentration de l'eau des bouteilles de contamination a également été contrôlée avant la contamination, puis 10 minutes et 24 heures après l'injection des contaminants. Pour cela, 30 ml ont été prélevés à l'aide seringues de 20 ml en polypropylène, puis filtrés à l'aide de filtres-seringue (0,2 µm) et acidifiés avec 2 gouttes de HCl (0,5% HCl, J.T. Baker INSTRASOL). Les échantillons ont été conservés à -80°C jusqu'à l'analyse.

Les échantillons ont ensuite été conservés à 4°C et à l'abri de la lumière jusqu'à leur analyse par ID-ICP-MS (cf. 2.3.2.2.a).

Les sessions d'échantillonnage des huîtres ont eut lieu après 7, 14 et 21 jours d'exposition aux algues contaminées. Huit organismes ont été prélevés dans chaque aquarium, dont 3 pour les analyses chimiques (et 5 pour les observations histopathologiques). Afin d'observer l'accumulation des métaux dans les différents tissus, les huîtres ont été disséquées en séparant le muscle, les branchies, le manteau, la glande digestive et les gonades qui ont été placés dans des tubes séparés. Les échantillons ont ensuite été congelés durant 24 heures à -80°C avant d'être lyophilisés puis analysés par ICP-MS (cf. 2.3.3.2.).

2.3. Cinétique de désorption de Ag et Cu dans l'estuaire de la Gironde

L'objectif principal de cette étude était d'estimer la biodisponibilité potentielle de Ag et Cu dans l'Estuaire de la Gironde, en s'approchant au mieux des conditions environnementales (e.g. gradient de turbidité estuarien) et en précisant le protocole afin de s'affranchir d'éventuels biais (e.g. réactif limitant, concentration en sédiments inappropriée) pouvant entraîner une sur- ou sous-estimation des résultats.

2.3.1. Echantillonnage des laisses de crue

Les laisses de crue ont été échantillonnées après un épisode de crue en décembre 2014 le long des berges de la Garonne à La Réole (Gironde, France ; Fig 2.3) qui représente la limite amont de la marée dynamique pour l'estuaire de la Gironde. Seuls les sédiments de surface (< 2 mm sous la surface) ont été prélevés avec des cuillères en plastique préalablement décontaminées afin d'éviter toute contamination additionnelle. Ces sédiments ont ensuite été stockés à 4°C et à l'abri de la lumière jusqu'à leur utilisation pour l'expérimentation.

2.3.2. Echantillonnage de l'eau de mer

L'eau de mer utilisée pour cette expérimentation a été échantillonnée sur la plage de Biscarosse (Fig. 2.3) à l'aide de bidons en polypropylène de 40 litres préalablement lavés à l'HNO₃ 10% puis rincés. Dès son arrivée au laboratoire, cette eau a été filtrée (filtres Whatman GF/F, < 45 µm) dans des bouteilles de 1 litre (préalablement décontaminées à l'HNO₃ et HCl 10%) qui ont

été stockées en chambre froide (4°C) jusqu'au lancement de l'expérimentation. La salinité de cette eau de mer était de 31.

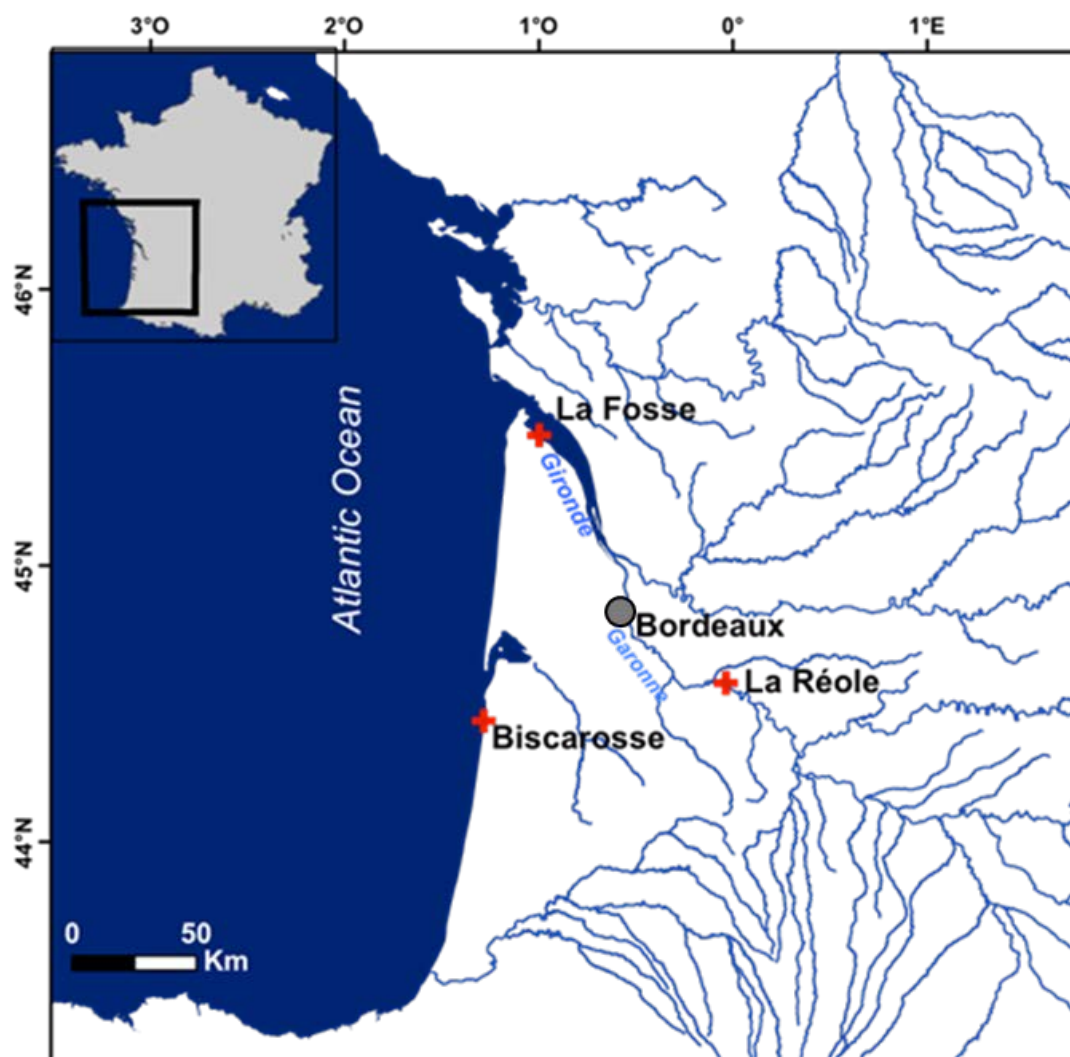


Figure 2.3 : Carte des sites d'échantillonnage de sédiments (La Réole) et d'eau de mer (Biscarosse) utilisés pour l'expérimentation visant à étudier la cinétique de désorption de Ag et Cu (cf. Chapitre 4). Le site de La Fosse (Estuaire de la Gironde) où se trouvent les bancs d'huitres sauvages ainsi que la ville de Bordeaux ont été placés à titre indicatif.

2.3.3. Déroulement de l'expérimentation

Pour l'expérimentation de désorption, les laisses de crue ont été utilisés sous leur forme humide (Villares et al., 2005 ; Kalman and Turner, 2007 ; Jones and Turner, 2010) afin de représenter au mieux les conditions naturelles de la remise en suspension des sédiments.

Afin de permettre une comparaison des résultats de cette étude avec des travaux préexistants qui ont utilisé des sédiments secs, un facteur de conversion humide-sec a été calculé. Pour cela, 3 aliquotes de sédiments humides ont été pesés, puis placés à l'étuve pendant 24 heures à 50°C avant d'être repesés. La valeur moyenne obtenue pour ce facteur de conversion était de 2,09. Cette valeur a également permis le calcul des masses de laisses de crue humides à utiliser pour chaque rapport solide-liquide testé dans la l'expérimentation de désorption (cf. chapitre 5).

L'expérimentation s'est déroulée en trois parties soumises au même protocole ainsi qu'à la même stratégie d'échantillonnage, mais chacune d'entre elles étant caractérisée par un réactif comme milieu de désorption qui lui a été spécifique : (i) HCl 1M (estimation de la fraction potentiellement biodisponible ; Lanceleur et al., 2013), (ii) eau de mer (reproduction des conditions environnementales), ainsi que d'une (iii) solution d'eau de mer et d'Albumine de Sérum Bovin (ASB, reproduction des conditions enszyatiques rencontrées dans le tractus digestif des organismes détritivores ; Voparil and Mayer, 2004) à une concentration de 5 g.l⁻¹.

L'expérimentation a été mise en place pour 3 concentrations de particules sédimentaires différentes : 0,1 g.l⁻¹, 1 g.l⁻¹ et 20 g.l⁻¹, avec 3 répliques pour chacun de ces rapports solide-liquide (RSL). Ces différents RSL ont été définis afin de refléter les conditions environnementales de l'estuaire de la Gironde. En effet, les RSL de 1 g.l⁻¹ et de 20 g.l⁻¹ reflètent une gamme de concentrations en particules en suspension rencontrées dans la zone de turbidité maximale ou « bouchon vaseux » de l'estuaire de la Gironde, avec des RSL généralement supérieurs à 1 g.l⁻¹ (Castaing and Allen, 1981). Le RSL de 0,1 g.l⁻¹ utilisé dans cette étude est, quant à lui, représentatif des concentrations en particules en suspension caractéristiques des milieux fluviaux (Lanceleur et al., 2013).

Pour chacune des parties de l'expérimentation, les sédiments humides ont été placés dans des flacons de 200 ml en polypropylène (NUNKTM, Thermo Scientific) suivant des masses appropriées afin d'obtenir les RSL souhaités (Fig. 2.4). Ces flacons ont ensuite été remplis avec 200 ml de réactif d'extraction (HCl 1M, eau de mer ou solution de ASB). Une fois scellés avec du Parafilm[®], les flacons ont été placés dans un agitateur automatique afin de maintenir les particules de laisses de crue en suspension entre les temps d'échantillonnage.

Afin de tester l'effet limitant du réactif, celui-ci a été renouvelé pour la moitié de l'expérimentation après 2, 4, et 6 heures d'exposition des particules (Fig. 2.4).

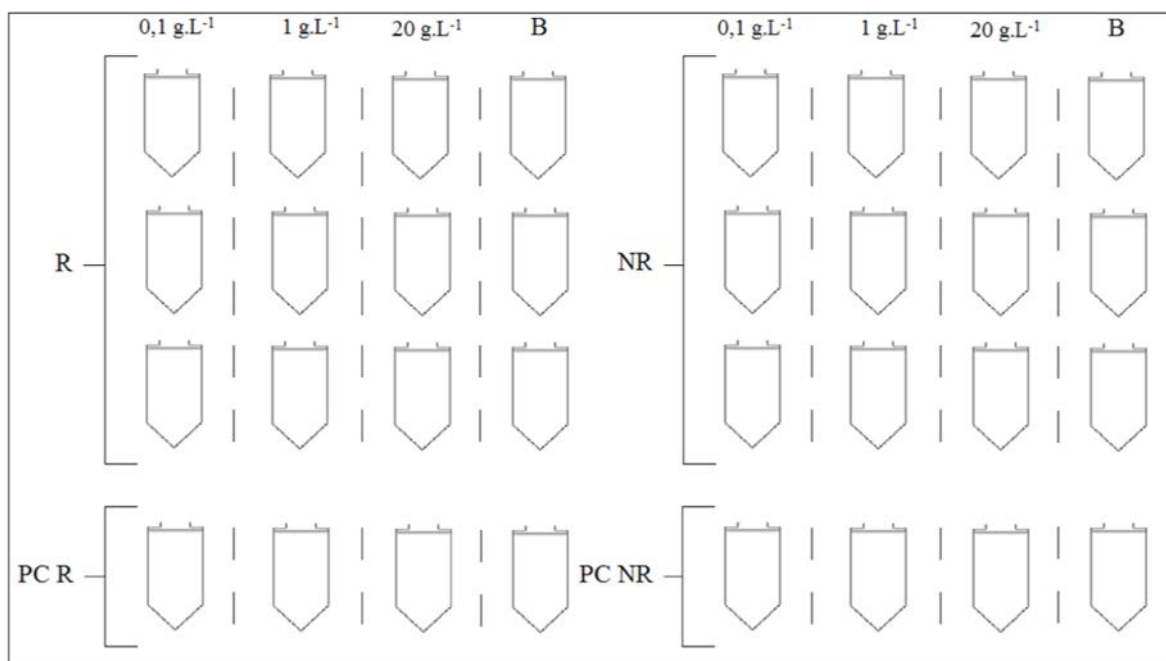


Figure 2.4: Schéma de la mise en place de l'expérimentation de désorption de Ag et Cu pour un réactif donné; R : réactif renouvelé, NR : réactif non renouvelé, PC R : replica pour les mesures de physico-chimie dans le cas du réactif renouvelé, PC NR : replica pour les mesures de physico-chimie dans le cas du réactif non renouvelé, B : blanc.

Les prélèvements d'échantillons de la phase dissoute ont été effectués 10 minutes après le début de l'expérimentation (T0), puis après 2 (Lawrence et al., 1999 ; Villares et al., 2005 ; Sutherland et Tack, 2008), 4 (Lawrence et al., 1999), 6 et 24 heures (Audry et al., 2006) de désorption (respectivement T1, T2, T3 et T4 ; Fig. 2.5) pour les cas où le réactif était renouvelé. Dans le cas où le réactif n'était pas renouvelé, les échantillons ont été prélevés après 10 minutes puis 24 heures de désorption (Fig. 2.5). Afin de procéder à l'échantillonnage, les flacons ont été centrifugés pendant 7 minutes à 3000 rpm (Jones and Turner, 2010), puis 50 ml de surnageant ont été prélevés et filtrés à 0,2 μ m (filtres-seringues Minisart[®], Sartorius), et transférés dans des flacons en polypropylène. Les restes de surnageant resté dans les flacons a ensuite été éliminé avant d'être renouvelé par du réactif « neuf ». Les échantillons d'eau de mer ont été acidifiés avec de l'acide chlorhydrique (0,5% HCl, J.T. Baker INSTRA Analysed) avant leur stockage. L'ensemble des échantillons a ensuite été placé en chambre froide (4°C) afin d'être conservé jusqu'à l'analyse. A la fin de l'expérimentation, les restes de surnageant ont été éliminés, et les flacons ont été placés à l'étuve afin de sécher les particules. Les particules ont ensuite été récupérées, broyées, puis stockées à l'abri de la lumière jusqu'à leur analyse pour quantifier la fraction particulaire non-extraite.

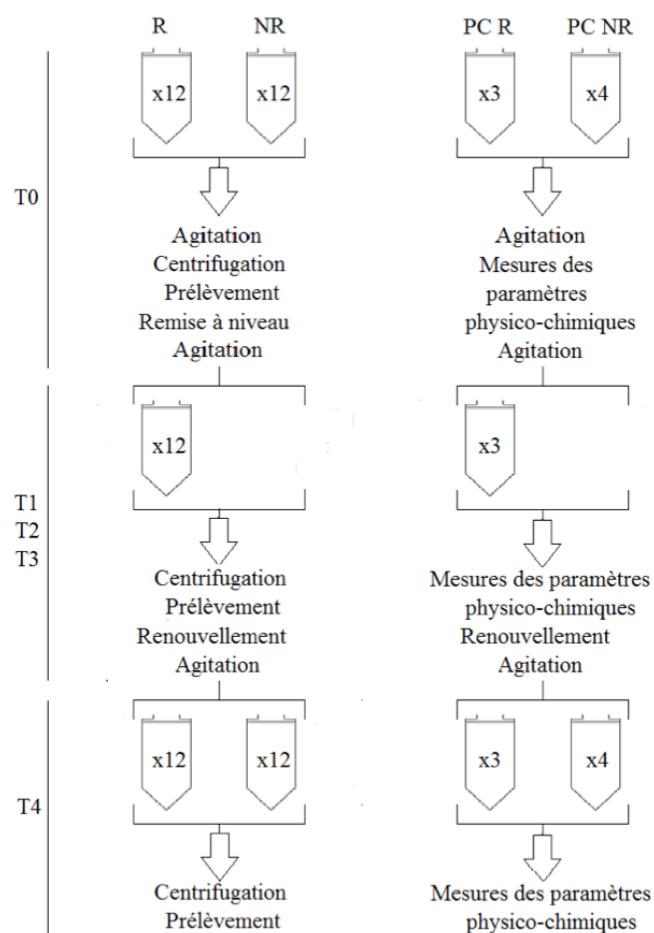


Figure 2.5 : Schéma du protocole expérimental de désorption de Ag et Cu pour un milieu de désorption donné ; R : réactif renouvelé, NR : réactif non renouvelé, PC R : réplique pour les mesures de physico-chimie dans le cas du réactif renouvelé, PC NR : réplique pour les mesures de physico-chimie dans le cas du réactif non renouvelé.

2.4. Méthodes analytiques

2.4.1. Dosage des ETM par spectrométrie de masse (ICP-MS)

Les échantillons d'eau, les attaques totales de sédiments et de matériels biologiques ont été analysés par spectrométrie de masse à plasma couplé induit (modèle ICP-MS X7, Thermo Scientific). Cette technique analytique permet une quantification quasi-simultanée des différents isotopes de Ag et Cu constituant les échantillons. Le principe de cette technique comprend quatre étapes consécutives :

1 - La nébulisation : l'échantillon, prélevé à l'aide d'un passeur automatique, est amené par une pompe péristaltique dans le nébuliseur (chambre de vaporisation). Il y est alors transformé en un fin aérosol grâce à un jet d'argon (Ar) gazeux.

2 - L'ionisation : l'aérosol ainsi formé est injecté dans une torche à quartz où il est ionisé à l'aide du plasma d'Ar (Ar ionisé et maintenu à une température entre 6000 et 8000°K).

3 - La séparation selon le rapport masse/charge (m/z) : une partie des ions formés ($\approx 10\%$) passent successivement dans deux chambres de vide à 10^{-3} Pa puis 10^{-6} Pa. Dans cette dernière, les ions chargés positivement sont extraits à l'aide de lentilles électrostatiques. Celles-ci orientent également le faisceau d'ions en direction du spectromètre de masse quadripolaire, qui fonctionne comme un filtre séparant les ions selon leur rapport m/z . Seuls les ions dont le rapport m/z correspond au champ magnétique appliqué au quadripôle peuvent franchir le filtre.

4 - La détection : Pour terminer, le signal émis par les ions parvenant au détecteur est traduit en nombre d'impulsions ou de « coups ». Une calibration externe de l'appareil à l'aide d'une solution standard multi-élémentaire permet de faire correspondre une concentration au nombre de coups obtenus.

La dérive de sensibilité de l'appareil est mesurée, au cours de l'analyse, par le dosage régulier (tous les 5 échantillons) d'un blanc (HNO_3 ultrex, 1% m/v) et d'un étalon.

2.4.2. Mesure des concentrations en Ag et Cu dans la phase dissoute

2.4.2.1. Matrice acide chlorhydrique 1M (HCl 1M)

Les échantillons d'HCl 1M ont été dilués 2 fois avec de l'eau Milli-Q avant d'être analysés par ICP-MS.

2.4.2.2. Matrice eau de mer

2.4.2.2. a. Analyse de Ag_d par Dilution isotopique et ICP-MS (ID-ICP-MS)

- Dilution isotopique :

La méthode utilisée dans cette thèse pour le dosage de Ag_d dans l'eau de mer (cf. 5.2), est la technique d'extraction solide-liquide (Barriada et al., 2003, 2007 ; Ndung'u et al., 2006 ; Yang et Sturgeon, 2002 ; Lanceleur et al., 2013). Cette technique a pour principe de modifier le rapport naturel de l'élément dont on veut connaître la concentration, par l'ajout d'une quantité connue d'un de ses isotopes stables (Fig. 2.6). Afin d'optimiser la fiabilité de cette méthode, le dopage doit permettre une modification d'au moins 20% du rapport isotopique naturel. Pour ce faire, 50 μl d'une solution mono-isotopique de ^{107}Ag (0,744 ng.mL^{-1} , pureté 99,1% de ^{107}Ag ; Oak Ridge National Laboratory, Tennessee, USA) a été ajoutée aux 12 ml d'échantillons 24 heures avant les analyses. L'emploi de cette technique a permis de s'affranchir des fluctuations du rendement d'extraction dues à l'extraction solide-liquide et à l'affinité des différents chlorocomplexes de Ag pour la résine (Barriada et al., 2007 ; Thèse Lanceleur, 2011).

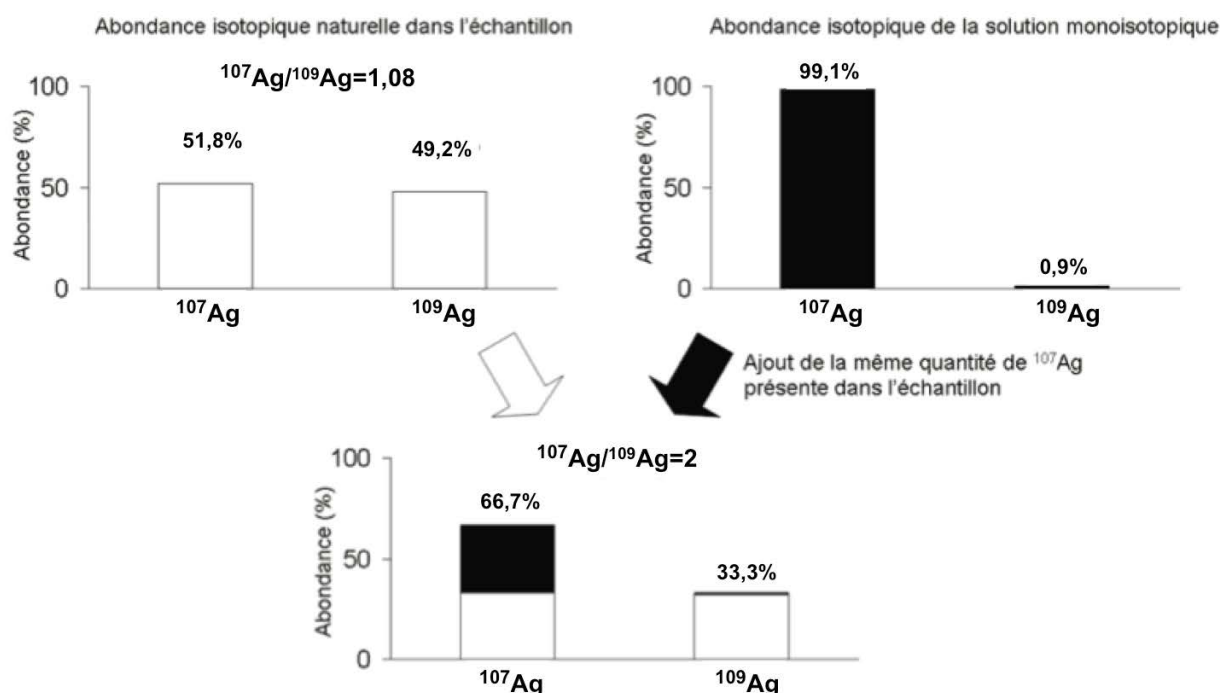


Figure 2.6 : Principe de la dilution isotopique (modifié d'après Lanceleur, 2011)

- Extraction et mesure de Ag_d :

L'extraction solide-liquide a pour but de préconcentrer l'échantillon et d'éliminer la matrice saline. Elle s'effectue à l'aide d'une résine échangeuse d'anions (DOWEX 1-X8, maille 200-400, Supelco) contenue dans une mini-colonne en polyétheréthercétone (PEEK ; longueur 5 cm, Ø 2,1 mm, Interchim) reliée à une pompe HPLC à gradient inertée (Spectra System P2000). Avant toute utilisation, la résine est conditionnée par le passage de 6 ml d'eau Milli-Q, puis 3 ml de HNO_3 2M (Plasmapur, Baker), puis à nouveau 6 ml d'eau Milli-Q, le tout répété 5 fois. Le protocole d'extraction des chlorocomplexes de Ag se déroule suivant un cycle opératoire de quatre étapes :

Le chargement de l'échantillon d'eau de mer (12 ml) préalablement acidifié à 0,5% (HCl 12M, Baker Instra) et dopé en ^{107}Ag est passé par la mini-colonne contenant la résine à une vitesse de 3 ml/min. Les chlorocomplexes de Ag (AgCl_2^- , AgCl_3^{2-} , AgCl_4^{3-} ; Barriada et al., 2003, 2007) sont ainsi retenus par la résine alors que la matrice saline est récupérée dans une poubelle à la sortie du dispositif colonne-pompe.

La résine est rincée avec 6 ml d'eau Milli-Q passée à une vitesse de 3ml/min.

Le dispositif colonne-pompe est ensuite branché sur l'ICP-MS, et les chlorocomplexes sont ainsi élués en ligne à l'aide de 2 ml d'acide nitrique (HNO_3 2M, Instra) passé dans la résine à une vitesse de 1 ml/min.

La résine est ensuite à nouveau rincée avec 6 ml d'eau Milli-Q (3 ml/min) avant le chargement de l'échantillon suivant.

Afin de contrôler la qualité de l'analyse (propreté et rendement de la résine), des blancs (effectués avec de l'eau Milli-Q) ont été dopés en ^{107}Ag (de la même manière que les échantillons) puis analysés suivant ce même procédé.

- Traitement du signal et calcul des concentrations :

L'ICP-MS émet un signal transitoire qui permet d'obtenir un chromatogramme dont les aires correspondant à chaque isotope sont intégrées grâce au logiciel PlasmaLab (Thermo Scientific). La concentration initiale en Ag_d de l'échantillon est ensuite calculée d'après le rapport de ces aires des signaux transitoires d'après la formule suivante :

$$C_x = C_y \times \frac{m_y}{m_x} \times \frac{A_y - B_y \times R_n}{B_x - R_n - A_x} \times \frac{AW_x}{AW_y}$$

Équation 1 : Formule de calcul des concentrations en Ag_d par dilution isotopique (d'après Yang et Sturgeon, 2002), avec :

C_x : concentration en Ag de l'échantillon (ng.ml⁻¹)

C_y : concentration en ¹⁰⁷Ag de la solution mono-isotopique de ¹⁰⁷Ag ajoutée (ng.ml⁻¹)

m_x : volume de l'échantillon (ml)

m_y : volume de l'ajout de solution mono-isotopique de ¹⁰⁷Ag

A_x : abondance de l'isotope ¹⁰⁹Ag dans l'échantillon

A_y : abondance de l'isotope ¹⁰⁹Ag dans la solution mono-isotopique de ¹⁰⁷Ag ajoutée

B_x : abondance de l'isotope ¹⁰⁷Ag dans l'échantillon

B_y : abondance de l'isotope ¹⁰⁷Ag dans la solution mono-isotopique de ¹⁰⁷Ag ajoutée

R_n : ratio mesuré ¹⁰⁹Ag/¹⁰⁷Ag ajouté dans l'échantillon dopé

AW_x : masse atomique de Ag dans l'échantillon

AW_y : masse atomique de Ag dans la solution mono-isotopique de ¹⁰⁷Ag

D'après Lanceleur (thèse, 2011), l'effet du facteur de biais de masse sur les résultats estimé à $\approx 1\%$ peut être négligé dans le cas de Ag, car il correspond à une erreur de l'ordre de 0,01 à 0,1 ng.l⁻¹ pour une gamme de concentrations en Ag_d allant de 1 à 10 ng.l⁻¹.

2.4.2.2. b. Analyse de Cu_d par voltammétrie

Cette méthode a été utilisée pour le dosage des échantillons d'eau de mer obtenus dans le cadre de l'expérimentation de suivi de la cinétique de désorption de Cu dans l'eau de mer (cf. 5.3).

Les solutions de Cu (10, 100 et 100 µM) utilisées ont été préparées à l'aide d'une solution standard de Cu AAS (1 g/L, Fluka). L'acidification des échantillons, si nécessaire, a été réalisée avec de l'acide nitrique 65% (Merck, Suprapur).

Les mesures voltamétriques furent réalisées au laboratoire PROTEE de l'Université de Toulon, avec un appareil PSTAT10 or PGSTAT12 (EcoChemie, Utrecht, The Netherlands) contrôlé par le logiciel GPES 4.9 (Eco Chemie) et couplé à un système à trois électrodes 663VA Stand (Metrohm, Swiss). L'électrode de travail est une « static mercury drop electrode » (SMDE ; goutte de taille 1 et d'aire 0.25mm²), tandis qu'une l'électrode de platine sert de contre électrode. Une électrode Ag/AgCl (saturée en KCl) sert d'électrode de référence. Un aliquot de 20 mL d'échantillon est versé dans une cellule électrochimique en polytetrafluoroethylene (PTFE) et agité à l'aide d'un agitateur en Teflon à 3000 rpm. L'oxygène dissous est retiré de la

solution avant l'analyse par une purge à l'aide d'azote de qualité ultra-pure pendant au moins 15 min.

Pour éviter l'évaporation de l'échantillon, une couverture d'azote saturée d'eau a été maintenue au-dessus de la solution durant toute la durée d'analyse. Toutes les analyses furent réalisées à température ambiante (24 ± 2 °C). Le pH a été contrôlé à l'aide d'un pH mètre (Metrohm, 713 PHM). Trois burettes automatiques (Cavro XE 1000 pompe seringue, Tecan, Swiss) ont été utilisés pour le dosage de Cu. Concernant les paramètres des mesures de Cu electro-labile, le temps de déposition est divisé en deux parties : i) 297 s à un potentiel de déposition de -0.5V et ii) 3 s à un potentiel de déposition de -1.6V. Ce fort potentiel négatif permet le retrait de substances actives de surface qui peuvent s'adsorber à la surface de l'électrode et produire des artefacts sur la détermination du pic de Cu. Les autres paramètres utilisés sont une amplitude de pulse de 25mV, un pas d'incrémentation de potentiel de 2.5mV, un temps entre les pulses de 0.1 s avec une durée de pulse de 0.05 s. Le potentiel est scanné de -0.6V à 0.05V ou 0.2V selon la salinité de l'échantillon. Les concentrations totales en Cu dissous ont été déterminées après acidification et digestion UV des échantillons (3h sur le Metrohm 705 UV Digester, ou 12h sous une lampe Hg 150 W) par la méthode des ajouts dosés (duplicat de la mesure de l'échantillon non spiké, suivi de quatre ou cinq additions de solutions standards de Cu ; Capodaglio et al., 1995 ; Omanović et al., 2006). La limite de détection de Cu a été estimée à 2×10^{-10} M.

2.4.3. Mesure des concentrations en Ag et Cu dans la phase particulaire et dans le matériel biologique

2.4.3.1. Dans les sédiments (attaques totales tri-acides) (cf.5.1 et 5.2)

Les concentrations en Ag, Cu et Th total dans les échantillons de laisses de crue, utilisées pour l'expérimentation de désorption du chapitre 5, ont été obtenues après dissolution des sédiments par une attaque totale tri-acides (Blanc et al., 1999 ; Schäfer et al., 2002 ; Audry et al., 2006). Pour cela, un aliquote de 30 mg de sédiment sec de chaque échantillon broyé et homogénéisé est placé dans un tube d'attaque (DigiTUBE, SCP SCIENCE) auquel trois acides sont ajoutés successivement comme suit : 1,5 ml de HCl (12M, Plasmapur), 0,5 ml de HNO₃ (14M, Plasmapur), et 2 ml de HF (22M, Plasmapur). Les tubes sont placés sur une plaque chauffante durant 2 heures à 110°C bouchons fermés (DigiPREP MS ; SCP Science) pour la digestion. Les minéralisats sont ensuite évaporés. Les résidus solides sont dissous avec 250 µl de HNO₃ (14M,

Plasmapur) et 5 ml d'eau Milli-Q, et chauffés 15 min à 80°C. Après refroidissement, les échantillons sont centrifugés à 4000 rpm pendant 10 min, puis 3,5 ml de surnageant sont prélevés et dilués avec 6,5 ml d'eau Milli-Q. Les échantillons sont stockés à 4°C en chambre froide jusqu'à leur analyse. Ils sont dilués une nouvelle fois juste avant leur passage à l'ICP-MS.

A chaque série d'attaques, 4 blancs sont effectués et 2 aliquotes de 2 sédiments de référence certifiés différents (NIST 2702 et IAEA 405) sont attaqués suivant le même protocole que celui appliqué aux échantillons. Les valeurs de concentrations obtenues pour les blancs témoignent de la contamination apportée par les réactifs lors de la digestion et sont donc retranchées aux résultats obtenus pour les échantillons. Pour les deux matériaux certifiés, la reproductibilité des mesures était supérieure à 8% et la justesse était supérieure à 93%.

2.4.3.2. Dans les huîtres et les algues (attaques totales eau régale) (cf. 3.2, 4.1 et 4.2)

- Préparation des échantillons biologiques

Les huîtres ont été disséquées vivantes. Cette dissection a permis de procéder à la séparation des organes suivants : muscle, glande digestive, branchies, manteau et gonades (si présentes), puis de les isoler dans des tubes d'attaques (DigiTUBE, SCP SCIENCE) préalablement décontaminés à l'acide nitrique et prépesés sur une balance de précision.

Les algues ont été préalablement centrifugées pour être pré-concentrées avant d'être transvasées dans les tubes d'attaques.

Tous les échantillons biologiques ont ensuite été placés pour 24 heures dans un congélateur à -80°C avant d'être lyophilisés.

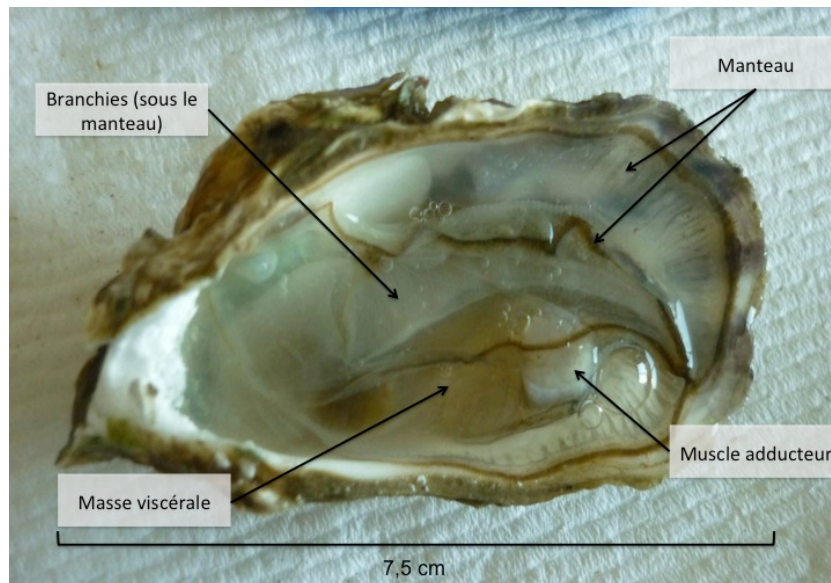


Figure 2.7: Photographie d'une valve droite d'huître contenant le corps mou de l'animal (légendé pour les tissus étudiés)

- Minéralisation des échantillons

Les échantillons (entre 0,1 et 0,2 g sec de matière) ont été minéralisés par l'ajout de 1,4 ml de HNO_3 (14M, PlasmaPur) et 2 ml d' HCl (12M, PlasmaPur ; Daskalakis, 1996) dans les tubes qui ont ensuite été placés, bouchons fermés, sur une plaque chauffante (DigiPREP MS ; SCP Science) durant 3 heures (Pierron et al., 2007) à 90°C . Les minéralisats ont ensuite été dilués par l'ajout de 13,6 ml d'eau Milli-Q et conservés au réfrigérateur à 4°C jusqu'à leur analyse par ICP-MS.

- Contrôle qualité des analyses

La qualité des analyses a été contrôlée par la minéralisation, suivant le protocole décrit ci-dessus, de matériels de référence certifiés (CRM) en Ag et Cu tels que TORT-2 (homard), IAEA-407 (hareng) et NIST-1566b (huître). Les concentrations pour Ag et Cu obtenues étaient systématiquement contenues dans la gamme certifiée (Tab 2.2) avec une justesse et une précision $> 90 \%$ et $< 5\%$ respectivement.

Tableau 2.2: Valeurs moyennes obtenues pour les analyses de matériaux de référence certifiés dans cette thèse (*) et communiquées par les laboratoires fournisseurs (en gras).

Nom du certifié	Ag (mg.kg ⁻¹)	Cu (mg.kg ⁻¹)
TORT-2	7,25 ±0,4 (thèse Strady, 2010) ; 6,64±0,4*	106±10 ; 94,3±6,6*
IAEA-407	ND ; 0,03±0,02*	3,28±0,4 ; 3,08±1,5*
NIST-1566b	0,666±0,009 ; 0,621±0,022*	71,6±1,6 ; 72,9±2,3*

2.4.4. Etude des atteintes histologiques dans la glande digestive chez l'huître *Crassostrea gigas*

L'objectif de cette étape était d'observer d'éventuelles atteintes histopathologiques chez les huîtres girondines sauvages *Crassostrea gigas* consécutives à leur exposition chronique à une contamination polymétallique (cf. 3.1 et ANNEXE 2). Pour cela, les glandes digestives de 10 huîtres ont été prélevées après dissection des organismes (cf. Rementeria et al., 2016 ; ANNEXE 2).

Les échantillons de glandes digestives destinés à la microscopie optique ont été placés dans du liquide fixateur de Carnoy (Martoja and Martoja-Pierson, 1970) pendant 1 heure à 4°C, puis déshydratés par une série graduelle de bains d'éthanol. Les échantillons ont ensuite été nettoyés dans du méthyle benzoate, rincés dans du benzène, puis embaumés dans de la paraffine. Les coupes histologiques (5 µm d'épaisseur) ont été effectuées à l'aide d'un microtome (Leitz 1512) puis montées sur des lames de verre salinisées avant d'être colorées.

La seconde partie des échantillons de glandes digestives qui était destinée à la microscopie électronique à transmission a été fixée au glutaraldéhyde (2,5%) dans un tampon de cacodylate (0,1 M ; pH 7,2) durant 2 heures à 4°C, puis rincée dans ce même tampon. Les échantillons ont ensuite été déshydratés dans une série graduelle de bains d'éthanol puis embaumés dans une résine pour microscopie électronique (EPON 812). Les coupes histologiques semi-fines (1 et 3 µm) ont été effectuées à l'aide d'un ultramicrotome (Leica Ultracut UCT).

Les autométallographes par microscopie optique et électronique ont été obtenus suivant le protocole décrit par Soto et al. (2002).

Chapitre 3

Etude spatio-temporelle de la contamination en Ag et Cu des huîtres sauvages le long de la Côte Atlantique Française.

3.1. Introduction

De nombreuses études ont décrit les effets néfastes d'une exposition chronique aux ETM au niveau histologique et métabolique (Amiard-Triquet et al., 1991; Géret, 2002; Riba et al., 2005), impactant la reproduction, la croissance (Couillard et al., 1995) et le comportement alimentaire des organismes contaminés. Certains de ces effets physiologiques sont considérés comme des biomarqueurs et des témoins d'une contamination chronique (Amiard and Amiard-Triquet, 2008; Amiard et al., 2006; De Lafontaine et al., 2000). Cependant, la relation entre l'intensité de l'exposition et l'expression de ces biomarqueurs a été décrite comme non linéaire, en particulier en condition d'exposition aiguë (Baudrimont et al., 1999; Brown and Parsons, 1978).

Les programmes de biosurveillance, tels que le RNO/ROCCH français, s'intéressent principalement aux concentrations absolues mesurées dans les espèces sentinelles. Or celles-ci présentent une importante variabilité aux échelles inter-individuelle, inter-spécifique et inter-populationnelle, liée à la capacité des organismes exposés à des contaminants de développer des stratégies de protection et d'adaptation (Amiard et al., 2006; Marigómez et al., 2002; Mason and Jenkins, 1995). Certaines de ces stratégies adaptatives, acquises dans l'environnement naturel ou en conditions expérimentales, sont transmissibles aux générations suivantes (Reinecke et al., 1999; Spurgeon and Hopkin, 2000), augmentant la résistance des organismes aux contaminants (Ross et al., 2002b; Spurgeon and Hopkin, 1999). De plus, les concentrations mesurées dans les organismes sont soumises à une variabilité saisonnière liée à leur cycle de reproduction se traduisant par des variations importantes dans les résultats obtenus (Páez-Osuna et al., 1995).

Bien que les programmes de biosurveillance constituent des outils puissants et indispensables pour la surveillance de la qualité environnementale, une telle variabilité dans la réponse des organismes peut induire des incertitudes dans les conclusions et les prédictions faites à partir de ce type d'outil. Face à cette problématique, les objectifs de ce chapitre ont été de:

- ✓ estimer l'étendue de la variabilité inter-individuelle à l'intérieur des pools d'huîtres sauvages girondines utilisés par le programme RNO/ROCCH,

- ✓ évaluer les atteintes histologiques potentielles dans les huîtres sauvages de l'estuaire de la Gironde en comparaison avec les huîtres provenant d'un site moins contaminé (Uradaibai, Pays Basque espagnol),
- ✓ évaluer le potentiel de l'utilisation du rapport élémentaire Cu/Ag (en complément des concentrations absolues en ETM) pour comparer les mesures en Ag et Cu dans les huîtres au cours du temps et entre différentes zones géographiques,
- ✓ utiliser les données de l'enregistrement historique en Ag et Cu dans les huîtres de la côte atlantique française du programme RNO/ROCCH pour interpréter les variations temporelles et régionales en termes de pression environnementale.

3.2. Article #1

Spatial and temporal recording of Cu and Ag in oysters along the French Atlantic Coast: potential and limitations

Mathilde Mikolaczyk¹, Laurent Lanceleur², Jörg Schäfer^{1*}, Jean-François Chiffolleau³, Benat Zaldibar⁴, Manu Soto⁴.

*corresponding author: jorg.schafer@u-bordeaux.fr

¹ University of Bordeaux, UMR EPOC 5805, Allée Geoffroy St Hilaire Bat B18, CS 50023, 33615 Pessac, France

² Laboratory of Bioinorganic Analytical and Environmental Chemistry, Université de Pau et des Pays de l'Adour, LCABIE - IPREM UMR 5254 CNRS/UPPA, UFR Sciences et Techniques, Allée du Parc Montaury, 64600 Anglet, France

³ IFREMER Nantes, Centre Atlantique - Rue de l'Ile d'Yeu - BP 21105 - 44311 Nantes Cedex 03, France

⁴ CBET Research Grp, Dept Zoology and Animal Cell Biology, Sci and Technol Fac and Research Centre for Experimental Marine Biology and Biotechnology (PIE-UPV/EHU), University of the Basque Country (UPV/EHU), PO Box 644, E-48080 Bilbao, Basque Country, Spain

Abstract

Wild oysters from the La Fosse site at the Gironde Estuary mouth, France, have been sampled and metal concentrations were analyzed in the different tissues of each individual. For each organism, histological observations were made to investigate the extent of damages at the tissue level caused by this heavy and long-time contamination. The Cu and Ag concentrations measured in recent wild oysters from the Gironde Estuary were compared to those measured by the French national Mussel Watch program (RNO/ROCCH) in oysters from 13 sites along the French Atlantic Coast between 2003 and 2014. Furthermore, this data base has been analyzed in terms of spatial and temporal approaches.

Wild oysters from the Gironde estuary presented important histopathological damages on digestive glands and connective tissue, and an important individual variation in both Ag and

Cu bioaccumulation. The organotropism showed the digestive gland as the preferential bioaccumulation site. The biomonitoring data base analyze suggested a co-accumulation of the both metals in wild oysters, despite their geographical origins. Results also clearly presented the Cu/Ag as a useful tool for identification of environmental pressure variations (i) inside specific geographical areas (ii) at a long-time scale, and confirmed the necessity of using absolute concentrations for short and mid-term monitoring. All of the results of this work clearly showed the different issues related to the environmental quality biomonitoring, and tended to show the importance of considering a global approach to interpret the message of biomonitoring programs, including histological damages, organism's biological specificities, and multi elementary reasoning.

1. Introduction

Biomonitoring programs in wild living organisms have been used from decades at the global scale to estimate and assess the levels of environmental contamination (Goldberg et al., 1978). Many bivalve species, as oyster *Crassostrea gigas*, are considered as good biomonitors for water quality and other environmental pressures, especially in pollution monitoring, due to their ability to concentrate metals and organic pollutants (Bova, 2011; Kim et al., 2008). The French Mussel Watch program (RNO/ROCCH) conducted by the IFREMER (the French Marine Research Institute), has been monitoring chemicals in mussels or oysters at around 100 sites along the French Atlantic and Mediterranean coast to assess the marine environment quality in different coastal areas (OSPAR commission ; Daskalakis, 1996).

In the late 1970s, this program has revealed a strong metal contamination (mainly Cd derived from metallurgical industry) of wild oysters in the Gironde Estuary mouth (Boutier, 1981 ; Claisse, 1989), leading to the prohibition of oyster harvesting/farming in the estuary and adjacent salt marshes (Audry et al., 2004b) and threatening oyster quality in the nearby Marennes-Oléron Bay, one of Europe's main oyster production areas (Dabrin et al., 2009). Despite the stop of the industrial activity in 1986, ongoing remediation and management efforts at the watershed scale, Cd and other metals mobilized from industrial waste and contaminated sediments in the Lot-Garonne-Gironde fluvial-estuarine continuum still clearly contribute to the estuarine metal budget and the metal burdens in the Gironde oysters. In light of the continuously decreasing Cd contamination in the Gironde oysters, implying a perspective of potential future oyster farming development, other potentially toxic metals such as Ag and Cu are of growing interest. Silver concentrations in the Gironde Estuary oysters are the highest

observed along the French coasts, although oysters from most estuarine sites show evidence of Ag contamination from continental inputs (Chiffolleau et al. 2005). Historical records of Ag in oysters from the RNO/ROCCH sample bank have revealed chronic exposure to Ag from at least three dominant Ag sources (metallurgy, photography, agriculture, urban) changing over the past three decades, resulting in recent Ag concentrations being clearly higher than those of Cd (Lanceleur et al., 2011). While to date there is no European recommendation or regulation for Ag in seafood, US Environmental Protection Agency recommendations (EPA, 2016) suggest that in view of potential human consumption, such Ag concentrations in oysters could be of concern. Similar to Ag, Cu in the Gironde oysters are among the highest of all monitoring sites in the Mussel Watch program (envlit.ifremer.fr), although several studies have stated high and/or increasing Cu contamination in various coastal sites attributed to industrial, urban, and agricultural sources and increasing use in antifouling paints (Katranitsas et al., 2003). Unlike Ag, a toxic metal, Cu is an essential element and its uptake is physiologically regulated, but in case of regulation failure Cu may become extremely toxic (Shuster and Pringle, 1969; Zamuda and Sunda, 1982). Synergy and antagonism effects in metal accumulation were observed in oysters exposed to Ag and Cu at both high (Amiard et al., 2004; Ettajani et al., 1992a) and environmentally relevant (Mikolaczyk et al., 2015) doses.

Numerous studies report deleterious effects on organism's tissues and metabolism (Amiard-Triquet et al., 1991; G  ret, 2002; Riba et al., 2005), impairing their reproduction, growth (Couillard et al., 1995), and feeding behavior.

Some of these physiologic effects, such as histopathological alterations (e.g. digestive gland atrophy, modified tissue integrity in the digestive gland), metallothionein (MT) concentration, intralysosomal metal accumulation or the condition index (CI), are considered as biomarkers and represent witnesses of chronic contamination (Amiard et al., 2006 ; Amiard and Amiard-Triquet, 2008). However, the relation between the exposure and the intensity of biomarker's expression was described as nonlinear, especially in conditions of high exposure levels (Brown and Parsons, 1978 ; Baudrimont et al., 1999).

Biomonitoring programs, such as the Mussel Watch, mainly focus on contaminant accumulation in the sentinel organism, showing inter-individual, inter-specific and inter-population variability, related to the ability of exposed organisms to develop different protection strategies (e.g. they limit the entry of contaminants, store them in nontoxic forms or increase their elimination) (Mason and Jenkins, 1995 ; Marigómez et al., 2002 ; Amiard et al., 2006). Some of these strategies acquired in natural or experimental conditions are transmittable

to next generations (Reinecke et al., 1999 ; Spurgeon and Hopkin, 2000), increasing the resistance of organisms to acute exposure levels (Spurgeon and Hopkin, 1999 ; Ross et al., 2002). Moreover, metal concentrations in bivalves, as observed in monitoring programs, may even vary at the seasonal scale due to their reproduction cycles, implying important fluctuations in whole body weight without clear changes in the metal burden (Páez-Osuna et al., 1995). Although biomonitoring has proven a straightforward and powerful tool for the surveillance of environmental quality, such variability in the response (e.g. contaminant accumulation) of individual organisms may induce uncertainty in conclusions and predictions drawn from biomonitoring observations.

The objectives of the present work are to (i) assess the extent of individual variability in wild oysters from the Gironde Estuary as used in the samples pools of the RNO/ROCCH program, (ii) evaluate potential histological damages in wild oysters from the Gironde Estuary by comparison with oysters from a less contaminated site (Urdaibai Estuary; Spanish Basque Country), (iii) assess the potential of metal concentration ratios (rather than metal concentrations alone) to compare biomonitoring responses for Ag and Cu in oysters over time and at different sites and (iv) use historical Ag and Cu data from the French Mussel watch program to interpret regional and temporal differences in terms of exposure

2. Material and methods

2.1. Sampling and dissection

Wild oysters (8 ± 0.2 cm shell length) were collected in November 2011 from the highly contaminated Gironde Estuary (La Fosse site), known for its historical polymetallic contamination (Audry et al., 2004a; Boutier et al., 1989), and from the Urdaibai Estuary (Muruetta site) located in a UNESCO Protect Natural Reserve (Raposo et al., 2009) (Fig. 3.1). In the Gironde Estuary (La Fosse site), another sampling campaign was conducted in February 2013.

The samples were collected by the OSPAR conventional method (24 hours organism's depuration, removed tissues stored at -20°C; OSPAR, 1992).

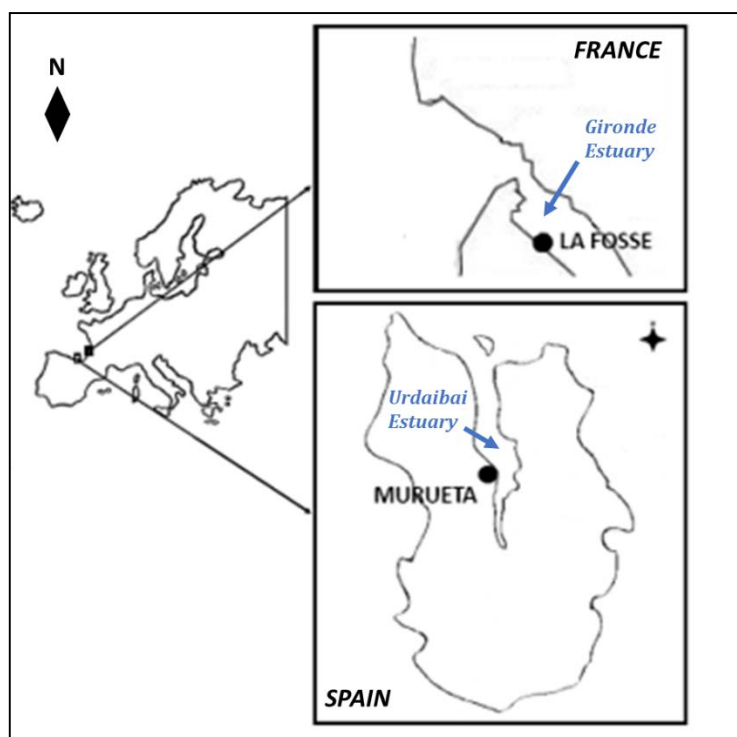


Figure 3.1: Map of oyster sampling sites for histological study.

Oyster tissue samples were placed in HNO₃ 10% decontaminated and pre-weighted polyethylene tubes. In order to observe the organotropism, oysters from the first sampling campaign (La Fosse - Nov 2011) were dissected to analyze the organs (muscle, gills, mantle, and digestive gland) separately.

2.2. Histological analyses

Histological analyses were performed on oysters from Gironde and Urdaibai Estuaries collected in November 2011.

After dissection, one portion of digestive gland samples intended for light microscopy were fixed in the Carnoy's fixative (Martoja and Martoja-Pierson, 1970) for 1 hour at 4°C, and dehydrated by means of graded series of ethanol baths. Samples were then cleared in methyl benzoate, rinsed in benzene and embedded in paraffin wax (Soto et al., 2002). Histological sections of 5 µm were cut in a microtome (Leitz 1512) and placed on silanized glass-slides before the staining.

Autometallography was applied to tissue sections in order to localise metals loosely bound to proteins inside lysosomes upon examination at the light microscope (Soto et al., 2002).

2.3. Chemical analyses

The chemical analyses were performed on oysters individual organisms from the Gironde Estuary collected in November 2011 and February 2013.

For chemical analyses, immediately after dissection the samples were frozen at -80 °C for 24 hours before being lyophilized and digested separately. The digestion was performed by addition of 1.4 ml of HNO₃ (14M, PlasmaPur) and 2 ml of HCl (12M, PlasmaPur) and heating in closed acid cleaned polypropylene digestion tubes on a hotplate during 3 hours at 90°C according to Daskalakis (1996). The digestates were then diluted with milliQ[®] water and analyzed by ICP-MS (Thermo, X Serie II) using an external calibration (standard solution purchased by PLASMACAL, SCP Science). Accuracy and precision of measurements were controlled with certified materials (TORT-2 and IAEA 407) and method blanks analyzed in parallel of each analytical session and were respectively >90% and <5%.

2.4. Historical data on metals in oysters along the French Atlantic coast

Silver and Cu concentration data in wild oysters from 13 sites along the French Atlantic Coast covering the period 2003-2014 was extracted from the Ifremer RNO/ROCCH databank (envlit.ifremer.fr). These 13 sites belong to 5 different French geographical regions from de North to the South (Fig. 3.2): the Morlaix Bay (Pen al Lann), the Brest Bay (Le Passage, Rossermeur, and Aulne sites), the Morbihan Golf (Roguedas and Le Guilvain), the Marennes Oléron Bay (Boyardville, Les Palles, Dagnas, and Mus du Loup), and the Gironde Estuary (Bonne Anse, Pontailac and La Fosse).

The oyster samplings were processed following the OSPAR conventional method (OSPAR, 1992), including a minimum of 10 individuals whole soft bodies per pool and the sampled organisms were aged from ~ 2 years (~ 8 cm length) (Chiffolleau et al., 2005; Daskalakis, 1996).

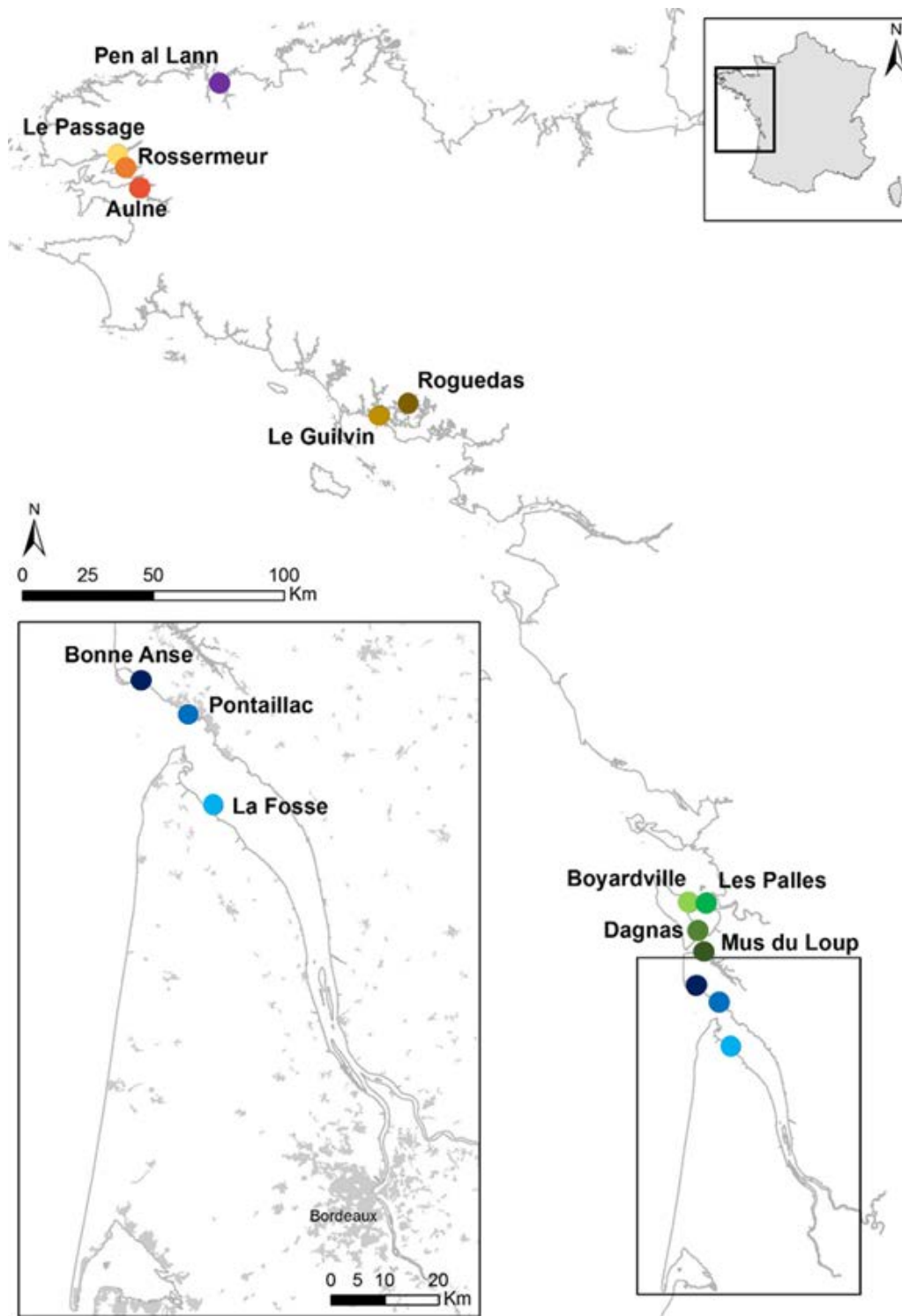


Figure 3.2: Map of oyster sampling sites of the French National Mussel Watch program (RNO/ROCCH) (modified from Mikolaczyk et al., 2015).

2.5. Statistical analyses

The statistical analyses were performed using the SPSS software for the Cu/Ag values. A log10 transformation was performed on the data set, and the normality and homoscedasticity of the

Cu/Ag ratio data were tested. The data were following the normal and homoscedastic distribution excepting for 3 sites: Penn al Lann, Le Passage, and Les Palles. An ANOVA analyses followed by the Tukey post-hoc test were performed on all of the 10 other sites to discriminate the different groups based on their Cu/Ag average values. The results for these 10 sites showed their distribution in 4 different groups (a, b, c, and d). The 3 sites which did not met the normality and homoscedasticity conditions were subjected to a Student T-test, which allowed to compare them to the other sites, and identify their groups. The results are presented in the figure 3.8.

3. Results and discussion

3.1. Silver and Cu concentrations in the whole soft bodies

The concentrations measured in the oysters from the Gironde Estuary (2011 and 2013; Tab. 3.1) were consistent with those provided by the RNO/ROCCH biomonitoring program for the same site (82.6 mg.kg⁻¹Ag and 1370 mg.kg⁻¹Cu for 2011; 50.6 mg.kg⁻¹Ag and 924 mg.kg⁻¹Cu for 2013).

The chemical analyses showed a strong variability of average metal concentrations in the whole soft bodies between individuals inside reconstructed pools (n=15), for both sampling campaigns with relative standard deviations (RSD) varying from 54.7% to 88.4% (Tab. 1). These results are consistent with several previous studies, where authors already described a high within-site variability between organisms (oysters and mussels) sampled at a same time (Gordon et al., 1980; Lobel et al., 1989, 1991; Wright et al., 1985) which could be attributed to a (i) probable difference of metal efflux between individuals (Pan and Wang, 2009) , (ii) different reproductive state especially in gonadal maturation (Frías-Espericueta et al., 1999; Páez-Osuna et al., 1995), or to (iii) genetic-based differences in metal accumulation (Camara et al., 2005; Cross and Rebordinos, 2003). The reported confidence intervals of average concentrations measured in pools of 20 organisms varied from $\pm 5\%$ to $\pm 20\%$ (Daskalakis, 1996). Gordon et al. (1980) conclude that a 10% decrease of the individual variability of metal concentration in mussels (*Mytilus edulis*) would require samples from 50 to 390 individuals, which may not be feasible in routine multi-site Mussel Watch programs. Wright et al. (1985) concluded that samples of 15 individuals were reasonable for oyster pools from the Chesapeake Bay (USA), increasing the number of individuals to 20 for the Swan Point site, where results presented a higher variability. Daskalakis (1996) suggested increasing the number of organisms from 10 or

20 (usually used by the most of biomonitoring programs including the French RNO/ROCCH or the American NOAA) to 50 oysters per pool to improve the statistical significance of their results.

Beyond the statistical robustness impacting biomonitoring programs, these results reflect possible uncertainty in conventional ecotoxicological studies, using a smaller number of individuals due to technical and time constraints caused by the complexity of protocols.

Table 3.1: Ag and Cu concentrations (mg.kg⁻¹) measured in wild oysters (size ~ 8 cm) from the Gironde Estuary (La Fosse site) in 2011 and 2013, and calculated Cu/Ag ratios.

n=15	Date	Min	Max	$\bar{x}$	RSD
La Fosse (This study; n=15)					
Ag (mg.kg ⁻¹)	2011	19.6	159	79.0	54.7%
	2013	0.49	99.1	36.5	87.4%
Cu (mg.kg ⁻¹)	2011	152	1610	789	62.6%
	2013	5.06	1670	692	88.4%
Cu/Ag	2011	4.77	17.7	10.1	40.4%
	2013	7.15	39.9	16.5	45.5%
La Fosse (RNO/ROCCH ; n>10)					
Ag (mg.kg ⁻¹)	2011	-	-	82.6	-
	2013	-	-	50.6	-
Cu (mg.kg ⁻¹)	2011	-	-	1370	-
	2013	-	-	924	-
Cu/Ag	2011	-	-	16.6	-
	2013	-	-	18.3	-

3.2 Organotropism

Similar to whole body concentrations, the distribution of metals in the different tissues showed high inter-individual variability in concentrations measured in 15 Gironde wild oysters. The average relative contributions to whole soft body metal burden were 2±2% in muscle, 19±7% in gills, 22±13% in mantle and 57±16% in digestive gland for Ag, and 5±0.8% in muscle, 30±8% in gills, 33±11% in mantle and 32±5% in digestive gland for Cu. It is noteworthy that

Ag concentrations measured in the digestive glands of these wild oysters reached values up to 300 mg.kg⁻¹ and Cu concentrations reached 6860 mg.kg⁻¹.

Facing the obviously very strong contamination observed in the whole soft oyster bodies compared to results obtained by other biomonitoring programs (1.3 or 2.1 mg.kg⁻¹ Ag and 160 or 120 mg.kg⁻¹ Cu median values for WMW and NS&T programs respectively ; Cantillo, 1998) and the specific accumulation in the digestive glands, and knowing the role of this organ in the metal accumulation processes, these results (Amiard and Amiard-Triquet, 2008; Amiard et al., 2006; Carpene, 1993; Marigómez et al., 2002) conducted to analyze the histological state of these organs.

3.3. Histological status of the digestive glands

When oysters are exposed to high concentrations of Cu, they may sequester Cu in dense homogenous granules also containing sulfur as a route for detoxication (Brown, 1982). The accumulation of other chalcophilic elements like Ag is conceivable. This mechanism may induce high metal concentrations in tissues without noticeable effect on the health status of oysters. Observation of tissue integrity represents an effective method to investigate the impact of high Ag and Cu concentrations in La Fosse oysters.

Comparing the histological observations made on digestive glands of oysters from the La Fosse and Murueta sites showed a clear difference in the digestive epithelium structure revealing several histopathological damages in La Fosse oysters (Fig 3.3 A) compared to Murueta oysters (Fig 3.2 B). The main histopathological alterations observed in the micrographs were i) a lowered epithelium thickness and consequently an enlarged tubule lumen, and ii) an apparently increased area of connective tissue surrounding the tubules actually corresponding to a reduced number of tubules (Fig. 3.3). These structural changes in the morphology of tubules and in the integrity of the digestive gland have been used as an indicative of bad health status due to the presence of environmental stressors including metals (Vega et al 1989; Soto et al., 2002).

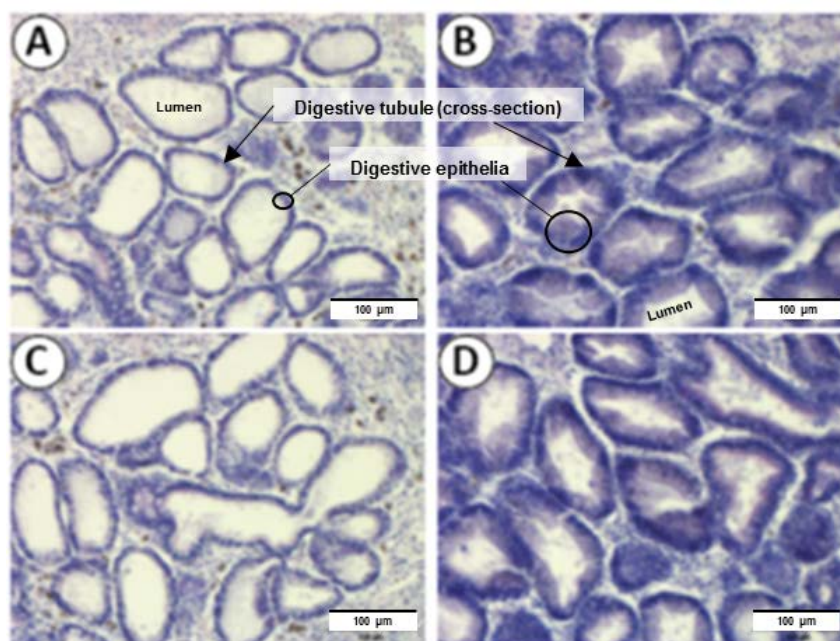


Figure 3.3: Micrographs of the digestive glands of oysters sampled in the La Fosse (A and C) and Murueta (B and D) sites in November 2011 (hematoxylin-eosin staining).

Micrographs after autometallography staining of oysters tissues from both sampling sites showed a high staining intensity around the digestive epithelium (Fig. 3.4, A and C) compared to the connective tissue (Fig. 3.4, B and D) locating metal accumulation. A clear difference occurred between staining intensity in La Fosse oysters (Fig. 3.4, A and B) compared to Murueta oysters (Fig. 3.4, C and D) and go along with highest Ag and Cu accumulation in La Fosse oysters. Thus, previous tissue alterations showed in the digestive gland of La Fosse oysters (Fig 3.3) were related to metal accumulation (Fig 3.4).

Furthermore, La Fosse oysters revealed a higher amount of hemocytes, also named brown cells, in La Fosse oysters (Fig 3.3), typical of metal exposure (Marigómez et al., 2002). Autometallography staining confirmed metal accumulation in hemocytes of La Fosse oysters (Fig 3.4 B) and in a less extent in hemocytes of Murueta oyster (Fig 3.4 D).

Similar alterations have been observed in oysters experimentally exposed to Cd (Gold-Bouchot et al., 1995) and to metal exposed mussels (Wedderburn et al., 2000) or periwinkles (Vega et al., 1989). In microcosm experiments exposing uncontaminated oysters from an oyster farm in the Basque Country to environmentally relevant concentrations of Cu and Ag, such alterations occurred after only 28 days of exposure although metal concentrations in the oyster tissues were nearly unchanged, i.e. much lower than those measured in wild Gironde Estuary oysters (Mikolaczyk et al., 2015; Rementeria et al., In press). This suggests that Ag and/or Cu in

moderately contaminated estuaries and bays may rapidly provoke histopathological alterations in oysters.

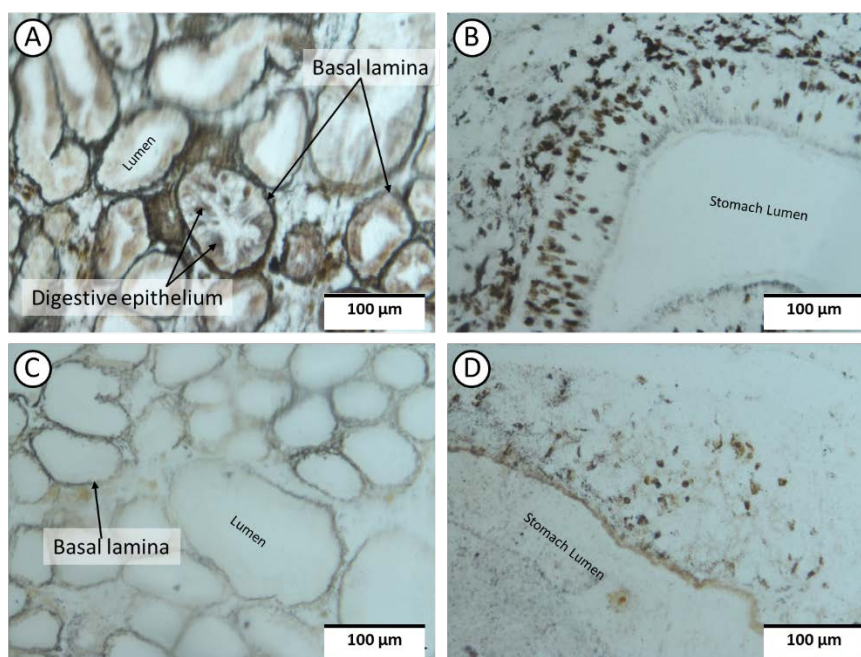


Figure 3.4: Autometallographical localization of metals in the digestive gland (A and C) and connective tissue (B and D) of oysters sampled in the La Fosse (A and B) and Murueta (C and D) sites in November 2011. Note the presence of metals as black silver deposits in the basal lamina of the epithelium of digestive tubules (A and C) and in the digestive cell lysosomes (A) and in the hemocytes (immune system cells) of the connective tissue close to the stomach (B and D).

The obvious alteration of the digestive gland structure of La Fosse oysters probably induced a reduced digestion efficiency (Jing et al., 2006; Pipe et al., 1999) and may negatively impact the energy budget, from the quantity of energy required for digestion to insufficient energy storage. Therefore, further studies on the energy reserves of wild oysters from La Fosse and energy allocation strategy (e.g. detoxication, growth, reproduction) are needed to better constrain the impact of metal exposure on La Fosse oysters health. In summary, in this study, histopathological alterations were relevant tissue level biomarkers to assess the health status of oysters exposed to metals.

3.4. Condition index

The condition index (CI = dry weight/ intervalvular volume ; Lawrence and Scott, 1982) is used to determine the health status of studied organisms. The CI calculated for oysters from Gironde Estuary was affected (< 50) for oysters presenting concentration beyond 100 mg.kg⁻¹ of Ag and

1000 mg.kg⁻¹ of Cu. This observation tends to confirm the biological stress and physiological cost impacting organisms which were subjected to an acute chronic exposure to metallic contaminants (Marchand et al., 2004).

3.5. Biomonitoring program message on Ag and Cu geographical pressures

Some of the strengths of regular biomonitoring (Mussel watch) in national observation programs lie in their temporal and geographical coverage. Based on the chemical and histopathological results obtained for recent Gironde wild oysters, we have analyzed and compared a time series (2003-2014) of Ag and Cu data in oysters from 13 sites along the French Atlantic coast, including the Gironde Estuary (RNO-ROCCH; Fig. 3.5 and 3.6; Tab. 2).

The data set presents a large range of concentrations for both metals, from 1.52 mg.kg⁻¹ to 114 mg.kg⁻¹ and from 32.8 mg.kg⁻¹ to 2210 for Ag and Cu respectively (Fig. 3.5). The “Penn al Lann” and “Le Guilvain” sites present the lowest concentration values (<4.79 mg.kg⁻¹ for Ag and <47.3 mg.kg⁻¹ for Cu) for both metals, and the “La Fosse” and “Pontaillac” sites present the highest values far ahead of the rest of the sites presenting intermediate concentrations.

The results show a generally good correlation between Ag and Cu accumulation in pooled ($n > 10$) whole soft body samples (correlation coefficient $0.80 < R^2 < 0.99$; 0.77 in Le Passage site) in oyster pools from a same site (except for the “Aulne” site where Ag seems more accumulated) (Fig.3.5). This suggests that in wild oysters bioaccumulation of these two metals is to some extent proportional, despite the huge differences in absolute concentrations measured in the different sites (Fig 3.5).

These findings are consistent with previous studies exposing oysters to Ag and Cu under experimental conditions (Amiard et al., 2004; Ettajani et al., 1992a), reporting synergic effects of Cu exposure on Ag bioaccumulation or antagonism of Ag exposure to Cu bioaccumulation (Amiard et al., 2004; Ettajani et al., 1992a). The authors explained these effects by biochemical competitions between Ag and Cu and/or parallels in physiological processes controlling uptake and detoxification. Metalloproteins such as metallothioneins (MT) play a major role in the modulation of metal accumulation and detoxification processes in oysters (Carpene, 1993). The competition for their binding sites (thiols) could explain the observed metal-metal interactions (Ray et al., 1980).

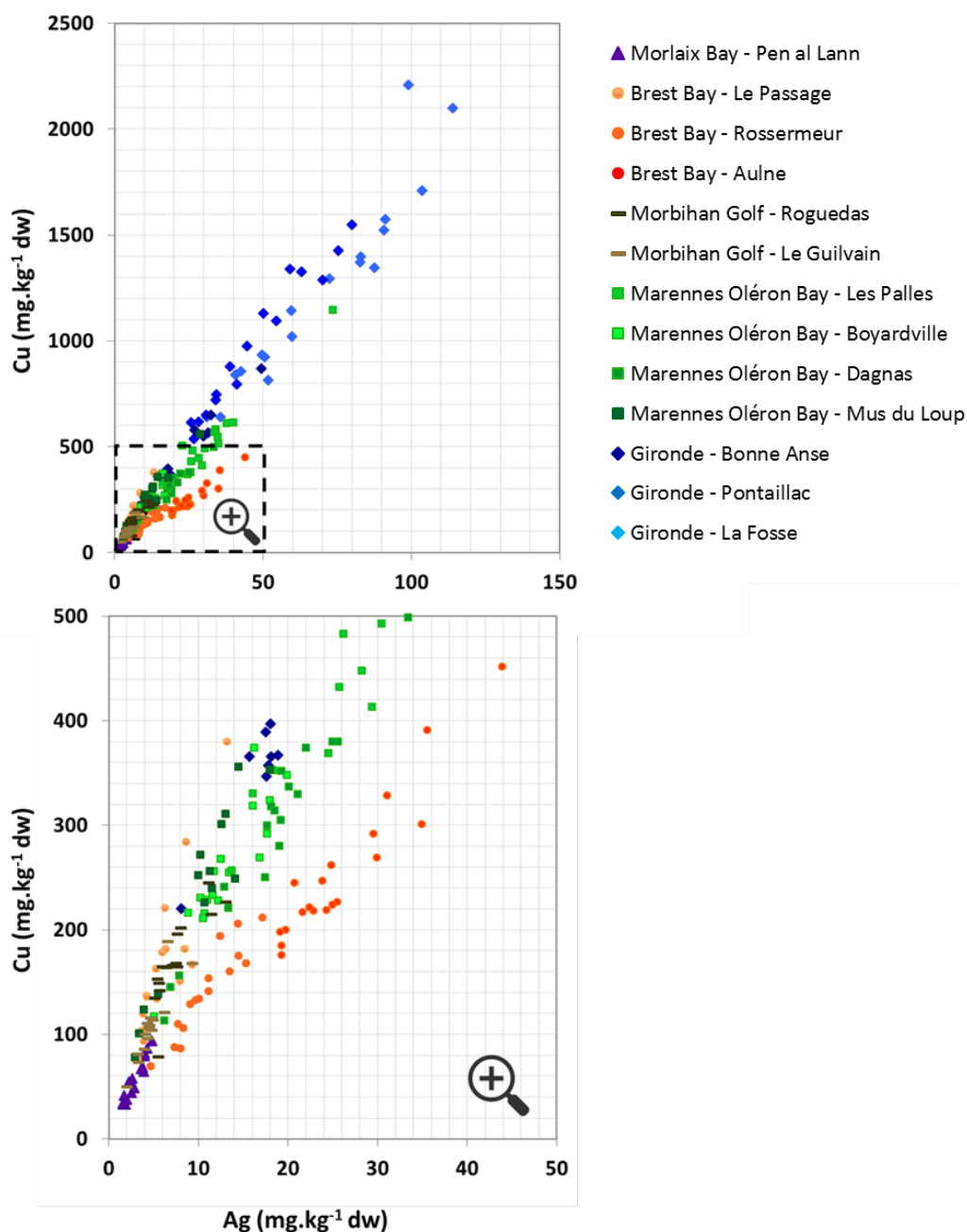


Figure 3.5: Copper concentrations over Ag concentrations in wild oyster soft body pools from the French Atlantic coast (2003-2014 data; RNO/ROCCH; Ifremer-envlit)

The proportionality in Ag and Cu accumulation observed at the different sites implies the existence of distinct Cu/Ag concentration ratios. However, the slopes may differ between sites (Fig. 3.5), suggesting that physiological regulation is not the only control on Ag and Cu uptake by oysters, i.e. other environmental factors including metal exposure may affect the Cu/Ag ratio in oysters. The Cu/Ag in oysters from most of the sites along the French Atlantic coast generally are in the range of 15-25, whatever the absolute concentrations of each metal, except for the set of three Bay of Brest sites, where Cu/Ag ratios as low as 8.6 (Aulne site) and up to 35 (Le

Passage site) cover a much wider range (Tab. 2). However, within each individual site, Cu/Ag variation over time is rather low. At all sites along the French Atlantic coast, Cu/Ag variations are clearly lower than that of the respective absolute metal concentrations (Table 2).

Table 3.2: Minimum and maximum Ag and Cu concentrations (mg.kg⁻¹) and calculated Cu/Ag ratios (* values updated from Mikolaczyk et al., 2015) in oyster pools (n > 10) from the French Atlantic coast (2003-2014 data from RNO/ROCCH).

Sampling sites		Ag		Cu		Cu/Ag		
		Min	Max	Min	Max	Min	Max	Mean *
Morlaix Bay	Pen al Lann	1.52	4.79	32.8	93.9	16.5	25.0	19.9 ± 2.46
Brest Bay	Le Passage	3.19	13.2	77.0	380	17.9	35.3	27.6 ± 4.96
	Rossermeur	4.66	17.1	69.3	212	10.9	15.6	13.1 ± 1.39
	Aulne	19.1	43.9	176	452	8.62	11.8	9.88 ± 0.83
Morbihan Golf	Roguedas	5.13	13.0	78.9	245	14.3	27.7	22.7 ± 3.41
	Le Guilvain	1.97	9.31	50.0	189	18.0	25.4	22.7 ± 2.12
Marennes Oléron Bay	Boyardville	5.03	19.9	117	374	16.0	24.4	20.2 ± 2.41
	Les Palles	13.7	73.4	257	1150	14.0	22.3	17.0 ± 2.19
	Dagnas	6.15	33.4	113	499	14.4	21.1	16.9 ± 1.86
	Mus du Loup	2.94	28.8	78.0	559	17.7	32.0	24.0 ± 3.79
Gironde Estuary	La Fosse	31.1	114	639	2210	15.4	22.3	18.1 ± 1.86
	Pontailac	25.7	80.0	539	1550	18.4	24.9	21.1 ± 1.56
	Bonne Anse	8.09	49.5	220	870	16.6	27.2	21.1 ± 2.60

The above observations suggest that the use of Cu/Ag ratios in combination with the respective absolute metal concentrations may provide additional insights when analyzing data from biomonitoring (Mussel Watch) programs in terms of temporal and spatial information.

3.6. Temporal aspect: long-term scale evolution of measured concentrations

Long-term data (e.g. for the La Fosse site oysters; Fig. 3.6) obtained from bivalve biomonitoring generally show strong seasonal fluctuations in metal concentrations, mainly due to weight gains/losses during the reproduction cycle caused by the different development stages of gonads (Páez-Osuna et al., 1995). As such, concentration data are not directly comparable for oyster populations at different stages of the reproduction cycle at the same site. Therefore, studies on long-term trends of metal accumulation in wild oysters may use only data of winter, corresponding to a distinct reproduction stage (e.g. winter; Lanceleur et al. 2011).

This clearly reduces both the total amount and the temporal resolution of the biomonitoring data available for this purpose and may bias the comparison between sites where reproduction cycles are not in phase with the sampling dates (e.g. due to geographical position). Because the Cu/Ag ratios do not seem to vary with seasonal reproduction cycles (Fig. 3.6), they could be of interest to increase the number of data points in long-term series.

After 2008, the decrease of the sampling frequency in the Mussel watch program to 1 sampling per year allowed to avoid the seasonal variability in Cu and Ag concentrations resulting in a smoothed curve for both metals.

From this time the variations observed on concentration curves can be attributed to the changes in accumulated metals amounts, suggesting variations of the environmental pressure with a generally increasing trend until 2014. As observed previously in this study, concentrations measured in oysters over time confirmed co-variation of the two studied metals suggesting their co-accumulation, which partly explains the general stability of the Cu/Ag ratio. Since 2012, the measurements (91.3 mg.kg⁻¹ for Ag and 1570 mg.kg⁻¹ for Cu) confirmed the increasing tendency already shown by Lanceleur et al., (2011b) for Ag concentrations (87.5 mg.kg⁻¹). For this period, the Cu/Ag ratio stays stable over time (Fig. 3.6). The strong and punctual decrease of concentrations measured in oysters in 2013 (50.6 mg.kg⁻¹ for Ag and 924 mg.kg⁻¹ for Cu) is hardly attributable to a change in environmental pressure facing the following concentrations measured in 2014 (114 mg.kg⁻¹ for Ag and 2100 mg.kg⁻¹ for Cu), and could be related to an early gonad development, a change of sampling site, or an analytical artefact. Given that the Cu/Ag elementary ratio did not change despite clear concentration changes at the mid-time scale, these results for the La Fosse site illustrate well the necessity to work with absolute concentrations to monitor the changes of environmental pressure (Fig. 3.6).

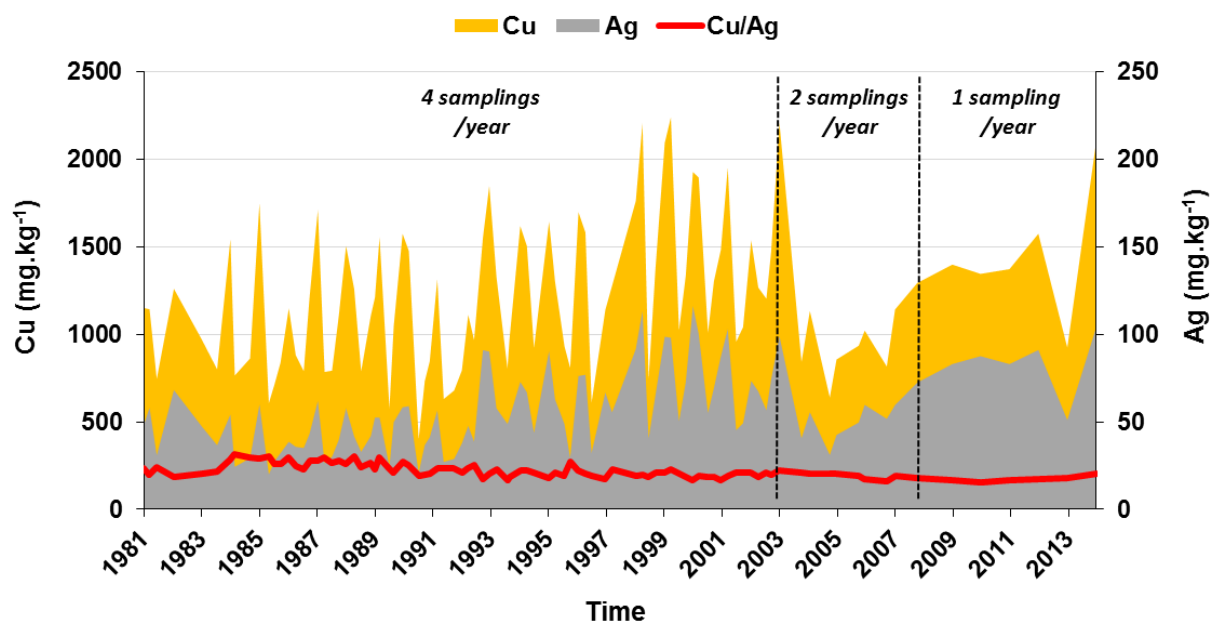


Figure 3.6: Copper (mg.kg^{-1}) and Ag (mg.kg^{-1}) concentration data over time (1981-2014 period) measured in oyster pools from La Fosse site (Gironde Estuary) provided by the RNO/ROCCH program. The sampling frequency was 4 times per year from 1981 to 2002, twice a year from 2003 to 2007 and once a year since 2008. Note that the decrease in the sampling frequency in the Mussel watch program from 4 to 1 sampling per year has masked the seasonal variability in Cu and Ag concentrations resulting in a smoothed curve for the two metals.

Even if the use of Cu/Ag ratios induces a loss of sensitivity in mid-term trends (few years), trends may exist and be informative (Fig. 3.7) for comparison between sites inside specific geographical areas (Fig. 3.7-B). Indeed, the Cu/Ag ratio variations over time tend to decrease between 1981 and 2014 in Gironde Estuary oysters (Fig 3.7-A) suggesting a gradual change in the Cu and Ag pressure in the estuarine waters. Conversely, the tendency of this elementary ratio to increase over time (2003-2014) for the Le Passage site in the Brest Bay (Fig. 3.7-B) could reflect an increasing Cu pressure during the concerned period, potentially attributed to the increasing use of Cu-based antifouling paints since the ban of TBT (Pouget et al., 2014). The potential use of such element ratios in combination with absolute concentrations for the identification of temporal (mid- to long-term) trends needs further investigation.

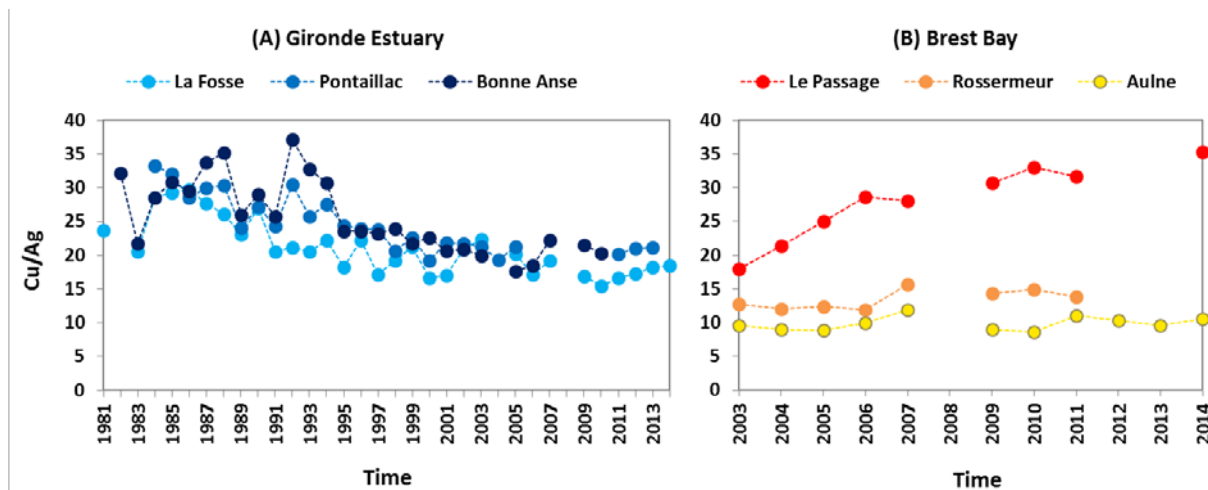


Figure 3.7: Variations of Cu/Ag ratios over time measured in oyster pools from the Gironde Estuary and the Brest Bay provided by the RNO/ROCCH program.

3.7. Spatial aspect: geographical specificities of Ag and Cu bioaccumulation

The plot of Cu/Ag concentration ratios over the respective metal concentrations in oysters from the various sites clearly shows groups of data points reflecting different geographic areas and, thus, most likely oyster exposure to environmental conditions including the presence of Cu and Ag (Fig. 3.8).

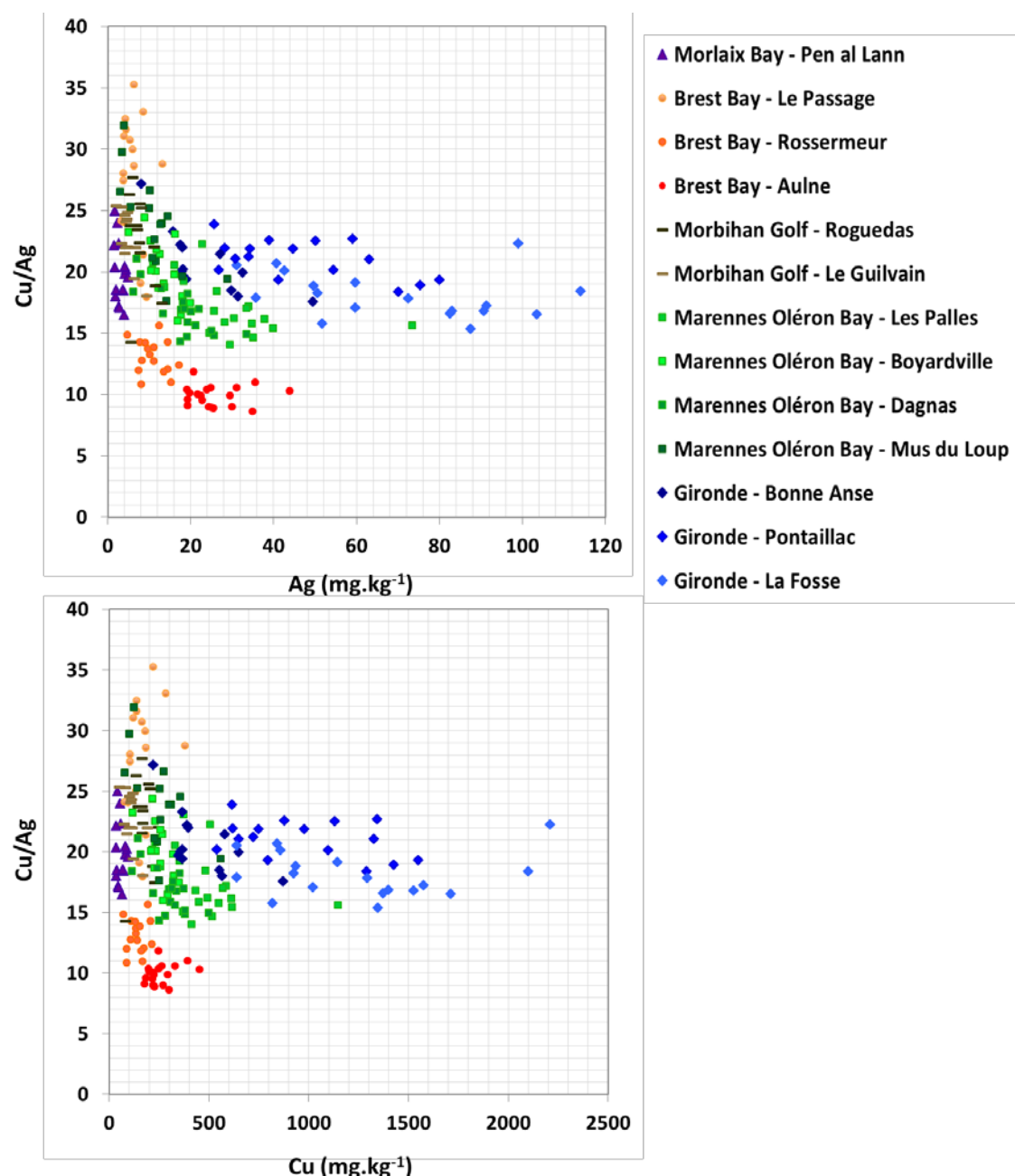


Figure 3.8: Cu/Ag concentration data in terms of Ag and Cu concentration data from oyster pools provided by the RNO/ROCCH program for the 2003-2014 period.

The strongest differences in Cu/Ag within a given geographical area occurred in the three sites of the Brest Bay, although Cu and, to a lesser extent, Ag concentrations in wild oysters vary in relatively narrow ranges (Fig. 3.8). In contrast, the Cu/Ag ratios show distinct values for each site in the Brest Bay, with only small overlaps.

In fact, the “Aulne” site has the lowest Cu/Ag values (from 8.6 to 11.8), followed by the “Rossermeur” site (from 10.9 to 15.6) and the “Le Passage” site where the ratios are the highest of all sites studied (Fig. 3.8; Tab. 2). The low Cu/Ag ratios in the “Aulne” site oysters can be

explained by the high Ag concentrations measured in this site (19.1 to 43.3 mg.kg⁻¹), which are 3 to 5 times higher than those in the two other Brest Bay sites. This local silver contamination is probably due to inputs by the Aulne River, originating from former Ag, Zn and Pb mining areas in the Argent River watershed upstream from the junction with the Hyères River (Fig. 3.9). In fact, the abandoned mining sites of Hoelgoat and Poullaouen (ore extractions stopped in 1934) have been identified as the main Ag sources to the Brest Bay, with Ag concentrations in surface waters reaching 10 µg.L⁻¹ (Lemière et al., 2002). The data points for the Rossermeur site show values lower than the general range, observed for the majority of the studied sites along the French Atlantic coast. Although being clearly separated from those of the Aulne site, the graphical representation suggests that the oysters at the Rossermeur site may, to some extent, be influenced by Aulne River inputs. (Fig. 3.8). At the Le Passage site, the most marine sites along the land-ocean continuum in the Brest Bay, Cu/Ag ratios are clearly higher than for all the other sites, probably due to strong dilution of Aulne River Ag inputs, resulting in low Ag concentrations combined with intermediate Cu concentrations. In fact, the absolute Cu concentrations in wild oysters from the Le Passage site alone would not point to any particular situation at this site, in contrast to the very high Cu/Ag ratio. The strong difference in Cu/Ag, compared to the Rossermeur site, suggests exposure of wild oysters to additional and/or easily bioavailable Cu. Two possible local anthropogenic Cu sources, are the presence of a military harbor near to the Le Passage site and pig farming activities around the Brest Bay area. After the near collapse of oyster farming in the Arcachon Bay and multiple ecological damages (e.g. gasteropod imposex; Alzieu, 1998) due to the toxicity of tributyltin (TBT)-based antifouling paints (Alzieu et al., 1986; Michel and Averty, 1999), TBT use has successively been banned from such paints from 1982 through 2003 (OMI, 2001) and has been replaced with other efficient biocides, such as Cu or Zn compounds. Copper based antifouling paints, extremely efficient due to their toxicity to phytoplankton and other marine organisms (Katrantsas et al., 2003), are massively used (Srinivasan and Swain, 2007; Turner, 2010). The presence of a major French military harbor in the Brest Bay close to the Le Passage site seems to be the most likely explanation for the presence of highly bioavailable Cu in this area. However, we cannot rule out pig farming, a known substantial Cu contamination source along the Brittany Coast (Arzul and Maguer, 1990; Maguer, 1990). If more work is necessary to clearly identify the respective contribution and processes, the application of Cu/Ag ratios to the long-term multi-site bioaccumulation data of the Mussel watch has provided the possibility to

discriminate different exposures of wild oysters at the three Brest Bay sites, which would not have been possible from absolute concentrations alone.

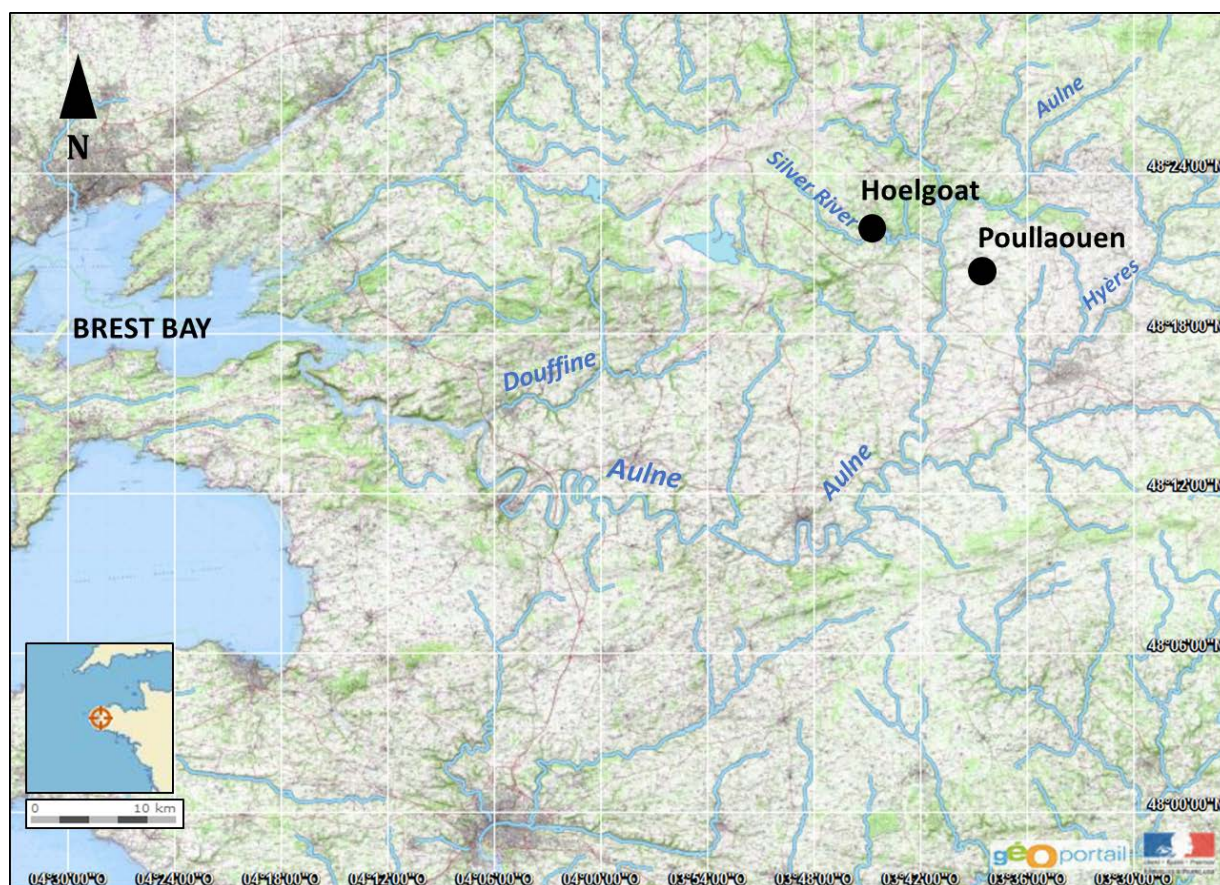


Figure 3.9: Map of the main Aulne River tributaries

In the Gironde Estuary sites, Cu and Ag clearly show the highest absolute values and the widest range of concentrations of all sites of the Mussel watch program. This pattern reflects that of Cd, that has allowed identifying a major metal pollution since the in the early years of the program (1979), resulting in ongoing prohibition of oyster farming in this estuary, due to Cd contamination (Boutier, 1981; Boutier et al., 1989; Lanceleur et al., 2011b). Multiple and changing Ag and Cu sources in the watershed including former metal industry, urban effluents and agriculture may explain high Ag and Cu in wild oysters (Audry et al., 2004a ; Dabrin et al., 2009 ; Lanceleur et al., 2011b). Apart from classical applications (e.g. electronics, physics, photography, biocides, cloud-seeding; Chang et al., 2005; Lanceleur et al., 2011; Zhou et al., 2006), the contribution of the emerging use of new nano-technologies in domestic products to contamination in estuarine wild oysters needs more investigation. Despite the wide Cu and Ag concentration ranges and in contrast to the Brest Bay sites, the Gironde Estuary wild oysters

show a relatively stable Cu/Ag, close to those of most of the other monitored sites (from 15.4 to 27.2; Tab. 2). The average Cu/Ag ratios in the Gironde and Marennes-Oléron sites tend to increase with increasing distance from the supposed continental sources, reflecting to some extent the dissolved Cu/Ag ratios expected in the estuary mouth, due to the typical bell-shaped dissolved Ag distribution along estuarine salinity gradients (e.g. Lanceleur et al., 2013). It is important to note that both, absolute metal concentrations and Cu/Ag variations measured in oyster tissues may not be proportional to the pressure appearing in the water. Systematic measurements of dissolved Cu and Ag in parallel with oyster samplings at multiple sites would allow refining the evaluation of the bioaccumulation response of wild oysters and the potential of Cu/Ag ratio as a tool for environmental assessment.

Another explanation for the observed very high metal concentrations observed in the Gironde Estuary could consist in a metabolic dysfunction caused by the acute chronic exposure to numerous contaminants, potentially affecting the subcellular metal distribution and the organism's ability to detoxification without affecting its survival (Wang et al., 2011). Although the resistance to metal stress as well as individual genetic variability appear to explain the bioaccumulation differences observed in the natural environment, the exact mechanisms involved still need more investigations.

Based on the RNO/ROCCH database (2003-2014 period) an ANOVA test was performed on Cu/Ag values to explore the potential of Cu/Ag for site discrimination (Fig. 3.10). The results distributed the 13 studied sites in 4 groups according to their Cu/Ag values, confirming a clear discrimination between the Aulne and Le Passage sites, which belong to distinct groups of Cu/Ag (respectively groups a and d).

The Rossermeur site appears in the group b but seems to be closer to the Aulne site sharing the group a. The three sites from the Gironde Estuary belong to the same groups (c and d), which seems to confirm the homogeneity of their Cu/Ag ratios. Overall, the results do not show any distinction between the regions at the national scale.

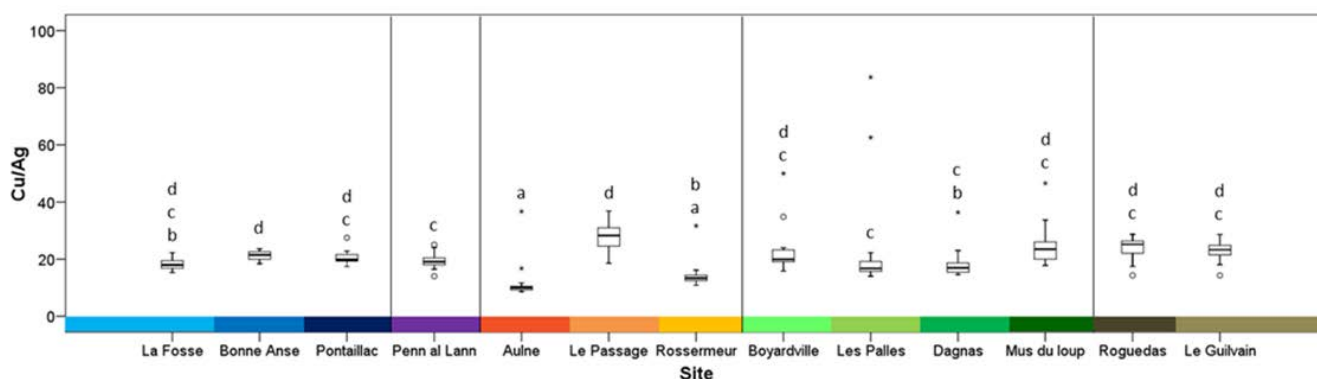


Figure 3.10: ANOVA test on Cu/Ag values (2003-2014) for each studied sites along the French Atlantic Coast.

4. Conclusion

Facing the widespread biomonitoring programs in response to a growing need for assessment of the aquatic environments quality in a context of global changes, it seems important to improve the message provided by this kind of method.

Based on analyses of wild oysters collected in two different European estuaries (Gironde and Urdaibai), and the data base analyses of the French Mussel Watch program (RNO/ROCCH), this work contributed to improve the understanding of the different variables implementing the message interpretation of data provided by biomonitoring programs. Oysters from the Gironde estuary suffer from a high polymetallic contamination, as evidenced by measured concentrations and the acute histopathological damages on digestive glands observed in this study. This kind of alteration inducing an important energy cost can impact the ability of these organisms to bioaccumulate metals. The individual, specific, and populational variabilities in the expression of these biomarkers make the comparison difficult between different sites. The histopathological damages on oysters need further investigations to (i) compare the biomarker development between wild and farmed oysters, generally used for intense oyster farming (e.g. Marennes Oléron Bay, Brest Bay), and (ii) improve the knowledge on biomarkers to allow their integration to biomonitoring protocols.

The concentration data provided by the RNO/ROCCH program are essential for metal pressure assessment along the French Coast. However, the variabilities existing between different populations of a same oyster species, related to the various adaptive strategies of these populations, constitute an obstacle for comparisons at a global scale. If the parameters inherent in organisms are taken into account, the Cu/Ag elementary ratio appears to be an interesting tool for the identification of additional local sources, allowing comparisons between sites inside

specific geographical regions. It provides additional information on some site-specific exposure sources, which was not accessible from absolute concentrations alone. Therefore, the use of element ratios may provide complementary additional information in biomonitoring, and this method should be extended to other element couples.

Acknowledgements

The authors want to thank the IFREMER institute, Teba Gil Diaz, and Melina Abdou. This work was founded by le FEDER Aquitaine, “La Région Aquitaine”, the French National Research Agency (ANR-07-VULN-003) and the “Agence de l’Eau Adour-Garonne”.

References

- Alzieu, C. (1998). Tributyltin: case study of a chronic contaminant in the coastal environment. *Ocean Coast. Manag.* **40**, 23–36.
- Alzieu, C.L., Sanjuan, J., Deltreil, J.P., and Borel, M. (1986). Tin contamination in Arcachon Bay: Effects on oyster shell anomalies. *Mar. Pollut. Bull.* **17**, 494–498.
- Amiard, J.-C., and Amiard-Triquet, C. (2008). Les biomarqueurs dans l’évaluation de l’état écologique des milieux aquatiques (Lavoisier).
- Amiard, J.-C., Perrein-Ettajani, H., Gérard, A., Baud, J.P., and Amiard-Triquet, C. (2004). Influence of Ploidy and Metal–Metal Interactions on the Accumulation of Ag, Cd, and Cu in Oysters *Crassostrea Gigas* Thunberg. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* **48**, 68–74.
- Amiard, J.-C., Amiard-Triquet, C., Barka, S., Pellerin, J., and Rainbow, P.S. (2006). Metallothioneins in aquatic invertebrates: Their role in metal detoxification and their use as biomarkers. *Aquat. Toxicol.* **76**, 160–202.
- Amiard-Triquet, C., Berthet, B., and Martoja, R. (1991). Influence of salinity on trace metal (Cu, Zn, Ag) accumulation at the molecular, cellular and organism level in the oyster *Crassostrea gigas*. *Biol. Met.* **4**, 144–150.
- Arzul, G., and Maguer, J.-F. (1990). Influence of pig farming on the copper content of estuarine sediments in Brittany, France. *Mar. Pollut. Bull.* **21**, 431–434.
- Audry, S., Schäfer, J., Blanc, G., Bossy, C., and Lavaux, G. (2004a). Anthropogenic components of heavy metal (Cd, Zn, Cu, Pb) budgets in the Lot-Garonne fluvial system (France). *Appl. Geochem.* **19**, 769–786.
- Audry, S., Schäfer, J., Blanc, G., and Jouanneau, J.-M. (2004b). Fifty-year sedimentary record of heavy metal pollution (Cd, Zn, Cu, Pb) in the Lot River reservoirs (France). *Environ. Pollut.* **132**, 413–426.
- Baudrimont, M., Andrès, S., Metivaud, J., Lapaquellerie, Y., Ribeyre, F., Maillet, N., Latouche, C., and 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.
- Boutier, B. (1981). Synthèse des résultats de la surveillance des micropolluants dans la matière vivante en 1979.
- Boutier, B., Chiffolleau, J.-F., Jouanneau, J.-M., Latouche, C., and Philipps, I. (1989). La contamination de la Gironde par le cadmium : origine, extension, importance.
- Bova, F. (2011). Les filières pêches et aquaculture (Montreuil-sous-Bois: France Agrimer).

- Brown, B.E. (1982). The form and function of metal - containing "granules" in invertebrate tissues. *Biol. Rev.* 57, 621–667.
- Brown, D.A., and Parsons, T.R. (1978). Relationship between cytoplasmic distribution of mercury and toxic effects to zooplankton and chum salmon (*Oncorhynchus keta*) exposed to mercury in a controlled ecosystem. *J. Fish. Res. Board Can.* 35, 880–884.
- Camara, M.D., Griffith, S.M., and Evans, S. (2005). Can selective breeding reduce the heavy metals content of pacific oysters (*Crassostrea gigas*), and are there trade-offs with growth or survival? *J. Shellfish Res.* 24, 979–986.
- Cantillo, A.. (1998). Comparison of results of Mussel Watch Programs of the United States and France with Worldwide Mussel Watch Studies. *Mar. Pollut. Bull.* 36, 712–717.
- Carpene, E. (1993). Metallothionein in marine molluscs. In *Ecotoxicology of Metals in Invertebrates*, pp. 55–72.
- Chang, H., Jwo, C., Lo, C., Tsung, T., Kao, M., and Lin, H. (2005). Rheology of CuO nanoparticle suspension prepared by ASNSS. *Rev Adv Mater Sci* 10, 128–132.
- Chiffolleau, J.-F., Auger, D., Roux, N., Rozuel, E., and Santini, A. (2005). Distribution of silver in mussels and oysters along the French coasts: Data from the national monitoring program. *Mar. Pollut. Bull.* 50, 1719–1723.
- Claissse, D. (1989). Chemical contamination of French coasts: the results of a ten years mussel watch. *Mar. Pollut. Bull.* 20, 523–528.
- Couillard, Y., Campbell, P.G.C., Auclair, J.G., and Pellerin-Massicotte, J. (1995). Field transplantation of a freshwater bivalve, *Pyganodon grandis*, across a metal contamination gradient. II. Metallothionein response to Cd and Zn exposure, evidence for cytotoxicity, and links to effects at higher levels of biological organization. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 52, 703–715.
- Cross, I., and Rebordinos, L. (2003). Effect of marine contamination on the genetic population structure of the bivalve *Crassostrea angulata*. *Cienc. Mar.* 29, 239–250.
- Dabrin, A., Schäfer, J., Blanc, G., Strady, E., Masson, M., Bossy, C., Castelle, S., Girardot, N., and Coynel, A. (2009). Improving estuarine net flux estimates for dissolved cadmium export at the annual timescale: Application to the Gironde Estuary. *Estuar. Coast. Shelf Sci.* 84, 429–439.
- Daskalakis, K.D. (1996). Variability of metal concentrations in oyster tissue and implications to biomonitoring. *Mar. Pollut. Bull.* 32, 794–801.
- De Lafontaine, Y., Gagné, F., Blaise, C., Costan, G., Gagnon, P., and Chan, H.M. (2000). Biomarkers in zebra mussels (*Dreissena polymorpha*) for the assessment and monitoring of water quality of the St Lawrence River (Canada). *Aquat. Toxicol.* 50, 51–71.
- EPA (2016). US Environmental Protection Agency.
- Ettajani, H., Amiard-Triquet, C., and Amiard, J.-C. (1992). Etude expérimentale du transfert de deux éléments traces (Ag, Cu) dans une chaîne trophique marine: Eau - Particules (sédiment naturel, microalgue) - Mollusques filtreurs (*Crassostrea gigas* Thunberg). *Water. Air. Soil Pollut.* 65, 215–236.
- Frías-Espericueta, M.G., Osuna-López, J.I., and Páez-Osuna, F. (1999). Gonadal maturation and trace metals in the mangrove oyster *Crassostrea corteziensis*: seasonal variation. *Sci. Total Environ.* 231, 115–123.
- Géret, F. (2002). Influence of metal exposure on metallothionein synthesis and lipid peroxidation in two bivalve mollusks: the oyster (*Crassostrea gigas*) and the mussel (*Mytilus edulis*). *Aquat. Living Resour.* 15, 61–66.
- Goldberg, E.D., Bowen, V.T., Farrington, J.W., Harvey, G., Martin, J.H., Parker, P.L., Risebrough, R.W., Robertson, W.,

- Schneider, E., and Gamble, E. (1978). The Mussel Watch. *Environ. Conserv.* 5, 101–125.
- Gold-Bouchot, G., Simá-Alvarez, R., Zapata-Pérez, O., and Güemez-Ricalde, J. (1995). Histopathological effects of petroleum hydrocarbons and heavy metals on the American oyster (*Crassostrea virginica*) from Tabasco, Mexico. *Mar. Pollut. Bull.* 31, 439–445.
- Gordon, M., Knauer, G.A., and Martin, J.H. (1980). *Mytilus californianus* as a bioindicator of trace metal pollution: Variability and statistical considerations. *Mar. Pollut. Bull.* 11, 195–198.
- Ifremer - envlit Ifremer - envlit / Accès aux données.
- Jing, G., Li, Y., Xie, L., and Zhang, R. (2006). Metal accumulation and enzyme activities in gills and digestive gland of pearl oyster (*Pinctada fucata*) exposed to copper. *Comp. Biochem. Physiol. Part C Toxicol. Pharmacol.* 144, 184–190.
- Katranitsas, A., Castritsi-Catharios, J., and Persoone, G. (2003). The effects of a copper-based antifouling paint on mortality and enzymatic activity of a non-target marine organism. *Mar. Pollut. Bull.* 46, 1491–1494.
- Kim, Y., Powell, E.N., Wade, T.L., and Presley, B.J. (2008). Relationship of parasites and pathologies to contaminant body burden in sentinel bivalves: NOAA Status and Trends “Mussel Watch” Program. *Mar. Environ. Res.* 65, 101–127.
- Lanceleur, L., Schäfer, J., Chiffolleau, J.-F., Blanc, G., Auger, D., Renault, S., Baudrimont, M., and Audry, S. (2011). Long-term records of cadmium and silver contamination in sediments and oysters from the Gironde fluvial–estuarine continuum – Evidence of changing silver sources. *Chemosphere* 85, 1299–1305.
- Lawrence, D.R., and Scott, G.I. (1982). The Determination and Use of Condition Index of Oysters. *Estuaries* 5, 23.
- Lemière, B., Clozel, B., and Charbonnier, P. (2002). Etude de l’origine des pollutions métalliques naurelles du bassin versant de la Rade de Brest.
- Lobel, P.B., Belkhode, S.P., Jackson, S.E., and Longerich, H.P. (1989). A universal method for quantifying and comparing the residual variability of element concentrations in biological tissues using 25 elements in the mussel *Mytilus edulis*. *Mar. Biol.* 102, 513–518.
- Lobel, P.B., Bajdik, C.D., Belkhode, S.P., Jackson, S.E., and Longerich, H.P. (1991). Improved protocol for collecting mussel watch specimens taking into account sex, size, condition, shell shape, and chronological age. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 21, 409–414.
- Maguer, J.-F. (1990). Analyse du cuivre dans les sédiments des estuaires bretons. Relation avec quelques paramètres physicochimiques. Influence de l’élevage porcin.
- Marchand, J., Quiniou, L., Riso, R., Thebaut, M.-T., and Laroche, J. (2004). Physiological cost of tolerance to toxicants in the European flounder *Platichthys flesus*, along the French Atlantic Coast. *Aquat. Toxicol.* 70, 327–343.
- Marigómez, I., Soto, M., Cajaraville, M.P., Angulo, E., and Giamberini, L. (2002). Cellular and subcellular distribution of metals in molluscs. *Microsc. Res. Tech.* 56, 358–392.
- Martoja, R., and Martoja-Pierson, M. (1970). Técnicas de histología animal.
- Mason, A., and Jenkins, K. (1995). Metal detoxification in aquatic organisms. In *Metal Speciation and Bioavailability in Aquatic Systems*, (Chichester: John Wiley & Sons), pp. 479–608.
- Michel, P., and Averty, B. (1999). Contamination of French Coastal Waters by Organotin Compounds: 1997 Update. *Mar. Pollut. Bull.* 38, 268–275.
- Mikolaczyk, M., Rementeria, A., Lanceleur, L., Schäfer, J., Petit, J.C., Zaldibar, B., Chiffolleau, J.-F., Soto, M., Marigomez, I., and Blanc, G. (2015). Silver and copper

- bioaccumulation kinetics in oyster *Crassostrea gigas* tissues at environmentally relevant exposure levels using stable isotope spikes. *Estuar. Coast. Shelf Sci.*
- OMI (2001). Convention internationale sur le contrôle des systèmes antisalissure nuisibles sur les navires.
- OSPAR (1992). JAMP Guidelines for Monitoring Contaminants in Biota. Ospar Commission Monitoring Guidelines. Ref 1992-2.
- Páez-Osuna, F., Frías-Espericueta, M.G., and Osuna-López, J.I. (1995). Trace metal concentrations in relation to season and gonadal maturation in the oyster *Crassostrea iridescens*. *Mar. Environ. Res.* 40, 19–31.
- Pan, K., and Wang, W.-X. (2009). Biodynamics To Explain the Difference of Copper Body Concentrations in Five Marine Bivalve Species. *Environ. Sci. Technol.* 43, 2137–2143.
- Pipe, R., Coles, J., Carissan, F.M., and Ramanathan, K. (1999). Copper induced immunomodulation in the marine mussel, *Mytilus edulis*. *Aquat. Toxicol.* 46, 43–54.
- Raposo, J.C., Bartolomé, L., Cortazar, E., Arana, G., Zabaljauregui, M., de Diego, A., Zuloaga, O., Madariaga, J.M., and Etxebarria, N. (2009). Trace Metals in Oysters, *Crassostrea* spp., from UNESCO Protected Natural Reserve of Urdaibai: Space-Time Observations and Source Identification. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 83, 223–229.
- Ray, S., McLeese, D.W., Waiwood, B.A., and Pezzack, D. (1980). The disposition of cadmium and zinc in *Pandalus montagui*. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 9, 675–681.
- Reinecke, S.A., Prinsloo, M.W., and Reinecke, A.J. (1999). Resistance of *Eisenia fetida* (Oligochaeta) to Cadmium after Long-Term Exposure. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 42, 75–80.
- Rementeria, A., Mikolaczyk, M., Lancelleur, L., Blanc, G., Soto, M., Schäfer, J., and Zaldibar, B. (In press). Assessment of the effects of Cu and Ag in oysters *Crassostrea gigas* (Thuberg, 1973) using a battery of cell and tissue level biomarkers. Submitted. *Mar. Environ. Res.*
- Riba, I., Blasco, J., Jiménez-Tenorio, N., González de Canales, M.L., and Ángel DelValls, T. (2005). Heavy metal bioavailability and effects: II. Histopathology–bioaccumulation relationships caused by mining activities in the Gulf of Cádiz (SW, Spain). *Chemosphere* 58, 671–682.
- RNO (2006). Surveillance du milieu marin. Travaux du RNO. Ifremer et Ministère de l'Ecologie et du Développement Durable.
- Ross, K., Cooper, N., Bidwell, J.R., and John Elder (2002). Genetic diversity and metal tolerance of two marine species: a comparison between populations from contaminated and reference sites. *Mar. Pollut. Bull.* 44, 671–679.
- Shuster, C., and Pringle, B. (1969). Trace metal accumulation by the American eastern oyster, *Crassostrea virginica*. p. 103.
- Soto, M., Zaldibar, B., Cancio, I., Taylor, M.G., Turner, M., Morgan, A.J., and Marigómez, I. (2002). Subcellular Distribution of Cadmium and its Cellular Ligands in Mussel Digestive Gland Cells as Revealed by Combined Autometallography and X-ray Microprobe Analysis. *Histochem. J.* 34, 273–280.
- Spurgeon, D.J., and Hopkin, S.P. (1999). Tolerance to Zinc in Populations of the Earthworm *Lumbricus rubellus*. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 37, 332–337.
- Spurgeon, D.J., and Hopkin, S.P. (2000). The development of genetically inherited resistance to zinc in laboratory-selected generations of the earthworm *Eisenia fetida*. *Environ. Pollut.* 109, 193–201.
- Srinivasan, M., and Swain, G.W. (2007). Managing the Use of Copper-Based Antifouling Paints. *Environ. Manage.* 39, 423–441.

- Turner, A. (2010). Marine pollution from antifouling paint particles. *Mar. Pollut. Bull.* 60, 159–171.
- Vega, M.M., Marigomez, J.A., and Angulo, E. (1989). Quantitative alterations in the structure of the digestive cell of *Littorina littorea* on exposure to cadmium. *Mar. Biol.* 103, 547–553.
- Wang, W.-X., Yang, Y., Guo, X., He, M., Guo, F., and Ke, C. (2011). Copper and zinc contamination in oysters: Subcellular distribution and detoxification. *Environ. Toxicol. Chem.* 30, 1767–1774.
- Wedderburn, J., McFadzen, I., Sanger, R.C., Beesley, A., Heath, C., Hornsby, M., and Lowe, D. (2000). The Field Application of Cellular and Physiological Biomarkers, in the Mussel *Mytilus edulis*, in Conjunction with Early Life Stage Bioassays and Adult Histopathology. *Mar. Pollut. Bull.* 40, 257–267.
- Wright, D.A., Mihursky, J.A., and Phelps, H.L. (1985). Trace metals in Chesapeake Bay oysters: Intra-sample variability and its implications for biomonitoring. *Mar. Environ. Res.* 16, 181–197.
- Zamuda, C.D., and Sunda, W.G. (1982). Bioavailability of dissolved copper to the American oyster *Crassostrea virginica*. I. Importance of chemical speciation. *Mar. Biol.* 66, 77–82.
- Zhou, K., Wang, R., Xu, B., and Li, Y. (2006). Synthesis, characterization and catalytic properties of CuO nanocrystals with various shapes. *Nanotechnology* 17, 3939–3943

3.3. Conclusion

La compréhension du message transmis par les programmes de biosurveillance est primordiale, car c'est en compilant les données à échelle mondiale qu'ils montrent leur force maximale et témoignent de l'évolution de la qualité de l'environnement dans un contexte de changements globaux.

L'ensemble des résultats obtenus grâce à cette étude indiquent que :

- ✓ Les huîtres girondines de La Fosse souffrent de la pollution polymétallique comme en témoignent les atteintes histologiques des glandes digestives et du tissu conjonctif qui constituent des biomarqueurs de dommages. Ces observations ne peuvent cependant pas être étendues à l'ensemble de la population et de l'espèce. Ces altérations peuvent impacter leur capacité d'accumulation ce qui rend la comparaison avec d'autres sites compliquée au vu de la variabilité intra-spécifique et inter-populationnelle de l'expression de ce type de biomarqueur.
- ✓ Les données de concentrations absolues mises à disposition par le RNO constituent un élément essentiel dans le suivi temporel de la pression en ETM dans les différents sites de la façade atlantique. Cependant, la variabilité inter-populationnelle au sein d'une même espèce d'huîtres, qui témoigne de la variété de stratégies d'adaptation de ces populations, rend la comparaison des régions entre elles compliquée.
- ✓ Le rapport élémentaire Cu/Ag constitue un outil intéressant pour l'identification de sources additionnelles locales permettant de comparer certains sites entre eux à l'intérieur d'une même région (e.g. en Rade de Brest). Son utilisation nécessite cependant la prise en compte des paramètres inhérents aux organismes (e.g. régulation/excrétion préférentielle de certains ETM). Ce rapport élémentaire apporte une information supplémentaire sur des sources d'expositions locales qui n'auraient pas été accessibles par une approche mono-élémentaire. De plus, si le rapport élémentaire ne permet pas l'identification nette de variations de pression à long terme, il en permet une observation relative à court et moyen terme. Au vu de ces éléments, le rapport élémentaire Cu/Ag apporte une réelle plus-value au message environnemental des données des réseaux de biomonitoring.

L'observation de la coévolution de deux métaux constitue une des composantes de l'originalité de cette étude. Cette méthode pourrait être étendue à d'autres rapports élémentaires afin d'observer de nouvelles corrélations liées à des sources d'expositions ou encore des

phénomènes physiologiques chez les organismes ciblés. Par ailleurs, les études histologiques sur les huîtres nécessitent d'être approfondies afin d'améliorer les connaissances sur l'expression de ces biomarqueurs en vue de l'intégration de leur prise en compte dans les protocoles de biosurveillance.

Chapitre 4

Etude de la bioaccumulation de Ag et Cu

Crassostrea gigas par dopage isotopique

(^{107}Ag et ^{63}Cu)

4.1. Introduction

Dans le chapitre précédent, nous avons montré la co-accumulation de Ag et Cu observée chez les huîtres sauvages *Crassostrea gigas* de la Côte Atlantique française dans le cadre du programme national de biosurveillance RNO/ROCCH. Les résultats ont également permis de mettre en évidence la particularité des huîtres de l'estuaire de la Gironde qui présentent la plus large gamme de concentrations en Ag et Cu au niveau national (couvrant plus d'un ordre de grandeur) devançant de loin les autres sites étudiés. Au-delà de cette constatation, et malgré une forte variabilité inter-individuelle et des atteintes histologiques importantes observées sur le site La Fosse, les huîtres sauvages girondines présentent un rapport élémentaire Cu/Ag relativement constant (entre 15 et 22) suggérant l'intervention de processus physiologiques dans la régulation de la bioaccumulation de ces deux métaux.

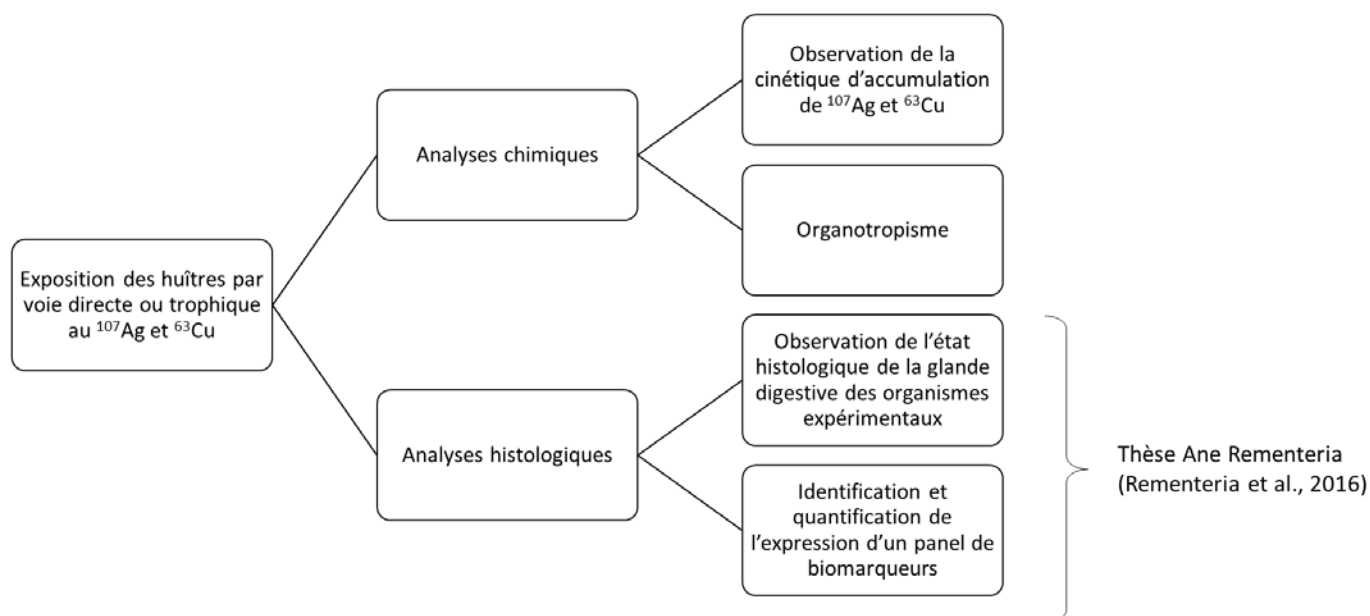
Dans un contexte d'émergence de nouvelles sources en Ag et Cu et de généralisation de l'utilisation des méthodes de biomonitoring dans le suivi des pressions environnementales, cette partie vise à :

- ✓ étudier l'accumulation simultanée, à courte échelle de temps, de Ag et Cu dans les différents organes de l'huître japonaise *Crassostrea gigas* exposée par voies directe et trophique à des concentrations se rapprochant des conditions environnementales,
- ✓ observer l'accumulation des métaux par le phytoplancton afin de préciser son rôle dans la contamination trophique des huîtres sauvages
- ✓ vérifier par voie expérimentale les observations in vivo de co-accumulation de Cu et Ag dans les huîtres, en tentant d'identifier d'éventuelles interactions (effets de synergie et/ou antagonisme) entre ces deux métaux,
- ✓ aider à l'optimisation du potentiel de l'outil de biomonitoring pour le traçage des pollutions métalliques environnementales dans les estuaires soumis à une contamination en Cu et Ag.

Pour cela, des huîtres de culture ont été exposées, par voie directe ou trophique, à différentes combinaisons et concentrations d'isotopes stables ^{107}Ag et ^{63}Cu . Les durées d'exposition des organismes étaient de 28 jours pour le suivi de la voie directe (c.f. 4.2.) puis durant 21 jours pour le suivi de la voie trophique (c.f. 4.3). Des organismes ont été prélevés chaque semaine, puis ont été disséqués et analysés afin de pouvoir y observer les variations temporelles des concentrations et des rapports isotopiques ($^{107/109}\text{Ag}$ et $^{63/65}\text{Cu}$) et ainsi de définir plus

précisément la cinétique de bio-accumulation simultanée de Cu et Ag en fonction de la pression de contamination équivalente à celle communément mesurée dans le milieu naturel.

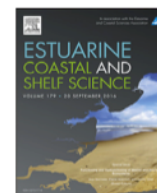
Rappel de la stratégie d'investigation de ce chapitre:



4.2. Article #2

Silver and copper bioaccumulation kinetics in oyster *Crassostrea gigas* tissues at environmentally relevant exposure levels using stable isotope spikes

Mathilde Mikolaczyk, Ane Rementeria, Laurent Lanceleur, Jörg Schäfer, Jérôme C. Petit, Beñat Zaldibar, Jean-François Chiffolleau, Manu Soto, Ionan Marigomez, Gérard Blanc.



Silver and copper bioaccumulation kinetics in oyster *Crassostrea gigas* tissues at environmentally relevant exposure levels using stable isotope spikes



Mathilde Mikolaczyk^a, Ane Rementería^{a,b}, Laurent Lanceleur^a, Jörg Schäfer^{a,*}, Jérôme C. Petit^a, Beñat Zaldibar^b, Jean-François Chiffolleau^c, Manu Soto^b, Ionan Marigomez^b, Gérard Blanc^a

^a Université de Bordeaux, UMR 5805 EPOC, Allée Geoffroy St. Hilaire, CS50023, 33615, Pessac, France

^b CBET Research Group, Department of Zoology and Animal Cell Biology, Science and Technology Faculty and Research Centre for Experimental Marine Biology and Biotechnology (PIE-UPV/EHU), University of the Basque Country (UPV/EHU), PO Box 644, E-48080, Bilbao, Basque Country, Spain

^c IFREMER Nantes, Centre Atlantique, Rue de l'Île d'Yeu, BP 21105, 44311, Nantes Cedex 03, France

ARTICLE INFO

Article history:

Received 12 January 2015

Received in revised form

6 July 2015

Accepted 25 July 2015

Available online 27 July 2015

Keywords:

Metals

Bivalves

Gironde estuary

Direct pathway

RNO/ROCCH

Synergy

Antagonism

ABSTRACT

Oysters (*Crassostrea gigas*) farmed in a clean reference estuary were exposed to different combinations of ⁶³Cu and ¹⁰⁷Ag stable isotope spikes in seawater at environmentally relevant concentrations during 28 days in order to study short-term bioaccumulation kinetics. Oysters were sampled, dissected and analyzed for Cu and Ag concentrations and isotope ratios (^{63/65}Cu; ^{107/109}Ag) after 7, 14, 21 and 28 days of exposure.

Isotope ratios in oyster tissues showed significant differences from natural isotope ratios even after only 7 days of exposure, with relatively similar signals independent from the tissue. The changes in isotope ratios combined with conventional concentration measurements allowed precise quantification of ⁶³Cu and ¹⁰⁷Ag concentrations before experimental exposure, in the same individual oyster tissue. The high sensitivity and the possibility to precisely follow short-term accumulation at environmental levels of several (non radioactive) different metals in individual organisms are major advantages.

Relatively constant Cu/Ag ratios in oysters exposed to the lowest Cu and Ag concentrations were observed. However, interactions between Cu and Ag accumulation occurred with (i) a synergy effect increasing Ag accumulation in the presence of high Cu concentrations and (ii) antagonism resulting in lower Cu accumulation at a given Cu exposure when Ag exposure levels increase. Comparison of experimentally accumulated Cu/Ag ratios (⁶³Cu_{acc}/¹⁰⁷Ag_{acc}) with Cu/Ag in wildlife oysters along the French Atlantic coast (data provided by the national mussel watch program RNO/ROCCH) suggests that such metal ratios reflect, to a certain extent, exposure levels and proportions in the environment. As such, element ratios may indicate contamination sources better than metal concentrations alone.

Metal accumulation in the different oyster tissues (mantle, muscle, gills, digestive gland and gonads) was rather homogeneous during the short-term direct exposure experiment, whereas wild oysters from the Gironde Estuary show very strong differences in metal accumulation between tissues, i.e. maximum Ag accumulation in digestive gland. This suggests that the trophic pathway (metals contaminating oysters through the food intake) may play a major role in wildlife oyster contamination.

© 2015 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Oysters are sedentary, estuarine suspension-feeders that are

continuously exposed to both dissolved and particulate contaminants (Amiard-Triquet et al., 1992; Ettajani et al., 1992; Strady et al., 2011a,b). Contaminants accumulated in oyster soft bodies often reflect environmental pollutant concentrations, which makes oysters an excellent sentinel species for environmental biomonitoring programs of pollutants including many metals (Chiffolleau et al.,

* Corresponding author.

E-mail address: jorg.schafer@u-bordeaux.fr (J. Schäfer).

2005; Lanceleur et al., 2011a). Long-term biomonitoring programs, such as the French national mussel watch (Réseau National d'Observation de la qualité du milieu marin/Réseau d'Observation de la Contamination Chimique RNO/ROCCH since 1979; www.ifremer.fr/surval2/; Chiffolleau et al., 2005), have proven to be excellent tools for the survey of (i) coastal water quality, (ii) the detection of pollution sources (localization and evolution over time; Lanceleur et al., 2011b), (iii) the evaluation of remediation strategy efficiency (Coynel et al., 2007) and (iv) seafood contamination. Degradation of coastal environmental health directly affects seafood quality inducing important social and economic consequences, when the effects and concentration of pollutants in seafood are in conflict with consumption norms. Sustainable seafood production and control of health risks for consumers require (i) identification of contaminant sources, (ii) understanding their reactivity in estuarine and coastal environments, and (iii) quantitative knowledge on their bio-availability, uptake and effects in aquatic organisms. The French Atlantic coast is the first European oyster (*Crassostrea gigas*) producer (90% of European sales) with 2.654 farms representing 11,000 direct jobs and 630 million euros in 2011 (Bova, 2011). Oyster production in the Gironde Estuary has been prohibited due to metal (especially Cd) pollution of the fluvial-estuarine system, detected by the RNO/ROCCH in 1979 (Boutier, 1981; Arrêté préfectoral du 7 juillet 1996). Ceasing of Zn ore treatment activities and ongoing remediation in the source area, a former metallurgy industrial site near Decazeville (Audry et al., 2004; Lanceleur et al., 2011a), has largely improved the situation resulting in a considerable decrease in Cd in the wild oysters of the Gironde Estuary mouth. However, other metals, such as Cu and Ag also show high concentrations in the Gironde oysters, widely decoupled from Cd, because their sources in the watershed are different and vary over time as a function of changing technical applications (e.g. Lanceleur et al., 2011b).

The RNO/ROCCH data (public data, available on line at www.ifremer.fr/surval2/) display different concentration levels of Cu and Ag accumulated in oysters along the French Atlantic coast, depending on the site. In fact, Ag levels accumulated in the tissues of 2–3 years old wild oysters from three different sites near the Gironde Estuary mouth recently exceed 100 mg kg⁻¹ (Lanceleur et al., 2011b). Although in the European Community, there are up to date no legal safety thresholds for Ag in seafood, these high concentrations have induced alterations in the digestive structure of oysters inhabiting the Gironde Estuary (Lanceleur et al., 2012).

Copper and Ag derive, to some extent, from the same sources including former industry (Decazeville; Audry et al., 2004; Lanceleur et al., 2011a,b; Castelle et al., 2009), urban wastewater (Deycard et al., 2014) and erosion of soils contaminated by Cu (vineyard fungicide; Masson et al., 2006) and Ag (cloud seeding; Lanceleur et al., 2011b; ANELFA, 2014), but their proportions are probably variable. In fact, the origins of Cu and Ag release to the environment are often decoupled, because both metals are not necessarily used in the same places, for the same purposes and/or at the same time. In the Gironde Estuary, both dissolved Cu and Ag show additive behavior (Kraepiel et al., 1997; Audry et al., 2007; Lanceleur et al., 2012), with Cu dissolution attributed to organic matter degradation, especially in the fluvial estuary turbidity gradient (Masson et al., 2011; Petit et al., 2013) and Ag release from particles due to chloride complexation in the salinity gradient. Despite clear different spatial and temporal emission patterns, oysters in the Gironde Estuary display relatively stable Cu/Ag ratios of 15–22 during the past decade and over a very wide concentration range, as both Cu and Ag concentrations in oysters vary by more than one order of magnitude (RNO/ROCCH www.ifremer.fr/surval2/). Oysters from other sites along the Atlantic coast and in the English Channel generally have much lower Cu and Ag levels and show different Cu/

Ag ratios, depending on the site. Like in the Gironde Estuary oysters, these site-dependent Cu/Ag ratios are relatively stable in most sites (Fig 1), although they cover narrower concentration ranges.

Understanding these patterns and the use of oysters to monitor coastal/estuarine water quality require a better constraint of the respective control of both environmental pressure and physiological regulation on Cu and Ag uptake. Both metals are potentially toxic to aquatic organisms and their effects include metabolic alterations, digestion capacity impairment and mortality (Parry and Pipe, 2004; Ringwood et al., 2010). Previous experimental works on Cu and Ag accumulation in oysters have reported synergy and antagonism in bioaccumulation (Amiard et al., 2004), and physiological controls on these metals have been suggested such as the increase of metallothionein levels or complexation by ligand as part of secondary and tertiary lysosomes (Carpene, 1993). Studying combined effects of contaminant mixtures (“cocktail effect”) is of growing interest, because organisms in real environmental conditions are rarely exposed to only one pollutant. It is, however, noteworthy that exposure levels used in previous works are usually much greater (10 µg l⁻¹Ag and 30 µg l⁻¹Cu; Amiard et al., 2004) than environmental marine concentrations such as the ones observed in the Gironde Estuary, where Cu and Ag levels appear higher than in other French estuaries. Such high exposure levels are often necessary (but not always sufficient) to obtain measurable results, i.e. metal concentration changes in tissues after relatively short exposure times (weeks). Previous studies have demonstrated the very high potential of stable metal isotope spikes in mesocosm bioaccumulation studies to quantitatively trace short-term metal bioaccumulation kinetics at environmentally realistic/relevant exposure levels (30 ng l⁻¹ Cd), thus avoiding experimental artefacts (Croteau et al., 2004; Strady et al., 2011a).

The present work aims at studying short-term (4 weeks) kinetics of Cu and Ag simultaneous accumulation in different tissues of pacific oyster (*C. gigas*) exposed to environmentally relevant levels of Cu and Ag using stable metal isotope spikes. The specific objectives were to (i) identify the presence or absence of synergy/antagonism effects on bioaccumulation and mortality in oysters and (ii) help evaluating the potential of mollusk biomonitoring (Cu and Ag concentrations in whole soft bodies, Cu/Ag ratios) as a tool for water quality assessment in different estuaries subjected to Cu and Ag contamination.

2. Material and methods

All the lab material in contact with the samples was soaked in an acid bath (HCl, 10% v/v) during 3 days, and then thoroughly rinsed with ultrapure (MilliQ®) water, dried under a laminar flow hood and kept sealed in double polypropylene bags until usage.

2.1. Preparation of isotopic solutions

Solid metal shavings of ⁶³Cu and ¹⁰⁷Ag (Oak Ridge National Laboratory, TN, EU) were dissolved in ultra pure nitric acid (HNO₃ ultrex 14M). Then, mono-isotopic solutions were diluted using ultrapure water (MilliQ®). Their concentrations and purity were controlled at the beginning of the experiment by ICP-MS analysis. Solutions purity was 99.2% and 99.9% for ¹⁰⁷Ag and ⁶³Cu respectively.

2.2. Experimentation setup

Oysters used for this experimentation came from an oyster farm in Cantabria, Spain (“OSTRANOR”, San Vicente de la Barquera, Spain), and were placed 48 h in filtered sea water for depuration. Then, calibrated (~8 cm) oysters (400 individuals) were evenly distributed in 5 polypropylene experimental 40 l tanks containing

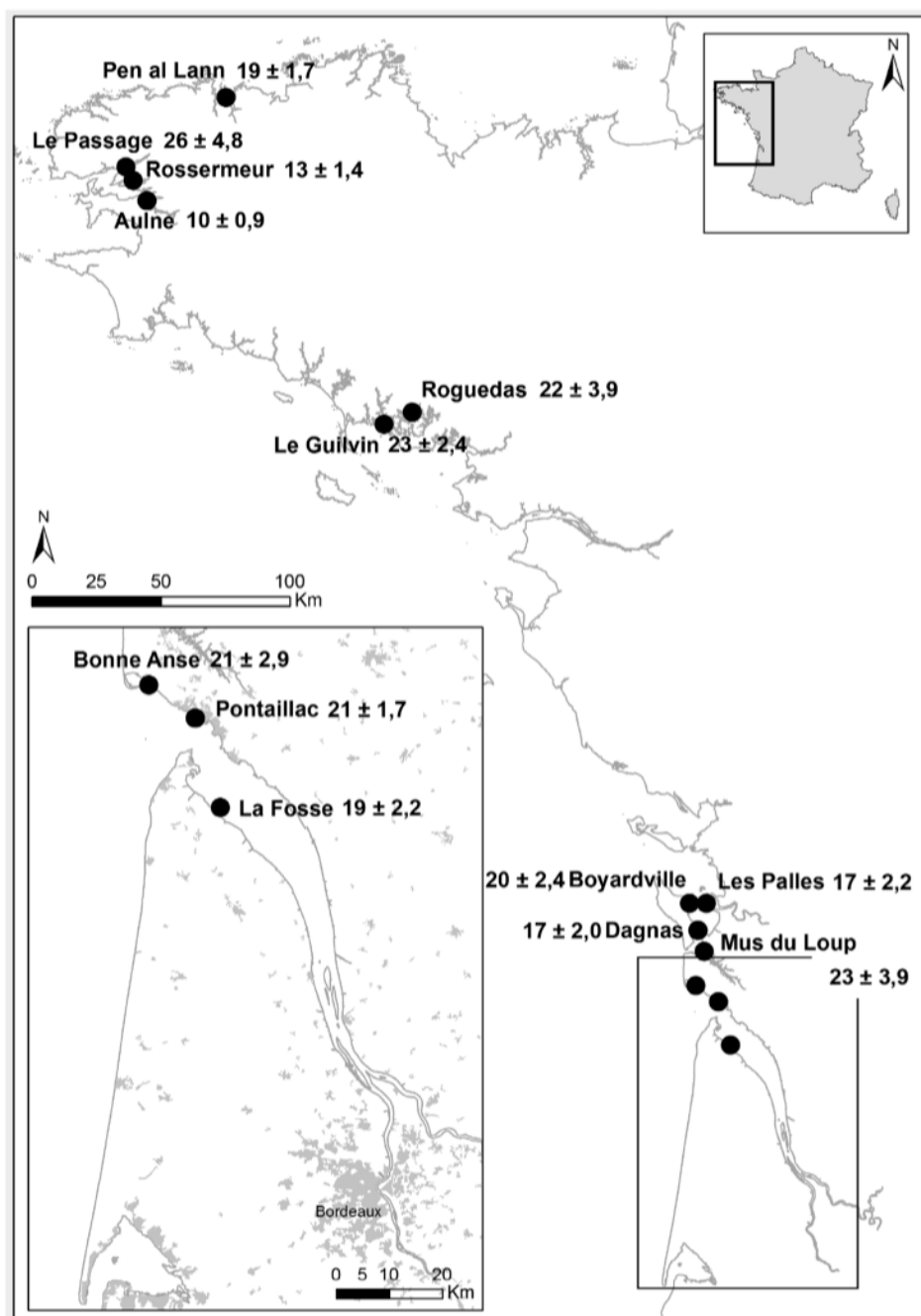


Fig. 1. Map of oyster sampling sites of the RNO/ROCCH program (the French national mussel watch program; IFREMER) with average Cu/Ag ratios and standard deviations indicated for each site.

naturally filtered sea water (Temperature: 17 °C; Salinity: 28; pH: 7.9) with a continuous air flow, in a room at 17 °C with an artificial photoperiod (12 h/12 h, day/night cycle). Four tanks were spiked by addition of ^{107}Ag and ^{63}Cu isotopes with different exposure conditions (50 ng l⁻¹ and 500 ng l⁻¹ of ^{107}Ag ; 1000 ng l⁻¹ and 2000 ng l⁻¹ of ^{63}Cu ; for specific exposure conditions see Table 1) and one tank served as a control, without contaminant addition. Oysters were fed for 4 h every day with commercial food (SERA MARIN, "Coraliquid" Sera GmbH Heinsberg, Germany) in separate feeding tanks filled with uncontaminated filtered sea water. Meanwhile, experimental tanks and control tank were emptied and renewed with filtered sea water and a new addition of dissolved

^{63}Cu and ^{107}Ag isotopes was carried out. The purpose of this step was to maintain constant exposure conditions to the ^{63}Cu and ^{107}Ag isotopes. Oyster, were therefore directly exposed to the pollutants for 20 h per day, simulating a realistic scenario of exposure in an intertidal natural environment. The water volume in the tanks was adapted to the number of individuals left during the experiment: the tanks contained 80 oysters/30 l during the first week, 60 oysters/20 l during week 2, 40 oysters/10 l during week 3, and 20 oysters/10 l from T = 21–28 days.

After 7, 14, 21 and 28 days of exposure, 20 oysters pseudoreplicates were sampled from each experimental unit. The use of pseudoreplication was motivated by the technical constraints of the

Table 1
Minimum and maximum $^{107/109}\text{Ag}$ and $^{63/65}\text{Cu}$ ratios for each exposure condition (tanks A, B, C, D, and control E) and over time. According to Wilcoxon–Mann–Whitney U test, a black star (*) indicates a statistically significant ($\alpha \leq 0.05$) difference from the initial isotope ratio (time 0 days) for concerned values.

	Tank	Exposure ^{63}Cu (ng l $^{-1}$)	Exposure ^{107}Ag (ng l $^{-1}$)	Time 0 days	Time 7 days	Time 14 days	Time 21 days	Time 28 days
$^{107/109}\text{Ag}$	A	1000	50	1.05–1.11	1.06–1.27	1.24–1.55*	1.34–1.54*	
	B	1000	500		1.38–2.90*	2.05–3.16*	2.91–4.68*	2.91–6.56*
	C	2000	50		1.13–1.39*	1.33–1.36*	1.44–1.71*	1.52–1.68*
	D	2000	500		1.28–2.24*	1.48–2.85*	2.68–5.37*	2.53–5.09*
	E	no spike	no spike		1.01–1.13	1.12–1.54*	1.05–1.14	1.10–1.63
$^{63/65}\text{Cu}$	A	1000	50	2.20–2.27	2.32–2.36*	2.29–2.36*	2.40–2.54*	2.38–2.42*
	B	1000	500		2.34–2.37*	2.29–2.41*	2.41–2.44*	2.42–2.61*
	C	2000	50		2.41–2.46*	2.49–2.90*	2.57–2.62*	2.62–2.73*
	D	2000	500		2.33–2.39*	2.43–2.58*	2.52–2.61*	2.54–2.67*
	E	no spike	no spike		2.22–2.28	2.27–2.36	2.27–2.36	2.25–2.30

experimental design, given the random character of this method in the case of our study (Koehnle and Schank, 2009). Five individuals were dissected to analyze metal concentrations in gills, adductor muscle, digestive gland, mantle and gonads in the EPOC laboratory, 15 individuals processed for further measurements including histopathological alterations, prevalence of parasites and biochemical measurements at the University of the Basque Country (PIE-UPV/EHU, Plentzia, Spain). Oyster mortality was daily checked; specimens were considered dead when their valves gaped and failed to close after physical stimulation (Veldhuizen-Tsoerkan et al., 1991).

2.3. Sample preparation

Organs (gills, digestive gland, gonads, muscle, mantle) were dissected using Teflon clamps and placed separately in decontaminated (HNO_3 10%) and pre-weighed polyethylene tubes. Due to technical limitations, gonads could not be systematically isolated from digestive glands for all samples. To circumvent this problem, pieces of pure digestive gland and the remaining digestive gland and gonads were mineralized and analyzed separately, to address the relative influence of gonads on metal concentrations.

Isolated organs were deep-frozen (-80°C), freeze-fried, weighed, and crushed to obtain a homogenous powder. Tissues of three (out of the 5 individuals sampled in each tank at each sampling time) randomly selected individuals were processed as follows: subsamples (20–150 mg) of milled material were mineralized using 1.4 ml of HNO_3 (14M, PlasmaPur) and 2 ml of HCl (12M, PlasmaPur), according to Daskalakis (1996). Briefly, closed tubes were digested during 3 h on a hotplate at 90°C (DigiPREP MS; SCP SCIENCE). After cooling, digestates were diluted and analyzed for Cu and Ag concentrations by Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry (ICP-MS; Thermo, X Series II) using external calibration (made of commercially available standard solutions PLASMACAL, SCP Science). Accuracy and precision were controlled during each analytical session by parallel analysis of international referenced certified materials (TORT 2, IAEA 407), and were respectively $>90\%$ and $<5\%$ (r.s.d.).

Precision of isotope ratio measurements was estimated at 3 times the standard deviation of isotopic ratios repeatedly ($n = 10$) measured in control oysters, i.e. samples with natural abundances. Accordingly, we considered $^{63/65}\text{Cu}$ and $^{107/109}\text{Ag}$ ratios as measurably modified when they differed from natural abundance ratios ($^{63/65}\text{Cu} = 2.24$; $^{107/109}\text{Ag} = 1.08$) by at least 0.06 (Cu) and 0.05 (Ag), i.e. 5% and 2.3% of the respective natural abundance ratios. Mass bias correction for $^{63/65}\text{Cu}$ and $^{107/109}\text{Ag}$ measurements was performed using $^{68/66}\text{Zn}$ and $^{112/114}\text{Cd}$ isotope ratios measured in the same samples under identical analytical conditions according to Monperrus et al. (2004).

2.4. Calculation of total Cu ($^{63}\text{Cu} + ^{65}\text{Cu}$) and Ag ($^{107}\text{Ag} + ^{109}\text{Ag}$) concentrations

The total Cu (Cu_T) and Ag (Ag_T) concentrations initially ($T = 0$) present in the oyster tissues were obtained from the concentrations of the naturally present isotopes (^{65}Cu and ^{109}Ag) using external calibration. Based on these concentrations, the natural isotope ratios and the modified isotope ratios measured at the end of the exposure period, we estimated (i) the final metal concentration in the tissues and (ii) the total Cu and Ag uptake over exposure time. Accordingly, the isotope approach allowed for quantification of Cu and Ag concentrations in the tissues of the same individual at two different points of time, i.e. $T = 0$ and at the end of the exposure time.

2.5. Statistics

Comparisons for mortality between different experimental groups were carried out by Kruskal–Wallis and subsequent Dunn's test in order to compare pairs of groups using SPSS software package (IBM/SPSS Statistics v.19). Isotope ratios in oyster tissues after exposure were compared to initial ($T = 0$) isotope ratios using Wilcoxon–Mann–Whitney U test, and statistically significant ($\alpha \leq 0.05$) differences were labeled by a black star (*; Table 1).

3. Results

3.1. Isotopic abundance ratios ($^{63/65}\text{Cu}$ and $^{107/109}\text{Ag}$) in the different oyster tissues

All the tissues from oysters sampled at the beginning of the experiment ($T = 0$ days) and from control oysters showed natural $^{107/109}\text{Ag}$ and $^{63/65}\text{Cu}$ ratios (Fig. 2). All the other samples had measurably higher $^{63/65}\text{Cu}$ ratios after only 7 days of exposure, with similar $^{63/65}\text{Cu}$ ratios from one tissue to another (Fig. 2; Table 1). After 21 days, all tissues showed clearly modified $^{63/65}\text{Cu}$, compared to natural values. Changes in $^{63/65}\text{Cu}$ were consistently stronger in tissues from oysters exposed to high ^{63}Cu levels and increased with time in all tanks except in the control tank. After 7 days, all $^{107/109}\text{Ag}$ ratios were clearly modified in tanks B and C and D, and to a lesser extent, in tank A. The observed $^{107/109}\text{Ag}$ ratios at a given exposure time were rather similar, whatever the tissue (Fig. 2). As for Cu, $^{107/109}\text{Ag}$ ratios increased with time and the changes were stronger for the oysters exposed to high ^{107}Ag levels, but the $^{107/109}\text{Ag}$ ratios evolved much stronger and more rapidly than $^{63/65}\text{Cu}$ (Fig. 2). In fact, at $T = 28$ days of exposure, $^{107/109}\text{Ag}$ reached values up to 5.1 for total organisms exposed to highest exposure levels (Fig. 2f), i.e. ~ 5 times higher than natural ratios, i.e. ^{107}Ag in the tissues has increased by roughly 400%.

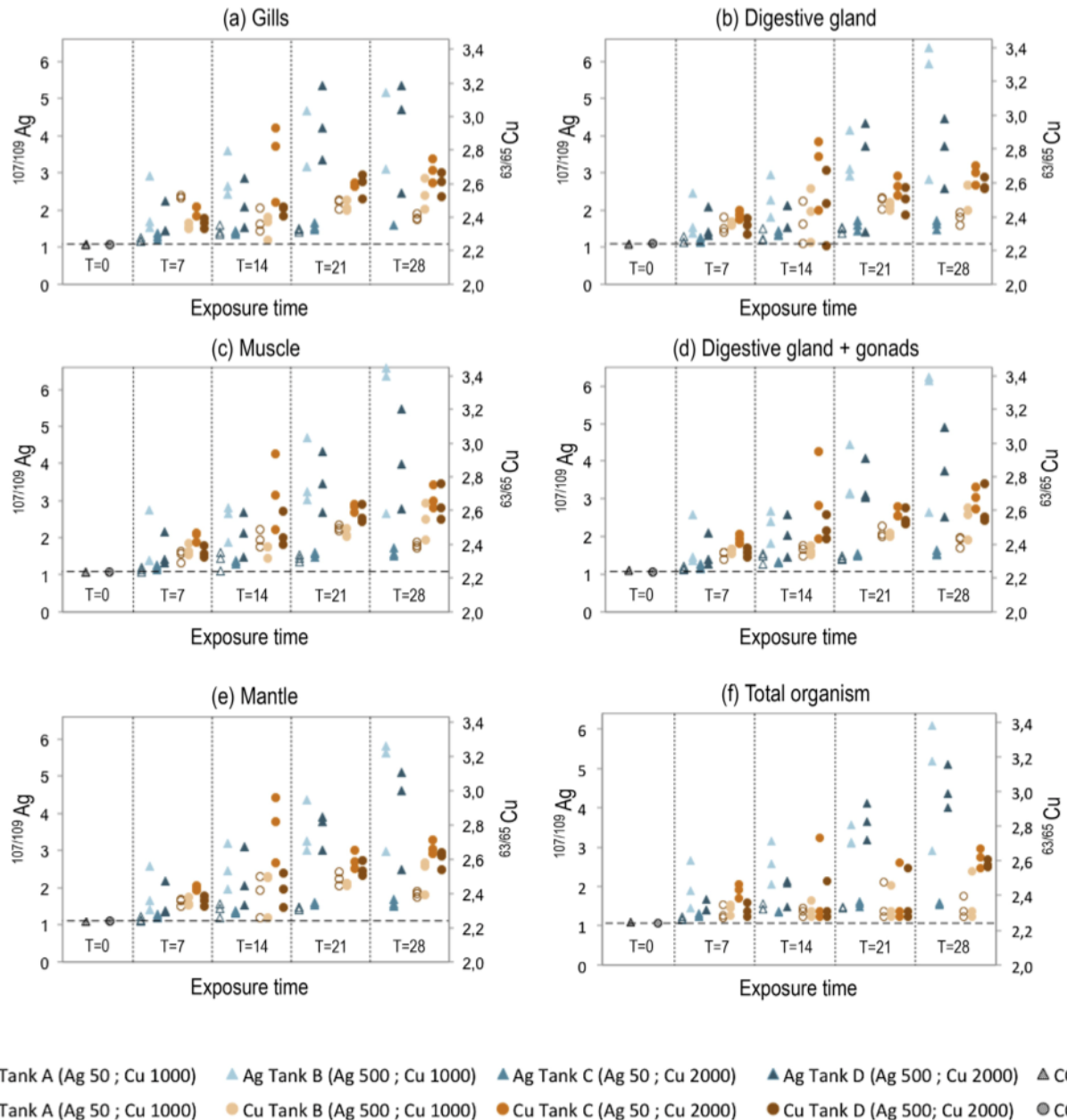


Fig. 2. Isotopic ratios $^{63/65}\text{Cu}$ and $^{107/109}\text{Ag}$ over time in different organs (a–e) and in total organisms (f), for different exposure conditions (tanks A, B, C and D).

3.2. Concentrations and loads of CuT and AgT in oyster tissues

The Cu_T and Ag_T concentrations and loads calculated for total organisms were variable for nearly all experimental conditions (Fig. 3). Compared to the average concentrations obtained for $T = 0$, average Cu_T concentrations did not change significantly during the whole experiment, whereas Ag concentrations were different in Tank D at $T = 21$ and in all tanks at $T = 28$ (Fig. 3A). The modified isotope ratios after exposure clearly indicated that the oysters have accumulated Cu and Ag in the different tissues during the experiment. The related loads of metal accumulated ($\text{Cu}_{T\text{acc}}$, $\text{Ag}_{T\text{acc}}$; Fig. 3B) ranged from $73.0 \mu\text{g Cu}_{T\text{acc}}$ at ($T = 7$; Tank A) to $95.8 \mu\text{g Cu}_{T\text{acc}}$ ($T = 28$; Tank D) and from $1.61 \mu\text{g Ag}_{T\text{acc}}$ ($T = 7$; Tank A) to $4.95 \mu\text{g Ag}_{T\text{acc}}$ ($T = 28$; Tank D).

3.3. Mortality

Exposure to all experimental groups caused very low levels of mortality (less than 10%) after 21 days (Fig. 4). After 21 days of exposure significant differences were observed between oysters maintained at the highest Cu concentrations (Tank D, 2000 ng l^{-1} ; Tank A, 1000 ng l^{-1}), and oysters undergoing the rest of treatments including the controls (Fig. 4). Mortality slightly increased from day 21 to day 28 of exposure in all the groups, with the highest rate (around 15%) observed in oysters exposed to the highest Cu (2000 ng l^{-1}) and Ag (500 ng l^{-1}) concentrations (Tank D), followed by oysters exposed to low Cu (1000 ng l^{-1}) and low Ag (50 ng l^{-1}) concentrations (Tank A). The rest of the exposure and control groups exhibited mortalities lower than 10%.

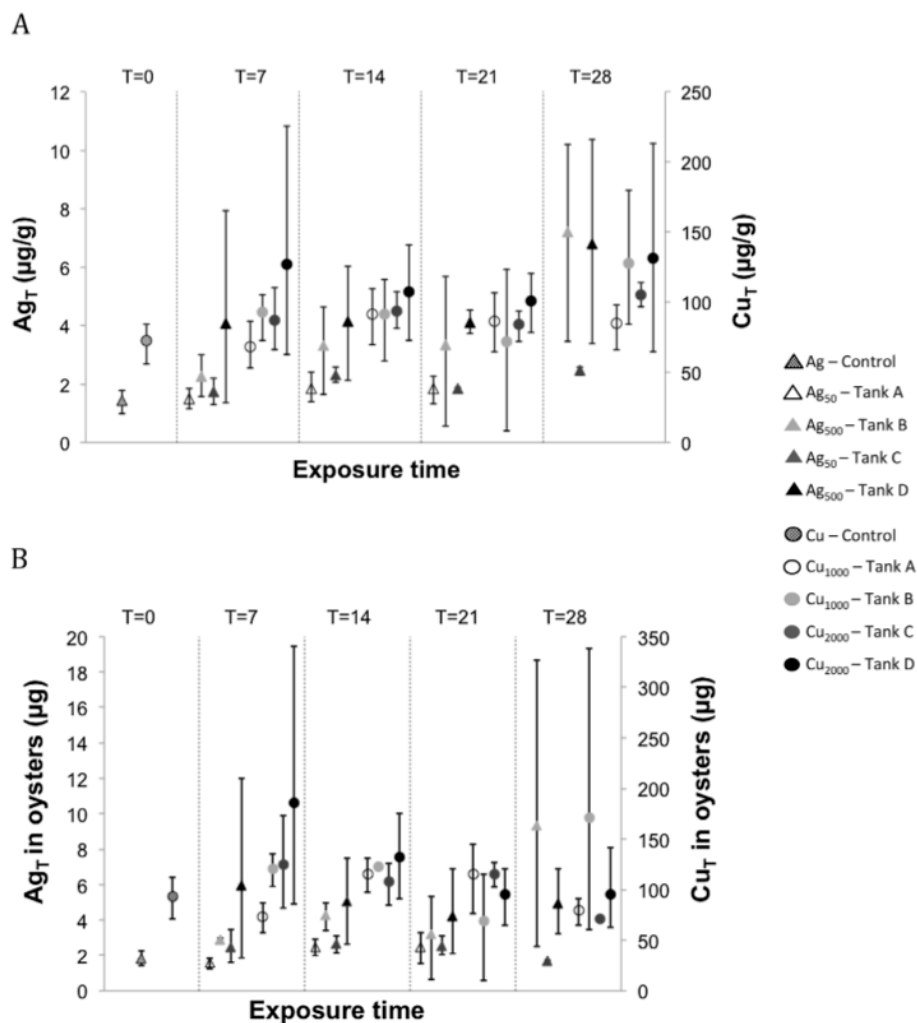


Fig. 3. Ag_T and Cu_T concentrations (μg/g; A) and loads (μg; B) in total organisms over time, and for the different exposure conditions. Symbols represent average values (n = 3); bars represent min and max values.

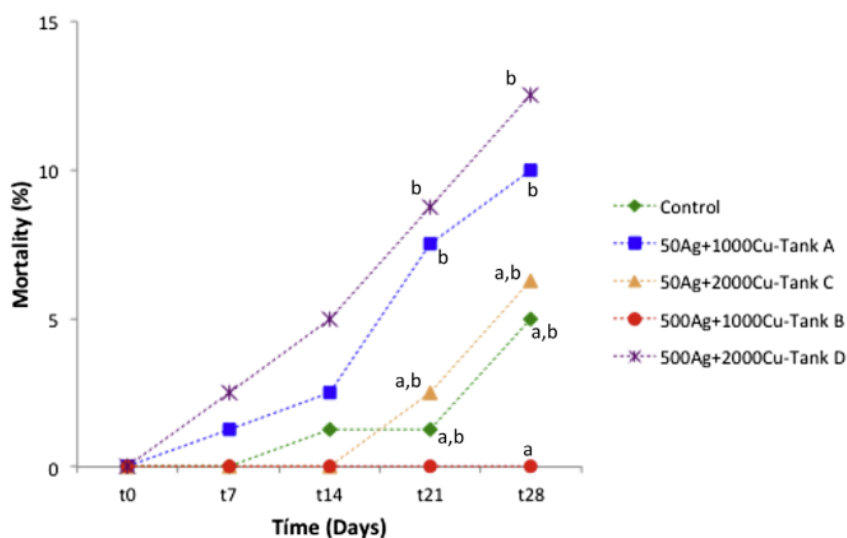


Fig. 4. Accumulated mortality through time in different experimental groups. Different letters in the lines indicated statically different groups at p < 0.05 level.

4. Discussion

4.1. Performance of isotope spiking as a tool for the study of short-term bioaccumulation kinetics of Ag and Cu

The experimental setup of the present study using exposure of oysters to ^{63}Cu and ^{107}Ag stable isotopes in the dissolved phase was designed to study short-term (days, weeks) Cu and Ag bioaccumulation by the direct pathway. Modified isotope ratios in oyster tissues were exclusively due to direct contamination, because oysters were fed in separate tanks containing natural (unspiked) filtered seawater and food. In fact, control oysters did not show measurable modification of Cu and Ag isotope ratios throughout the whole experiment.

The rapid response of isotope ratios, i.e. measurable modification after only 7 days of exposure, highlights the potential of stable isotope spike incubations for the quantitative tracing of metal transfers between water and organisms for short exposure times and close-to-real exposure levels. The extent of $^{63/65}\text{Cu}$ and $^{107/109}\text{Ag}$ ratio modification (Fig. 2) for a given exposure time directly depends on exposure levels, i.e. reflects fundamental relations between exposure, bioaccumulation and isotopic signal. In fact, the $^{63/65}\text{Cu}$ and $^{107/109}\text{Ag}$ ratios in tissues of oysters from the different tanks A, B, C and D depend directly on exposure time and are different, depending on the respective experimental configuration.

Given that $^{63/65}\text{Cu}$ and $^{107/109}\text{Ag}$ isotope ratios became measurable when they were modified by only 5% and 2.3% of the respective natural abundance ratios, the corresponding uptake of Cu and Ag respectively represent 1.4% and 5% of the initially/naturally present metal loads in the tissues. This means that a change by only 1.4% and 5% of the initial metal concentration is measurable. This highly sensitive response is one major advantage of using modified isotope ratios instead of concentrations as used in classical bioaccumulation studies, where analytical precision in concentration measurements (typically 5–10% due to sample treatment and analysis; Chiffoleau et al., 2005) does not allow detection of concentration changes within this uncertainty range. In the past, only the use of short-life-time radioisotopes allowed experimental monitoring of short-term bioaccumulation at low concentration levels (Galvez et al., 2002), yet with important limitations mainly related to availability and use (handling license, infrastructure, etc.) of radio-isotopes. Furthermore, side effects due to the introduction of a radioactive substance in living organisms may also exert significant limitations to these approaches (Boisson et al., 2003; Galvez et al., 2002).

Uncertainty in bioaccumulation studies is generally much higher than analytical error due to the relatively high inter-individual variations in living organism (Marigómez et al., 2013; Zuykov et al., 2013). In fact, a test organism can be sacrificed only once, which means that one cannot analyze the same individual at $T = 0$ and at the end of exposure time. Therefore, bioaccumulation experiments using classical methods define the initial state (reference value at the beginning of exposure, $T = 0$) and after any exposure time by analyzing multiple pooled or discrete individuals to account for inter-individual variations. In the present work, due to the complexity of analyses and since the present paper is part of a bigger research project in which oyster samples were also collected in order to observe biological alterations, some limitations regarding the amount of samples ($n = 3$) arise. The measurements made in the 3 replicates reflected the variability of the experimental population, although the individuals underwent identical experimental conditions. From the data obtained, the estimated inter-individual variability was ~26% (calculated as relative standard deviation, RSD, of concentration values obtained for whole organisms). This inter-individual variability implies that,

using conventional methods, bioaccumulation under the present experimental conditions would have been measurable only for concentration changes by more than 26% compared to the reference samples. Such important concentration changes require (i) much longer exposure time and/or (ii) exposure levels several orders of magnitude higher than real environmental levels (e.g. 30,000 ng l⁻¹ for Cu and 10,000 ng l⁻¹ for Ag; Ettajani et al., 1992; Amiard et al., 2004). However, such overexposure bears the risk of side effects in stressed organisms, e.g. development of defense mechanisms, which may not occur in real environmental conditions, inducing artefacts in the experimental results and, hence, misunderstandings in their interpretation (Strady et al., 2011a).

In the present work, relative Cu accumulation compared to initial concentrations ($T = 0$) was measurable as early as $T = 7$, and ranged from 1.44 to 4.24 % at $T = 7$ and from 2.71 to 13.1% at $T = 28$. These changes were lower than inter-individual variability, i.e. would not have been reliably detected using conventional approach, i.e. without isotope spikes. In contrast, Ag relative accumulation was higher, ranging from 1.5 to 38 % at $T = 7$ and 13.1–192 % at $T = 28$. This suggests that, without isotope spikes, measurable Ag bioaccumulation would have occurred only for the higher exposure level and after longer exposure ($T = 14$ and $T = 28$) (Fig. 5). However, for the low exposure level (50 ng l⁻¹), the observed relative bioaccumulation consistently remained below 30% of the initial level, and would have been difficult to detect without the isotope spike method.

Unlike conventional methods, the combination of isotope ratio measurements and external calibration allows both (i) quantification of the amount of metal accumulated during the experiment and (ii) measurement of initial metal concentration in the same individual. Without the use of stable isotopes, nearly all the quantitative results obtained in the present work would have been impossible to achieve. Overall, as a first approach and even with the limited number of individuals sampled in the present work, it can be concluded that the use of isotope spiking in ecotoxicology is a promising, powerful and accurate method to trace bioaccumulation dynamics of metal 'cocktails' in close-to-real environmental conditions.

4.2. Interactions between Cu and Ag bioaccumulation

The responses obtained for $^{63/65}\text{Cu}$ and $^{107/109}\text{Ag}$ in oysters exposed under different experimental conditions suggest the existence of reciprocal influences between Cu and Ag depending on their concentrations in water:

Comparing tanks A and C (both exposed to 50 ng l⁻¹ ^{107}Ag) at day 21 shows that $^{107/109}\text{Ag}$ in oyster tissues in Tank C tended to be higher than those in tank A and similar trends were observed for tanks B and D (both exposed to 500 ng l⁻¹ ^{107}Ag). These results suggest that for a given ^{107}Ag exposure level, Ag accumulation tended to increase with increasing Cu exposure levels, reflecting a synergic effect in Ag accumulation by oysters, which is consistent with previous results (Ettajani et al., 1992; Amiard et al., 2004). Regarding the effects produced by this net accumulation of metals in soft tissues of oysters it has to be noted that, in general, mortality rates were very low in all the experimental groups. However, the simultaneous exposure to the highest concentrations of Ag (500 ng l⁻¹) and Cu (2000 ng l⁻¹) produced the highest mortality rate (~15%). This rate was significantly higher than that produced in the group exposed to the combined low doses of Cu and Ag (1000 and 50 ng l⁻¹, respectively) in Tank B. These results reinforce the idea of a synergistic relation between Cu and Ag not only for the accumulation (Daskalakis, 1996), but also for the effects produced by them.

In contrast, for similar ^{63}Cu concentrations (1000 ng l⁻¹ in

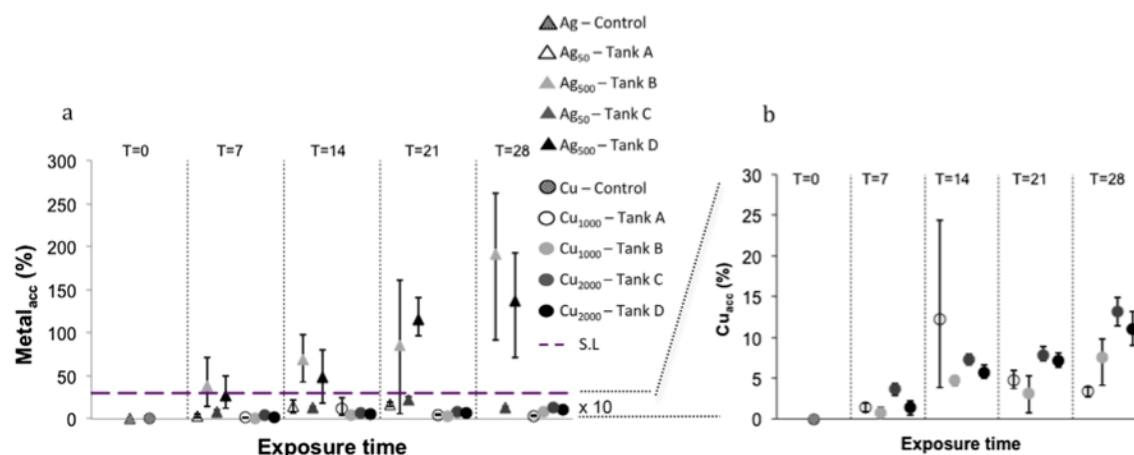


Fig. 5. Total metal accumulation (expressed as % of initially present metal loads) over time for the different exposure conditions to isotopically-labeled metal solutions (tanks A, B, C and D) (S.L. = Significant Limit of visibility for classical concentration-based methods) for both Cu and Ag metals in a same scale (a) and with a zoom ($\times 10$) for Cu accumulation only (b).

Tanks A and B; 2000 ng l⁻¹ in Tanks C and D), ^{63/65}Cu isotope ratios were similar or slightly higher (2.38–2.73) in Tanks A and C (both at 50 ng l⁻¹ 107Ag) than those in Tanks B and D (^{63/65}Cu = 2.42–2.67; both tanks at 500 ng l⁻¹ 107Ag), indicating similar or lower Cu accumulation for the higher Ag exposure level. Although this difference in ^{63/65}Cu is relatively small, these results may suggest an antagonist effect of Ag levels on Cu accumulation. Amiard et al. (2004) have attributed antagonist effects of Ag as a contaminant on Cu as an essential element to competition of Cu and Ag for binding sites in metallothioneins, involved in both regulation of essential metals and defense mechanisms. Silver has higher binding affinity to metallothioneins than Cu and, in some cases, replaces the latter (Blalock et al., 1988; Scheuhammer and Cherian, 1986). Therefore, it cannot be discarded that high Ag exposure levels may limit the capacity of metallothioneins to bind Cu and, therefore, lower the accumulation of Cu in soft tissues.

4.3. Amounts of Cu and Ag and element ratios accumulated in oysters tissues

Changes of Cu/Ag ratios accumulated in oysters during the experiment ($Cu_{T acc}/Ag_{T acc}$; Fig. 6) reflect the above discussed synergy/antagonism effects. In fact at T = 0, the Cu/Ag ratio in the wild oysters from the farm, were close to 50, i.e. clearly higher than Cu/Ag ratios in oysters from the French coast (Fig. 1). This

observation and the overall low Cu and Ag concentrations in the oysters at T = 0 suggest that Ag pressure is much lower in the estuary of the farm than in the French estuaries. In fact, estuaries are areas of relevant Ag contamination in oysters along the French Atlantic coast and the English Channel (Chiffolleau et al., 2005). Applying the bioaccumulation factors for Ag in oysters from the Gironde Estuary ($\sim 10^4$ – 10^5 ; Lanceleur et al., 2011b, 1979 to 2007 record), these results suggest that dissolved Ag levels in the farm probably are in the low picomolar range (no data available).

During the experiment, the $Cu_{T acc}/Ag_{T acc}$ ratio (Fig. 6) did not vary in the oysters from Tank A and varied little for Tank C (both at 50 ng l⁻¹ 107Ag). The above-discussed synergy (increased Ag accumulation in the presence of high Cu levels) appears to induce a slight tendency towards decreasing $Cu_{T acc}/Ag_{T acc}$ ratios in Tank C. In contrast, oyster tissues in Tanks B and D (high Ag exposure) showed a strong decrease of $Cu_{T acc}/Ag_{T acc}$ ratios over time. These ratios were independent from Cu exposure level and reached stable values of 10–25 after 3 weeks of exposure. This observation is consistent with previous works by Martoja et al. (1988) stating that Ag accumulation in soft tissues of oysters reaches stable values after 2 weeks of exposure, due to a steady state between uptake and elimination via sulphide complexation and excretion by amoebocytes. After 28 days of exposure mortality was only slightly higher than 10% in oysters from the Tanks D (2000 ng l⁻¹ Cu; 500 ng l⁻¹ Ag) and A (1000 ng l⁻¹ Cu; 50 ng l⁻¹ Ag), suggesting that the steady

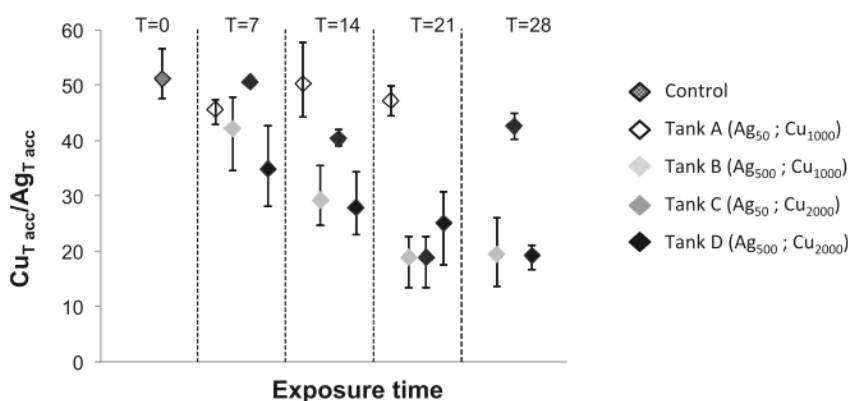


Fig. 6. Average ratios ($Cu_{T acc}/Ag_{T acc}$) of metals accumulated in total organisms, calculated for each sampling group (n = 3), over time for different exposure conditions (tanks A, B, C and D).

state might affect oyster overall health status compromising the survival of the weakest specimens.

4.4. Environmental significance

Rapid response of $Cu_{T\text{ acc}}/Ag_{T\text{ acc}}$ ratios in the experiment and the fact that these ratios reach a plateau after few weeks suggest that Cu/Ag ratios measured in wild oysters reflect, to some extent, environmental conditions at a longer time scale. In fact, the final $Cu_{T\text{ acc}}/Ag_{T\text{ acc}}$ ratios in the tissues of the oysters in the present work were different from the Cu/Ag exposure levels in the tanks, and therefore bioaccumulation factors were different for these metals, implying their segregation due to different affinities towards regulating molecules (e.g. metallothioneins).

The strong variations in metal concentrations in wild oysters of the Gironde Estuary mouth due to (i) seasonal effects (e.g. reproduction cycles; [Lanceleur et al., 2011b](#)) and (ii) differences in contamination levels of individuals sampled (unpublished data) may partly mask evolution at the annual timescale. It is conceivable that element ratios in general, and Cu/Ag ratios in particular (this study), could be more robust indicators of environmental exposure than metal concentrations alone. The comparison of the Cu/Ag ratios in wild oysters from the RNO/ROCCH observation sites along the French coast suggests that these different environments might have characteristic levels and evolution over time of environmental Cu and Ag pressure. For example, oysters collected from the three sites of Rade de Brest (Le Passage, Rossermeur and Aulne) showed a wide range of Cu/Ag ratios varying from 8 to 33 between 1998 and 2010 ([Fig. 1](#)). Since total Cu concentrations in these oysters varied less (from 109 to 269 $\mu\text{g/g}$), these variations in Cu/Ag were partly due to variable Ag levels in oysters and the resulting Cu/Ag ratio probably reflected site-dependent exposure with respect to potential sources. The ban of organo-tin antifouling paints for Navy Vessels since 2003 ([Huet and Paulet, 2006](#)), has led to increasing use of Cu/Zn –based antifouling paints ([Jones and Turner, 2010](#)). The highest and increasing Cu/Ag ratios (from 17.3 to 33.1 since 2003; RNO/ROCCH) in oysters from Le Passage, nearby the major French Navy Harbor (Brest), may reflect high environmental pressure in Cu compared to Ag. In contrast, the lowest Cu/Ag ratios in oysters from the Rade de Brest occurred at the Aulne site, which is located (i) far from the Navy Harbor and (ii) close to a river mouth draining Zn–Pb ore deposits, probably rich in Ag ([Lemière et al., 2002](#)).

Silver concentrations in oysters from the Aulne site (Rade de Brest) are similar to those in oysters from the Marennes–Oléron Bay ([Fig. 2](#)), but Cu/Ag ratios in the latter are clearly higher, suggesting higher Cu pressure due to intensive vine farming in the nearby Charente and Gironde watersheds. This common influence is supported by the homogeneity of Cu/Ag ratios in oysters from all sites in the Marennes–Oléron Bay and the Gironde Estuary mouth, although Cu and Ag concentrations in the Gironde oysters were the highest for both metals, compared to all the other sites along the French coast ([Lanceleur et al., 2012](#); RNO/ROCCH). Although data on dissolved Ag are missing for nearly all estuaries and bays worldwide, the historical records of Cu and Ag in oysters from the different observation sites allowed a first recognition of potential sources.

The absence of significant differences in accumulation between organs is in major contrast with the organotropism observed in wild oysters from the Gironde Estuary, which showed major metal accumulation in digestive gland together with a strong deterioration at the cellular level ([Lanceleur et al., 2012](#); [Rementeria et al., 2014](#)). These observations are in agreement with previous works reporting that the direct pathway affects indistinctly all organs in contact with water ([Amiard et al., 1989](#)), while exposure by trophic

pathway, involving digestion processes, preferentially affects the digestive gland ([Ettajani et al., 1992](#); [Strady et al., 2011a](#)). Furthermore, previous studies on Cu and Cd accumulation have shown that the response of filtering organisms to trophic contamination is relatively slow, compared to direct contamination, but may strongly contribute to overall bioaccumulation in oysters after few weeks ([Zamuda and Sunda, 1982](#); [Strady et al., 2011a](#)). Assuming trophic Ag contamination in oysters, as observed for Cd in laboratory experiments and in field observation under real oyster farming conditions ([Strady et al., 2011a](#)), the above observations clearly suggest that uptake by phytoplankton and transfer in the short trophic chain probably is a major process in Ag accumulation by oysters. Given the high vulnerability of oyster production due to (i) expected future recommendations on Ag safety limits for seafood and (ii) the observed degradation of digestion cells, additional work on real environment Ag uptake by oysters and related consequences is necessary.

5. Conclusion

The present work is a first approach in order to study Cu and Ag bioaccumulation kinetics and synergy/antagonism in oysters using stable metal isotope spike incubations. Although not fully conclusive for ecotoxicology due to the low amount of replicates since this study is part of a bigger project, exposure of oysters to different concentrations of dissolved ^{63}Cu and ^{107}Ag in seawater has clearly shown that isotope spiking is a highly sensitive method to simultaneously quantify simultaneous short-term direct pathway accumulation of metals in oyster tissues at environmentally relevant concentrations. The direct quantification of metal net accumulation in each single oyster by comparing initial and final metal concentration in the same specimen is a unique feature of the stable isotope spiking method. These results contribute to overcome weaknesses of classical ecotoxicological/bioaccumulation studies which, for short exposure times, require high exposure concentrations to obtain significant accumulation responses due to analytical limitations and/or inter-individual variability. This experimental approach can be applied to metals other than Cu and Ag and probably will work for experimental studies of cocktail effects involving more than two metals. The results obtained for environmental exposure levels confirm previous observations on interactions in Cu and Ag accumulation, i.e. (i) a synergy effect inducing higher Ag accumulation for a fix exposure level in the presence of higher Cu exposure and (ii) no effect or antagonism resulting in lower Cu accumulation at a given exposure, when Ag exposure levels increase. The short-term response of $Cu_{T\text{ acc}}/Ag_{T\text{ acc}}$ to exposure conditions during the experiment combined with long-term observation data (RNO/ROCCH) suggests that, despite efficient detoxification mechanisms, Cu/Ag ratios rather than single metal concentrations in wild oysters reflect environmental conditions and changing sources in the vicinity of the different sites.

Acknowledgments

Funded by the Basque Government (GIC07/26-IT-393-07) research project, CTM2012-40203-C02-01 (MINECO), “La Région Aquitaine”, le FEDER Aquitaine, l’Agence Nationale de Recherche (ANR-07-VULN-003) and the “Agence de l’Eau Adour-Garonne”.

References

- Arrêté Préfectoral du 2 juillet, 1996. Arrêté fixant les critères sanitaires auxquels doivent satisfaire les coquillages vivants destinés à la consommation humaine immédiate. NOR: AGRG9501581A. JORF 167, p. 10967.

- Amiard, J.C., Amiard-Triquet, C., Ballan-Dufrançais, C., Berthet, B., Jeantet, A.Y., Martoja, R., Truchet, M., 1989. Study of the bioaccumulation at the molecular, cellular and organism levels of lead and copper transferred to the oyster *Crassostrea gigas* directly from water or via food. *Proc. Eur. Symp. Mar. Biol.* 34, 521–529.
- Amiard, J.C., Perrein-Ettajani, H., Gérard, A., Baud, J.P., Amiard-Triquet, C., 2004. Influence of ploidy and metal–metal interactions on the accumulation of Ag, Cd, and Cu in oysters *Crassostrea Gigas* Thunberg. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 48, 68–74.
- Amiard-Triquet, C., Martoja, R., Mareau, C., 1992. Alternative methodologies for predicting metal transfer in marine food webs including filter feeders. *Water Sci. Technol.* 25, 197–204.
- ANELFA : Association Nationale d'Etude et de Lutte contre les Fléaux Atmosphériques. <http://www.anelfa.asso.fr/> (last accessed in 2014).
- Audry, S., Schäfer, J., Blanc, G., Jouanneau, J.M., 2004. Fifty-year sedimentary record of heavy metal pollution (Cd, Zn, Cu, Pb) in the Lot River reservoirs (France). *Environ. Pollut.* 132, 413–426.
- Audry, S., Blanc, G., Schäfer, J., Guérin, F., Masson, M., Robert, S., 2007. Budgets of Mn, Cd and Cu in the macrotidal Gironde estuary (SW France). *Mar. Chem.* 107, 433–448.
- Blalock, T.L., Dunn, M.A., Cousins, R.J., 1988. Metallothionein gene expression in rats: tissue-specific regulation by dietary copper and zinc. *Nutr. Gene Expr.* 118, 222–228.
- Boisson, F., Goudard, F., Durand, J.P., Barbot, C., Pieri, J., Amiard, J.C., Fowler, S.W., 2003. Comparative radiotracer study of cadmium uptake, storage, detoxification and depuration in the oyster *Crassostrea gigas*: potential adaptive mechanisms. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 254, 177–186.
- Boutier, B., 1981. Synthèse des résultats de la surveillance des micropolluants dans la matière vivante. Ministère de l'environnement. *Bull. du R.N.O.* 17, 115–174.
- Bova, F., 2011. Les filières Pêches et aquaculture, édition 2011. In: *Les cahiers de FranceAgriMer*. France Agrimer, Montreuil-sous-bois, p. 36.
- Carpene, E., 1993. Metallothionein in marine molluscs. In: Dallinger, R., Rainbow, P.S. (Eds.), *Ecotoxicology of Metals in Invertebrates*. SETAC Special Publications, Lewis, Boca Raton FL, pp. 55–72.
- Castelle, S., Schäfer, J., Blanc, G., Dabrin, A., Lancelot, L., Masson, M., 2009. Seasonal variability of gaseous mercury at the air–water interface of a highly turbid estuary (Gironde Estuary, France). *Mar. Chem.* 117, 42–51.
- Chiffolleau, J.F., Auger, D., Roux, N., Rozuel, E., Santini, A., 2005. Distribution of silver in mussels and oysters along the French coasts: data from the national monitoring program. *Mar. Pollut. Bull.* 50, 1719–1723.
- Coynel, A., Schäfer, J., Dabrin, A., Girardot, N., Blanc, G., 2007. Groundwater contributions to metal transport in a small river affected by mining and smelting waste. *Water Res.* 41, 3420–3428.
- Croteau, M.N., Luoma, S.N., Topping, B.R., Lopez, C.B., 2004. Stable metals isotopes reveal copper accumulation in the freshwater bivalve *Corbicula*. *Environ. Sci. Technol.* 38, 5002–5009.
- Daskalakis, K.D., 1996. Variability of metal concentrations in oyster tissue and implications to biomonitoring. *Mar. Pollut. Bull.* 32, 794–801.
- Deycard, V.N., Schäfer, J., Blanc, G., Coynel, A., Petit, J.C.J., Lancelot, L., Dutrich, L., Bossy, C., Ventura, A., 2014. Contributions and potential impacts of seven priority substances (As, Cd, Cu, Cr, Ni, Pb, and Zn) to a major European Estuary (Gironde Estuary, France) from urban wastewater. *Mar. Chem.* 167, 123–134.
- Ettajani, H., Amiard-Triquet, C., Amiard, J.C., 1992. Experimental study of two trace metal (Ag, Cu) transfer in a marine trophic chain : water-particles (phytoplankton and sediment) – filter feeding species (*Crassostrea gigas*, Thunberg). *Water Air Soil Pollut.* 65, 215–236.
- Galvez, F., Mayer, G.D., Wood, C.M., Hogstrand, C., 2002. The distribution kinetics of waterborne silver-110m in juvenile rainbow trout. *Comp. Biochem. Physiol.* 131, 367–378.
- Huet, M., Paulet, Y.M., 2006. Tributyltin Pollution Estimated in 2006 with Imposex. Final contract university report. IFREMER N° 2006550881451, p. 116 (in French).
- Jones, D.E., Turner, A., 2010. Bioaccessibility and mobilisation of copper and zinc in estuarine sediment contaminated by antifouling paint particles. *Estuar. Coast. Shelf Sci.* 87, 399–404.
- Kraepiel, A.M.K., Chiffolleau, J.F., Martin, J.M., Morel, F.M.M., 1997. Geochemistry of trace metals in the Gironde Estuary. *Geochim. Cosmochim. Acta* 61, 1421–1436.
- Koehnle, T.J., Schank, J.C., 2009. An ancient black art. *J. Comp. Psychol.* 123, 452–458.
- Lancelot, L., Schäfer, J., Bossy, C., Coynel, A., Larrose, A., Masson, M., Blanc, G., 2011a. Silver fluxes to the Gironde Estuary – 11 years (1999–2009) of monitoring at the watershed scale. *Appl. Geochem.* 26, 797–808.
- Lancelot, L., Schäfer, J., Chiffolleau, J.F., Audry, S., Auger, D., Renault, S., Baudrimont, M., Blanc, G., 2011b. Long-term (30 years) records and relationships of cadmium and silver contamination in sediment and oysters from the Gironde fluvial-estuarine continuum. *Chemosphere* 85, 1299–1305.
- Lancelot, L., Schäfer, J., Blanc, G., Coynel, A., Bossy, C., Baudrimont, M., Glé, C., Larrose, A., Renault, S., Strady, E., 2012. Silver behaviour along the salinity gradient of the Gironde Estuary. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 20, 1352–1366.
- Lemière, B., Clozel, B., Charbonnier, B., 2002. Etude de l'origine des pollutions métalliques naturelles du bassin versant de la Rade de Brest. BRGM/RP-51566-FR. <http://infoterre.brgm.fr/rapports/RP-51566-FR.pdf> (last accessed: June 2014).
- Martoja, R., Ballan-Dufrançais, C., Jeantet, A.Y., 1988. Effets chimiques et cytologiques de la contamination expérimentale de l'huître *Crassostrea gigas* Thunberg par l'argent administré sous forme dissoute et par voie alimentaire. *Can. J. Fish. Aquatic Sci.* 45, 1827–1841.
- Marigómez, I., Zorita, I., Izaguirre, U., Ortiz-Zarragoitia, M., Navarro, P., Etxebarria, N., 2013. Combined use of native and caged mussels to assess biological effects of pollution through the integrative biomarker approach. *Aquat. Toxicol.* 136–137, 32–48.
- Masson, M., Blanc, G., Schäfer, J., 2006. Geochemical signals and source contributions to heavy metal (Cd, Zn, Pb, Cu) fluxes into the Gironde Estuary via its major tributaries. *Sci. Total Environ.* 370, 133–146.
- Masson, M., Blanc, G., Schäfer, J., Parlanti, E., Le Coustumer, P., 2011. Copper addition by organic matter degradation in the freshwater reaches of a turbid estuary. *Sci. Total Environ.* 409, 1539–1549.
- Monperrus, M., Krupp, E., Amouroux, D., Donard, O.F.X., Rodriguez Martin-Doimeadios, R.C., 2004. Potential and limits of speciated isotope-dilution analysis for metrology and assessing environmental reactivity. *Trac-Trends Anal. Chem.* 23, 261–272.
- Parry, H.E., Pipe, R.K., 2004. Interactive effects of temperature and copper on immunocompetence and disease susceptibility in mussels (*Mytilus edulis*). *Aquat. Toxicol.* 69, 311–325.
- Petit, J.C.J., Schäfer, J., Coynel, A., Blanc, G., Deycard, N., Derrien, H., Lancelot, L., Dutrich, L., Bossy, C., Mattioli, N., 2013. Anthropogenic sources and biogeochemical reactivity of particulate and dissolved Cu isotopes in the turbidity gradient of the Garonne River (France). *Chem. Geol.* 359, 125–135.
- Rementeria, A., Mikolaczyk, M., Lancelot, L., Blanc, G., Soto, M., Zaldibar, B., Schäfer, J., 2014. Use of a battery of cell and tissue level biomarkers to assess the effect of sublethal concentrations of ⁶³Cu and ¹⁰⁷Ag stable isotopes in oysters *Crassostrea gigas* after direct exposure. In: XIV International Symposium on Oceanography of the Bay of Biscay (ISOBY), 11–13 June 2014, Bordeaux, France. Abstract n° 69.
- Ringwood, A.H., McCarthy, M., Bates, T.C., Carroll, D.L., 2010. The effects of silver nanoparticles on oyster embryos. *Mar. Environ. Res.* 69, 49–51.
- Scheuhammer, A.M., Cherian, M.G., 1986. Quantification of metallothioneins by a silver-saturation method. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 82, 417–425.
- Strady, E., Schäfer, J., Baudrimont, M., Blanc, G., 2011a. Tracing cadmium contamination kinetics and pathways in oysters (*Crassostrea gigas*) by stable Cd isotope spike experiments. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 74, 600–606.
- Strady, E., Kervella, S., Blanc, G., Robert, S., Stanisiere, J.Y., Coynel, A., Schäfer, J., 2011b. Spatial and temporal variations in trace metal concentrations in surface sediments of the Marennes Oléron Bay. Relation to hydrodynamic forcing. *Cont. Shelf Res.* 31, 997–1007.
- Veldhuizen-Tsoerkan, M.B., Holwerda, D.A., De Bont, A.M.T., Smaal, A.C., Zandee, D.J., 1991. Anoxic survival time and metabolic parameters as stress indices in sea mussels exposed to cadmium or polychlorinated biphenyls. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 20, 259–265.
- Zamuda, C.D., Sunda, W.G., 1982. Bioavailability of dissolved copper to the American oyster *Crassostrea virginica*. I. Importance of chemical speciation. *Mar. Biol.* 66, 77–82.
- Zuykov, M., Pelletier, E., Harper, D.A.T., 2013. Bivalve mollusks in metal pollution studies: from bioaccumulation to biomonitoring. *Chemosphere* 93, 201–208.

4.3. Etude préliminaire de la bioaccumulation de Ag et Cu après une contamination par voie trophique / Preliminary study of copper and silver bioaccumulation in oyster *Crassostrea gigas*, after trophic exposure to stable isotopes)

As the trophic pathway is known to be of importance in metal transfers along the food chain (Amiard et al., 2004; Ettajani et al., 1992a; Perrein et al., 1999; Strady et al., 2011), this preliminary study aimed to implement an innovative protocol to observe the trophic co-contamination kinetics in oyster *Crassostrea gigas*. The contamination tracking-method using stable isotope spike incubations is a potent way to trace the metals bioaccumulation (Croteau et al., 2004; Mikolaczyk et al., 2015; Strady et al., 2011), which deserves to be tailored to the different experimental contamination methods.

The experiment design included two main consecutive steps: (i) microalgae exposure to contaminants and (ii) oysters contamination by algae feeding, both protocols having their own specificities and constraints. These two parts will be developed separately in the following discussion.

4.3.1. Experimental study on Ag and Cu uptake by the marine algae *Isochrysis galbana*, a primary producer, after direct exposure to stable isotopes

The brown microalgae *Isochrysis galbana* were exposed to isotopic contaminants ^{107}Ag (500 ng.l^{-1} , groups A, C, E and G) and ^{63}Cu (8600 ng.l^{-1} , groups B, C, F and G) for 24 hours (c.f. 2.1.1.4.). Preliminary results of the calculated $^{107/109}\text{Ag}$ and $^{63/65}\text{Cu}$ isotopic ratios in algae were significantly modified after this short-time experiment accordingly to the exposure conditions (Fig. 4.1), reflecting the effective accumulation of Ag and Cu by algae.

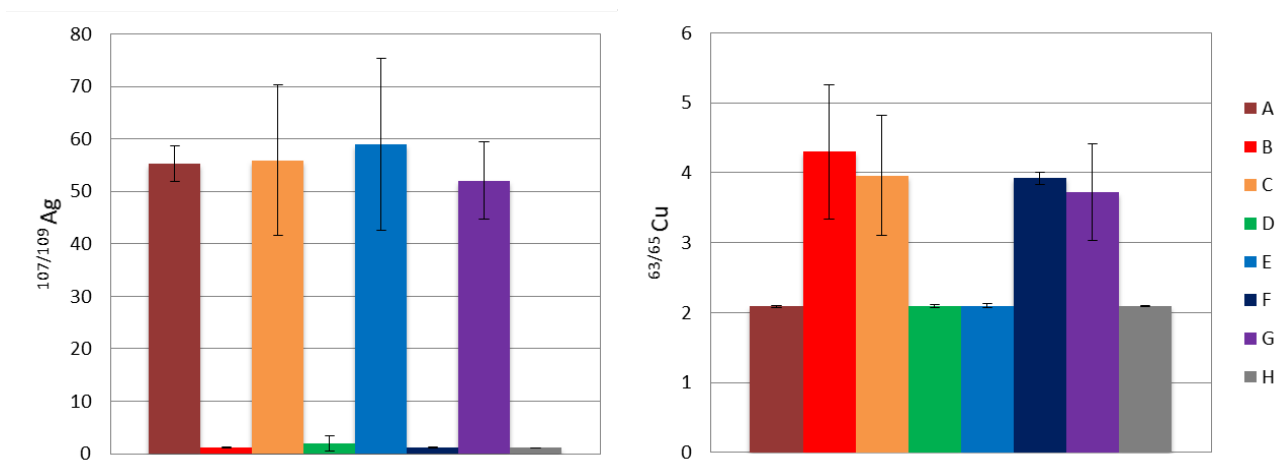


Figure 4.1: Average isotopic ratios and standard deviations measured in algae *Isochrysis galbana* sampled at T0, T7, T14 and T21 (n=4) of the experimentation after 24 hours of exposure for each experimental condition (groups D and H: controls).

In the unspiked tanks (without ^{107}Ag and/or ^{63}Cu contamination), algae presented natural isotopic ratios values ($^{107/109}\text{Ag}_{\text{nat}}=1.08$ and $^{63/65}\text{Cu}_{\text{nat}}=2.24$) whereas isotopic ratios were clearly modified in the experimental units: 1.34 ± 0.43 for $^{107/109}\text{Ag}$ (tanks B, D, F and H) and 2.09 ± 0.02 for $^{63/65}\text{Cu}$ (tanks A, D, E, and H). However, the isotopic ratios of algae contaminated with ^{107}Ag evolved much stronger than those presented by algae exposed to ^{63}Cu , with average isotopic ratios reaching 55.6 ± 10.4 for $^{107/109}\text{Ag}$ (~ 50 times higher than the natural ratio) but only 3.97 ± 0.94 for $^{63/65}\text{Cu}$ (Fig. 4.1). The calculated uptake rates indicate that Ag and Cu incorporation in the algae was from the metal spikes of $98.1\pm0.16\%$ and $63.1\pm8.30\%$ respectively after 24 hours of exposure, which confirmed the significantly higher Ag uptake.

In the previous study on the Ag and Cu bioaccumulation in oysters by the direct pathway (c.f. 4.2.), isotopic ratios variations measured in oysters already differed between the both metals, but at a lower extent: $^{107/109}\text{Ag}$ after 28 days of exposure was about 6 times higher than $^{107/109}\text{Ag}_{\text{nat}}$ (Mikolaczyk et al., 2015). The disproportionality of bioaccumulation between the two metals after direct exposure seems thus stronger for the primary producer *Isochrysis galbana* than for organisms located upper in the food chain, e.g. oyster *Crassostrea gigas* exposure. Bossuyt and Janssen (2005) observed the ability of the green algae *P. subcapitata* to regulate Cu for concentrations up to $5\text{ }\mu\text{g.l}^{-1}$, which is lower than ambient dissolved Cu concentrations used in our study ($8.60\text{ }\mu\text{g.l}^{-1}$). For higher exposure levels, the authors observed an increase in Cu absorption by algae involving storage mechanisms, probably due to the action of phytochelatin for metal storage (Ahner and Morel, 1995; Kapkov and Belenikina, 2007;

Perrein et al., 1999). These observations are consistent with our results showing a visible Cu accumulation in algae through the $^{63/65}\text{Cu}$ isotopic ratio variations (Fig.4.1).

The disproportionality between Ag and Cu bioaccumulation in algae could reflect different mechanisms, mainly related to the nature of these metals and natural processes affecting their bioavailability or regulation in organisms.

Indeed, prior to their accumulation in organisms, the bioavailability of metals can be affected by the presence of natural ligands in the water (Campbell et al., 2002; Sunda and Lewis, 1978). Copper chelation by natural organic ligands occurring in water may decrease its bioavailability to phytoplankton by reducing the free-copper activity (Sunda and Lewis, 1978). On the other hand, the Ag complexation with thiosulfate (forming AgS_2O_3^- and $\text{Ag}(\text{S}_2\text{O}_3)_{23}^-$ complexes) enhances its uptake by the algae (Fortin and Campbell, 2001; Hiriartbaer et al., 2006), contrariwise to predictions by the metal-organism model proposed by Campbell et al., (2002). The extent of the natural ligands impact on metals bioavailability will depend on (i) the affinity of metals to the ligands, (ii) the occurrence of complexes in the aquatic media, and (iii) the membrane permeability to the formed complexes (Campbell and Couillard, 2004; Fortin and Campbell, 2001). Furthermore, the accumulation difference between the both metals could be related to the Cu affinity for the organic matter (OM), which can lead to its complexation with the OM initially present and/or excreted by algae during their incubation time (Brown et al., 1988; Perrein et al., 1999; Visviki and Rachlin, 1994), decreasing its bioavailability. Conversely, the strong affinity of Ag for Cl^- , allows to maintain it as dissolved molecules, which could induce high bioavailability of Ag. After metal uptake, different regulation mechanisms may also modify accumulation rates. Essential elements are regulated in terms of uptake, storage and excretion. As such, Cu could be more easily excreted than Ag. The competition for metallothioneins (MT) binding sites could explain higher Ag accumulation in algae, as Ag is known for its affinity for the thiol groups (Bell et al., 1997), leading to its greater affinity for metallothioneins than essential metals as Cu (Amiard et al., 2004; Otvos et al., 1993).

These preliminary results did not allow to conclude on any synergic effect of Cu presence on Ag accumulation previously described for algae (Ballan-Dufrançais et al., 1991), or antagonistic effect of Ag on Cu uptake as observed in previous studies for higher-consumer species in the food chain (e.g. marine invertebrates; Amiard et al., 2004; Ettajani et al., 1992a;

Mikolaczyk et al., 2015). Further investigations are needed to describe precisely the interactions between Ag and Cu playing a role in their bioaccumulation in microalgae *Isochrysis galbana*.

4.3.2. Experimental study on Ag and Cu uptake by pacific oyster *Crassostrea gigas* after trophic exposure to contaminated brown algae *Isochrysis galbana*

Pacific oysters *Crassostrea gigas* were daily exposed by trophic pathway to ^{107}Ag and ^{63}Cu using contaminated algae *Isochrysis galbana* for 21 days (c.f. 2.1.1.4).

At the end of the experiment, the isotopic ratios measured in oysters (and their different tissues) exposed to contaminants were not significantly different to natural values ($^{107/109}\text{Ag}_{\text{nat}}=1.08$ and $^{63/65}\text{Cu}_{\text{nat}}=2.24$) regardless of the exposure condition suggesting the absence of measurable metal accumulation by the oysters during the experiment (Tab. 4.1).

Table 4.1: Isotope ratios ($^{107/109}\text{Ag}$ and $^{63/65}\text{Cu}$) in oysters at the beginning of the experiment (T0) and after 21 days of exposure.

Sampling time	Tank	Exposure conditions	n	$^{107/109}\text{Ag}$	$^{63/65}\text{Cu}$
T0	-	-	n=5	1.07 ± 0.04	2.04 ± 0.02
T21	A	^{107}Ag	n=3	1.22 ± 0.07	2.03 ± 0.02
T21	B	^{63}Cu	n=3	1.12 ± 0.07	2.05 ± 0.03
T21	C	^{107}Ag and ^{63}Cu	n=3	1.12 ± 0.05	2.08 ± 0.04
T21	D	control	n=3	1.09 ± 0.04	2.05 ± 0.02

According to the literature (Ettajani et al., 1992a; Martoja et al., 1988; Strady et al., 2011), these results could be explained by the relatively short-time exposure (21 days) of oysters to the trophic contamination in addition to the low exposure level (500 ng.l^{-1}). Furthermore, previous studies shown that metal (Ag and Cu) trophic transfers are insignificant in numerous marine invertebrates, especially in oysters (Abbe and Sanders, 1990; Connell et al., 1991; Fisher and Wang, 1998), or less important source than those due to direct water exposure (Ettajani et al., 1992b; Fisher and Wang, 1998; Martoja et al., 1988; Strady et al., 2011). Strady et al. (2011) traced simultaneous the trophic and direct Cd contamination using stable Cd isotopes ($20 \text{ } \mu\text{g.l}^{-1}$). They estimated that trophic Cd uptake rate represented only 1% of the total metal transfer

after 28 days of exposure. Given the fact that Ag, like Cd, predominantly forms chlorocomplexes in seawater, one may expect similar uptake and regulation mechanisms. As Ag concentrations in this experiment were 40 to 400 times lower than Cd concentrations used in Strady et al. (2011), this may partly explain the absence of a measurable accumulation. The metal fraction generally the most available for oysters by the trophic pathway is the cytosolic fraction (Bielmyer-Fraser et al., 2014). As Ag is rapidly adsorbed on the cell surface (Connell et al., 1991), it seems to be less bioavailable than Cu which is used by algae for enzyme functioning (Bielmyer-Fraser et al., 2014), thus probably more incorporated to the algae cytosol.

Unfortunately, this study did not allow to observe the trophic bioaccumulation of Ag and Cu in oysters, neither to determine if this is related to their non-uptake or their excretion in the faeces. Further investigations are needed to complete these results. As the present work represents the first trophic co-exposure protocol using such low Ag and Cu exposure levels (~100 times Ag_d and ~10 times Cu_d concentrations in the Gironde Estuary; Dabrin, 2009; Lanceleur et al., 2012), we can thus suppose that the experiment should be extended to a longer exposure period, to verify if these results are really time-dependent trying to define an accumulation kinetic.

4.3.3. Summary and improvement perspectives

To our knowledge, this preliminary work constitutes the first study of algae co-exposure to both metals Ag and Cu by using of stable isotopic spikes, in order to observe metal interactions on bioaccumulation strategies.

Preliminary results indicate significant accumulation of both metals by the brown algae *Isochrysis galbana*, with a greater accumulation of ^{107}Ag compared to the ^{63}Cu . Facing the various hypotheses discussed above, the experimental protocols of future experiments should be improved to understand the processes, which led to our results:

- The addition of a chelating agent as EDTA in the experimental process (Bielmyer et al., 2006; Hiriartbaer et al., 2006; Sunda and Lewis, 1978) to wash the algae cells could be a way to discriminate metal adsorption and absorption on/in the cells, allowing to (i) estimate the amounts of Ag and Cu subjected to internal binding and/or excretion mechanisms, and (ii) obtain estimates of the amounts really bioavailable to oysters.
- Another way to observe the accumulation of metals by the algae cells could be the quantification of the natural chelators as metallothioneins and phytochelatins. However,

this option seems to be complex and less precise facing the different affinities of metals for the binding sites.

- An experiment using metal concentration gradients could be efficient to observe metal-metal interactions.

The oysters exposed to Ag and Cu by trophic pathway did not show any measurable metal bioaccumulation. In a future experiment, the collection and analyses of the oyster faeces would allow to see if the unchanged isotopic ratios observed in exposed oysters were related to the excretion of metals or their non-uptake.

Presently we are not able to determine if the Ag and Cu organotropisme observed in wild oysters from the Gironde Estuary is related to the long-term exposure to one or the other of the contamination pathways. Summarizing, it seems important to develop an environmentally-realistic protocol which could allow to precise the role of the trophic and direct pathway in contamination of wild oysters used for biomonitoring programs.

4.4 Conclusion

Le présent travail a permis de répondre aux objectifs décrits en introduction par le développement et la validation d'une nouvelle approche expérimentale utilisant le dopage isotopique. Il s'agit ici de la première étude des cinétiques et synergies de bioaccumulation par voie directe de Ag et Cu utilisant les isotopes stables des métaux comme traceurs de bioaccumulation.

Exposition par voie directe

Les résultats des incubations d'huîtres de culture avec des concentrations variables de ^{107}Ag et ^{63}Cu ont clairement permis de mettre en évidence que :

- ✓ l'accumulation de Ag et Cu par voie directe dans les différents organes des huîtres est très rapide et mesurable à partir des rapports isotopiques modifiés après seulement 7 jours d'exposition
- ✓ pour des niveaux d'exposition proches des concentrations environnementales, la bioaccumulation de Ag est intensifiée en fonction de la concentration ambiante en Cu dissous, tandis que l'accumulation de Cu est réduite en présence accrue de Ag

- ✓ les rapports élémentaires Cu/Ag des métaux accumulés après 28 jours d'incubation indiquent une régulation de l'accumulation de Cu pour la gamme de concentrations utilisée. Pour des concentrations en Ag de 50 ng.l⁻¹, celui-ci est accumulé suivant des proportions constantes par rapport à Cu au cours du temps, suggérant une co-régulation pour ces deux métaux. Cependant pour les niveaux d'exposition supérieurs en Ag (500 ng.l⁻¹) le rapport Cu/Ag décroissant au cours du temps indique une limitation du pouvoir de régulation de Ag.

Ainsi, la méthode du dopage isotopique s'est avérée très puissante pour tracer des processus de transfert eau-biotte et ceci à des niveaux de concentrations réalistes. Ceci la distingue fondamentalement de la plupart des études écotoxicologiques classiques qui nécessitent des niveaux d'exposition très élevés pour des études d'exposition courtes et/ou des traitements statistiques afin de pouvoir détecter une réponse significative par rapport aux limitations analytiques, à la durée d'exposition, à la variabilité inter-individuelle, etc... Couplé à l'organotropisme, le dopage isotopique permet une quantification simultanée de i) l'accumulation de plusieurs métaux dans les différents organes après un temps d'exposition restreint, et ii) d'y calculer la concentration initiale (avant exposition) pour les mêmes métaux en utilisant dans chaque organisme individuel leurs rapports isotopiques naturels. Ceci apporte une réelle plus-value à la méthode, car inaccessible lors des incubations élémentaires classiques. En effet, l'expérimentation nécessite la comparaison des résultats avec ceux d'un lot d'organismes de référence (e.g. T0 ou lot témoin qui possèdent leur propre variabilité interindividuelle), l'échantillonnage de l'organisme (sacrifice) ne pouvant avoir lieu qu'une fois.

Au niveau écologique, ce travail a permis une bonne modélisation des conditions environnementales, confirmant la pertinence de l'utilisation d'incubation par dopage isotopique comme outil de compréhension des processus écotoxicologiques *in situ*, et celle des huîtres comme bons indicateurs de la pression environnementale :

- ✓ les huîtres de l'expérimentation soumises à une contamination par voie directe présentaient le même type d'altérations histologiques (c.f. Rementeria et al., accepté, c.f. Annexe 2) ainsi que des rapports élémentaires Cu/Ag similaires à ceux observés dans les huîtres sauvages de l'estuaire de la Gironde (cf. Chapitre 3)

- ✓ les variations des rapports élémentaires Cu/Ag mesurés dans les huîtres au cours du temps et en fonctions des différentes conditions d'exposition, ont montré une variation sous l'effet de l'augmentation de la pression en Ag (de 50 à 500 ng.l⁻¹ de Ag). Cette constatation viendrait confirmer l'hypothèse émise dans le chapitre 3 suivant laquelle le rapport élémentaire Cu/Ag mesuré dans les huîtres sauvages serait majoritairement contrôlé par les variations de pression en Ag, alors que Cu serait plus facilement régulé par les organismes.
- ✓ les résultats de l'organotropisme montrant une répartition équivalente des métaux entre les différents organes, contrairement aux huîtres sauvages de La Fosse (estuaire de la Gironde) qui présentaient une accumulation préférentielle dans la glande digestive, cette observation suggère un rôle de la voie trophique dans la contamination des huîtres sauvages girondines qui reste encore à préciser.

Exposition par voie trophique

En l'état actuel, le protocole mis en place dans cette étude n'a pas permis de conclure sur la contamination trophique des huîtres. En effet les huîtres exposées aux contaminants pendant 21 jours ont montré des rapports isotopiques inchangés et nous ne sommes actuellement pas en mesure d'en expliquer les raisons précises. De futurs travaux devront donc se focaliser sur l'étude du rôle de la voie trophique dans la contamination des bivalves en zone côtière afin d'en améliorer la compréhension et de tester les différentes hypothèses pouvant expliquer les résultats observés :

- ✓ Un temps d'exposition plus long en incluant la voie trophique, rendrait également possible une comparaison avec les niveaux de contamination observés dans les huîtres sauvages
- ✓ La récupération et l'analyse des fecès permettrait de mieux identifier les processus (absorption/excrétion) intervenant dans la gestion de ce type de contamination par les huîtres.

Par ailleurs, l'élargissement du champ d'application de cette nouvelle méthode expérimentale à d'autres métaux et des organismes différents, y compris des systèmes continentaux, amènerait un approfondissement des connaissances sur les mécanismes géochimiques d'environnements spécifiques.

Chapitre 5

Mobilisation de Ag et Cu à partir de particules fluviales : cinétiques et estimations opérationnelles de la fraction potentiellement biodisponible en milieu estuarien - cas de la Gironde

5.1. Introduction

Dans un contexte industriel, urbain et agricole avec un attrait croissant pour l'emploi des nanoparticules métalliques dans un large éventail de domaines d'applications, ceci ajouté aux conséquences actuelles des activités métallurgiques passées, les environnements aquatiques, notamment ceux à l'interface continent-océan, restent soumis à une pression significative de pollution polymétallique.

Depuis les années 1980, la mise en place de nombreux réseaux de biosurveillance au niveau international représente un outil incontournable dans le suivi temporel de ces pressions côtières. Or l'accumulation des métaux dans les organismes marins, notamment les mollusques filtreurs suspensivores (huîtres et moules principalement), dépend principalement de la répartition des métaux entre la phase particulaire et dissoute (Rieuwerts et al., 1998), la phase dissoute étant considérée comme la plus biodisponible pour les huîtres (Abbe and Sanders, 1990; Ettajani et al., 2001). Cette spéciation est elle-même contrôlée par de nombreux facteurs tels que des phénomènes d'adsorption, de précipitation, de complexation, ou encore par la variation du pH de l'eau ou de la concentration en matière organique. Dans l'estuaire de la Gironde, la désorption de Ag et sa stabilisation en solution sont favorisées par la formation de chlorocomplexes (Barriada et al., 2007), alors que la dégradation de la matière organique est le principal moteur de la solubilisation de Cu (Masson et al., 2011). La fraction désorbable sous l'effet du contact de sédiments de rivière avec l'eau de l'estuaire peut être estimée à partir d'extractions utilisant de l'eau de mer. La biodisponibilité d'une substance liée au sédiment ne se résume cependant pas à sa capacité de solubilisation dans la colonne d'eau (Amiard, 2011). En effet, certains organismes aquatiques (e.g. espèces endogées ou benthiques) se nourrissent par ingestion de sédiments, et les métaux peuvent alors être désorbés à l'intérieur de leur tube digestif (Fan et al., 2002; Geffard et al., 2005; Kalman and Turner, 2007; Luoma, 1989). Plusieurs études ont précédemment basé leurs estimations de la fraction mobilisable à l'intérieur de l'intestin des organismes à l'aide d'extractions utilisant l'albumine de sérum bovin (ou BSA), une protéine visant à mimer les capacités chélatantes des fluides intestinaux des organismes détritivores (Chen and Mayer, 1998; Jones and Turner, 2010; Kalman and Turner, 2007; Zhong and Wang, 2006).

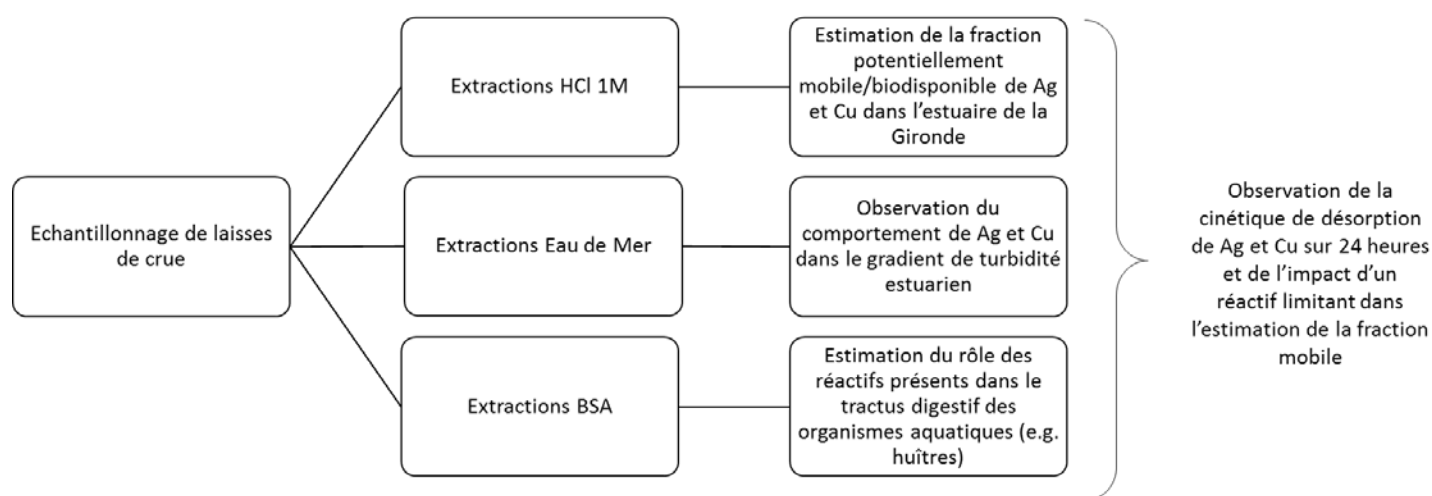
De nombreuses études ont utilisé des expérimentations de lixiviations de sédiments à l'HCl 1M afin d'estimer les fractions potentiellement biodisponibles des métaux (Campbell, 1988; Luoma, 1989; Sutherland et al., 2001), concluant que les quantités de métaux désorbées avec de l'HCl étaient comparables aux conditions environnementales (Brügmann, 1995).

Cependant, la diversité des protocoles expérimentaux, différant par les concentrations en sédiments et leurs temps d'exposition aux réactifs, rend les résultats difficilement comparables entre eux. Ces paramètres impactant par ailleurs la mobilisation des métaux, il apparaît important de préciser leur rôle dans l'efficacité des extractions.

Ce travail a consisté à estimer les fractions mobilisables d'Ag et Cu à partir de sédiment frais de laisses de crue (sédiment de rivière), à l'aide d'eau de mer, de HCl 1 M et de BSA. Par conséquent, les objectifs de ce chapitre ont été de:

- ✓ déterminer la fraction potentiellement biodisponible de Ag et Cu de laisses de crue entrant dans l'estuaire de la Gironde,
- ✓ améliorer l'état des connaissances sur les processus estuariens de désorption de Ag et Cu,
- ✓ comparer les résultats d'estimation de la biodisponibilité estuarienne de Ag et Cu obtenus par l'utilisation de trois approches opérationnelles différentes dans un gradient de turbidité.

Rappel de la stratégie d'investigation de ce chapitre :



5.2. Cas de Ag : Article #3

Experimental study of Ag mobilization from flood particles: desorption kinetics and estimations of bioavailable fraction applied to the Gironde Estuary case.

Mathilde Mikolaczyk, Laurent Lanceleur, Jörg Schäfer*, Thomas Gardes, Cécile Bossy, Lionel Dutruch, Gérard Blanc.

*corresponding author: jorg.schafer@u-bordeaux.fr

Université de Bordeaux, UMR 5805 EPOC, Allée Geoffroy St. Hilaire, CS 50023, 33615 Pessac cedex, France

Abstract

In the present study, we assessed the Ag mobilized fraction by parallel extractions in order to compare the efficiency of different experimental conditions in metal bioavailability predictions. Freshwater sediments (0.1 g.l^{-1} , 1 g.l^{-1} , and 20 g.l^{-1}) were exposed to HCl 1M, seawater or Bovine Serum Albumin (BSA), for 24 hours. The half of extraction batch was run in kinetic mode, with intermediate sampling time at 2, 4, and 6 hours of exposure, with a reagent renewal (R) after each sampling. The other experimental batch (NR) was sampled only at the beginning and the end of the experiment.

The final extraction rates calculated from the initial metal content were ranged from $33.7 \pm 2.67 \%$ to $61.2 \pm 5.34 \%$ for HCl 1M extractions, from $0.07 \pm 0.02 \%$ to $39.4 \pm 31.1 \%$ for seawater extractions, and from $4.16 \pm 4.54 \%$ to $62.2 \pm 3.36 \%$ for BSA extractions, depending on the experimental conditions.

The results showed the necessity of using environmental sediment concentrations (0.1 g.l^{-1}) or reagent renewal for high sediment concentrations (1 g.l^{-1} , and 20 g.l^{-1}) to avoid important under-estimations of potential metal bioavailable fraction.

Mass balance using the experimental mobilization rates suggested a potential mobilization of 62.5% of Ag_p after 24 hours of exposure to HCl 1M. Using this estimation, the amount of potentially bioavailable dissolved Ag net flux was estimated at 0.27 t.year^{-1} for the year 2015.

Keywords

Bioavailability; metals; exchangeable fraction; Gironde Estuary; sediment extraction

1. Introduction

The Gironde Estuary, located in the South West of France, is the widest European Estuary. It is historically known for its metal contamination, discovered in the late 1970's due to high Cd concentrations measured in oysters from the estuary mouth by the French Mussel Watch Program (RNO/ROCCH, Ifremer - envlit). The stop of the industrial activity and three decades of remediation works in the source area (a former metal industry site in the hinterland; e.g. (Audry et al., 2004b; Coynel et al., 2009) combined with controlled sediment management in the Lot-Garonne-Gironde fluvial-estuarine system have contributed to a strong decrease of Cd in the Gironde wild oysters, but the current Cd contamination in oysters (25.9 mg.kg^{-1} in 2010; (Lanceleur et al., 2011b) is still too high for commercial purposes and/or human consumption ($5 \text{ } \mu\text{g.g}^{-1}$, dw; CE N°466/2011). More recently, biomonitoring and geochemical studies have reported on severe anomalies concerning silver (Ag) concentrations in Gironde Estuary oysters with increasing concentrations during the last decade (Chiffolleau et al., 2005; Lanceleur et al., 2011b). Together with Cd and Cu, Ag concentrations in the Gironde oysters are the highest of all sites along the whole French Atlantic coast covered by the national Mussel Watch program (Chiffolleau et al., 2005; Ifremer - envlit; Mikolaczyk et al., in prep.). Long-term biomonitoring data show that Ag concentrations in wild oysters are generally higher at the sites near to river mouths, clearly pointing at continental sources (Chiffolleau et al., 2005).

In fluvial systems, metals such as Ag are mostly transported under their particulate form (Ag_p ; Lanceleur et al., 2011), making their arrival in the estuarine zones highly dependent on hydrological parameters (Lanceleur et al., 2013). In fact, during major flood events rivers can transport the majority of annual suspended particular matter (SPM) fluxes and associated metal loads in only few days (Coynel et al., 2007). Although there is limited information about total (particulate + dissolved) Ag fluxes for some rivers (e.g. (Lanceleur et al., 2011a; Rozan and Hunter, 2001), the fraction transferred from the particulate to the dissolved phase due to estuarine biogeochemical processes remains widely unknown. Particulate continent-ocean transport and subsequent transformation (e.g. desorption) processes along estuarine geochemical gradients constitute an important source of potentially bioavailable Ag for coastal aquatic organisms such as marine invertebrates and phytoplankton (Barriada et al., 2007; Lanceleur et al., 2013).

It is commonly accepted, the bioavailability of metals for aquatic organisms is strongly dependent on the metal partitioning between the solid and solution phases (Rieuwerts et al., 1998), and the direct exposure to dissolved metals is considered as the major contamination pathway for filter-feeders as oysters (e.g. (Abbe and Sanders, 1990; Ettajani et al., 2001). Complexation and desorption of Ag from freshwater sediments due to increasing contact with chloride in the estuarine salinity gradient is a major process transferring Ag from the particulate to the dissolved phase (Barriada et al., 2007), potentially accounting for $96 \pm 2\%$ of the initial particulate Ag load entering into the estuary (Lanceleur et al., 2013). This fraction can be operationally assessed by selective extractions using seawater.

Many studies have used acids extractions, such as HCl 1M soil-washings to estimate the potentially bioavailable metal fractions (Campbell, 1988; Cline and Reed, 1995; Luoma, 1989; Sutherland et al., 2001), and described metals released by HCl extractions as environmentally relevant (Brügmann, 1995). However, existing extraction protocols and the resulting experimental conditions are varied (Sutherland and Tack, 2008) and strongly differ in the particle load (from 0.25 to 100 g.l⁻¹; Tab 5.1) and extraction time (from 30 min to 96 h; Tab. 5.1). Assuming that these two parameters could have a major impact on metals mobilisation (Jones and Turner, 2010), it appears to be important to more precisely define their roles in extraction efficiency.

In marine sediment-feeding invertebrates metal accumulation is controlled by biochemical processes after particle uptake, involving the acidity of the digestive system (pH ~ 3 for marine invertebrates; (Owen, 1966; Trefry and Metz, 1984) and the digestive enzymes action (Weimin et al., 1992). Therefore, additional extraction methods have been developed to simulate in-vivo mobilisation of metals using extracting agents supposed to reproduce conditions in the digestive organs of marine invertebrates (e.g. bovine serum albumin BSA, sodium taurocholate; (Jones and Turner, 2010; Kalman and Turner, 2007).

In the present work we have assessed the fractions of Ag mobilised from freshwater sediment by extractions with (i) seawater, (ii) HCL 1M, according to different commonly applied protocols, and (iii) BSA. The aims of this study were to (i) estimate the potentially bioavailable fractions of Ag in flood sediments entering the Gironde Estuary, (ii) improve our understanding of the estuarine Ag desorption process in the, and (iii) compare the outcomes of three different operationally-defined approaches to estimate the potentially bioavailable Ag fraction in estuarine systems.

2. Material and methods

2.1. Sediment sampling

Flood sediments were sampled after flood events of December 2014 at the La Réole site on the Garonne River representing the upstream limit of dynamic tide in the Garonne-Gironde fluvial-estuarine continuum (Fig. 1). Only surface deposits ($< 2\text{mm}$), representative of fine-grained material (SPM) deposited on the river banks during the last floods were sampled with plastic spoons and stored in sealed bags. These sediments were stored at 4°C and in the dark until their use for the extraction experiments.

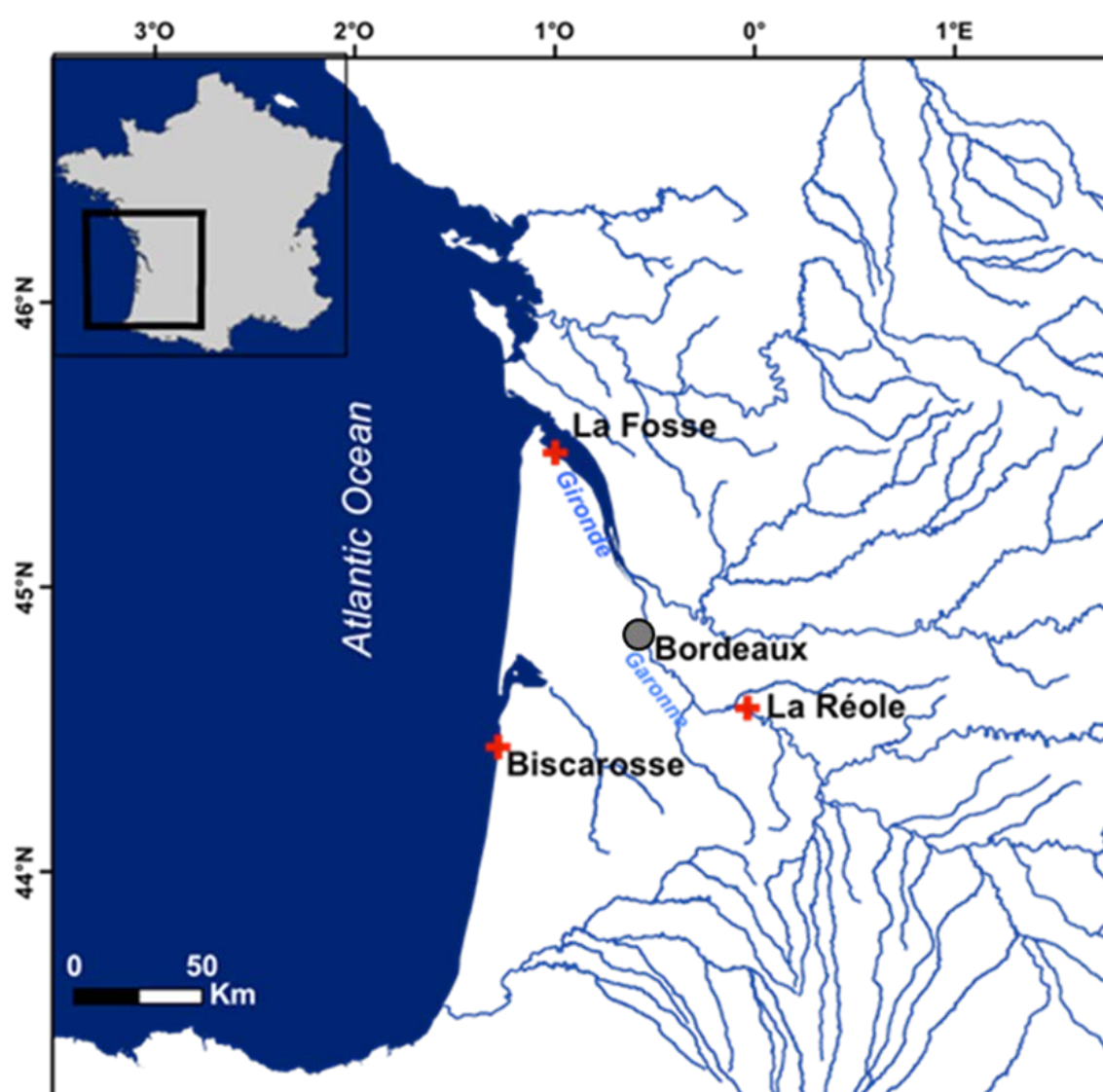


Figure 5.1: Map of the South West France, with the sampling sites for sediments (La Réole) and water (Biscarrosse), and the main site of wild oysters sampling in the Gironde Estuary (La Fosse).

2.2. Seawater sampling

Coastal seawater (salinity S=31) was sampled at Biscarosse Beach (Fig 1) in February 2015 with a 40L polypropylene container washed with HNO₃10% and thoroughly rinsed with seawater from the site before use. Then, this water was filtered (Whatman GF/F, < 0.45 µm), transferred into 1L acid-cleaned and filtrate-rinsed polyethylene bottles, and stored in a cold chamber at 4°C and in the dark.

2.3. Experimental setup

The extraction experiments used the sediments under their humid form, which allows to better represent the natural conditions of sediment suspension (Jones and Turner, 2010; Kalman and Turner, 2007; Villares et al., 2005).

A humid/dry factor (HDF) has been determined to allow for comparison of the present experiment with previous existing desorption protocols using dry sediments. To estimate this factor, 3 replicates of humid sediments were weighed precisely, placed for 24 hours in an oven (50°C), and then weighed again. The average value obtained for HDF was 2.09 ± 0.02 . This value was used to estimate equivalent dry and wet sediment masses for (i) the determination of the mass of humid sediments masses used in the present experiments and (ii) the subsequent comparison with other experimental results.

The experiment consisted of three different extractions following the same scheme but using specific extraction media: HCl 1M, seawater (S=31), and bovine serum albumin solution (BSA 5 g.l⁻¹).

- The extraction using HCl 1M (Suprapur, 14M, Merck) aimed to estimate the potentially bioavailable fraction of Ag of sediments from La Réole as commonly applied e.g. (Bryan and Langston, 1992).
- The extraction by natural coastal seawater was designed to simulate desorption processes due to chloride complexation as occurring in estuarine salinity gradients (e.g. Lanceleur et al., 2012).
- In the third extraction, BSA-seawater solution was employed to mimic metal mobilisation from particles due to the complexing capacities of proteins in the digestive tract of suspension feeders as oysters (Chen and Mayer, 1998; Zhong and Wang, 2006). The BSA concentration of 5 g.l⁻¹ (Voparil and Mayer, 2004) used in this study corresponds to an amino-acid concentration

usually observed in digestive systems of marine deposit-feeding invertebrates from the temperate zone (Mayer et al., 1997).

All the lab-ware (polypropylene) in contact with the samples was previously decontaminated by soaking in HNO_3 (normapure, Baker; 10% v/v) during 3 days, and then thoroughly rinsed three times with MilliQ[®] water. The lab-ware was dried under a laminar flow hood and stored in double, sealed polypropylene bags.

For each reagent, the experiment followed the same protocol. Extractions were performed for different solid/liquid ratios (SLR) expressed as sediment concentrations: 0.1 g.l^{-1} , 1 g.l^{-1} and 20 g.l^{-1} , with 3 replicates for each SRL condition. These SLRs were chosen because (i) they reflect turbidity gradients encountered in natural estuarine environments and (ii) they cover the experimental SLRs of published methods using HCl extractions to estimate the potentially bioavailable fraction (Tab. 5.1). In fact, SLRs of 0.1 g.l^{-1} to 20 g.l^{-1} reflect the range of suspended particular matter (SPM) concentrations which can be encountered in the turbidity gradient of the Gironde Estuary water, where SPM concentrations in the estuarine maximum turbidity zone (MTZ) are $\geq 1 \text{ g.l}^{-1}$ (Lanceleur et al., 2013; Sottolichio and Castaing, 1999). Furthermore, half of each extraction batch was run in kinetic mode, with sampling after 2, 4, 6 and 24 h with renewal of extracting reagents at each sampling step and the other half was extracted during 24 h without sampling and reagent renewal. Again, this approach provides insights in the temporal (kinetic) aspects of extractions and covers the range of extraction times previously published for some of the extraction protocols (Tab. 5.1).

For each batch, 200ml polypropylene centrifugation tubes (NUNK +detail) were filled with mass of humid freshwater sediment corresponding to the nominal SLR and 200ml of reagent (HCl 1M, seawater or BSA-solution). The sediments were then extracted in an overhead tumbling shaker to avoid particle sedimentation between the sampling times. After 2, 4, and 6 hours, half of the tubes was removed from the automatic shaker and centrifuged 7 minutes at 3000 RPM (Jones and Turner, 2010). Then 50ml of the supernatant were sampled, filtered ($0.2 \mu\text{m}$, Whatman) and stored in the dark at 4°C pending analysis. The seawater samples were acidified to $\text{pH} < 2$ by adding HNO_3 (ultrex 14M, Baker). The rest of the supernatant was discarded and 200 ml of fresh extracting reagent was added to the sediment in the tubes before placing the falcons on the shaker again. After 24 hours, all the tubes, i.e. with and without renewal of extracting solutions, were removed from the shaker, centrifuged and 50ml of

supernatant was sampled as explained above. The tubes with the sediments residues were dried in an oven at 50°C for 48 hours, grinded, homogenized and stored pending digestion.

2.4. Sample preparation and analyses

Depending on the sampling matrix different sample preparations were necessary prior to analysis by Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry (ICP-MS; Thermo, X7 Series II). The experimentally extracted Ag fractions were estimated by analysing the dissolved fraction (supernatants) for HCl 1M and seawater extraction experiments, allowing for direct comparison of the kinetics and extraction efficiencies. Similarly, analysing the residual solid fraction (sediments) for both seawater and BSA-solution experiments allowed for direct comparison of final Ag extraction efficiencies after 24 h.

2.5.1. Sediment digestion

Total digestion of 30 mg aliquots of grinded sediment residues from seawater and BSA-solution extractions was performed in 50 ml tubes (DigiTUBES, SCP SCIENCE) in a heating block using 1.5 ml of HCl (12M, Suprapur, Merck), 0.5 ml of HNO₃ (14M, Suprapur, Merck), and 2 ml of HF (22M, Suprapur, Merck). The tubes were heated for 2 hours at 110°C and the solutions were evaporated to near-dryness and the residue was dissolved by adding 250 µl of HNO₃ (14M, Suprapur, Merck) and 5 ml of ultrapure MilliQ[®] water and heating to 80°C during 15 minutes (Blanc et al., 1999; Schäfer et al., 2002).

2.5.2. Analytical procedures

The sediment digestates and the supernatant solutions from the HCl 1M extractions were diluted 5 and 2 times, respectively, with MilliQ[®] water and analysed using external calibration (standard solutions purchased from PLASMACAL, SCP SCIENCE). Dissolved Ag (Ag_d) concentrations in seawater extracts were measured by ICP-MS using on-line separation and pre-concentration with a chelating resin (DOWEX 1X8, 200-400 mesh, Supelco) and calibration was performed by isotope dilution as described in Lanceleur et al. 2013 (ID-ICP-MS adapted from (Barriada et al., 2007; Ndung'u et al., 2006; Yang and Sturgeon, 2002).

Briefly, 12 ml sample aliquots were spiked with 50 µl of a ¹⁰⁷Ag-enriched solution (0.744 ng.ml⁻¹, purity 99.1 % ¹⁰⁷Ag; Oak Ridge National Laboratory, Tennessee, USA) 24h before analysis, and stored at 4°C during this equilibration. After this equilibration time, the 12 ml samples were passed through a column (5 cm length, 2.1 mm Ø, Interchim) filled with an anion-exchange

resin (DOWEX 1X8, 200-400 mesh, Supelco) beforehand rinsed with MilliQ[®] water and HNO₃ 2M (Plasmapur, SCP Science, Baker). The saline matrix was eliminated with 6 ml of MilliQ[®] water, and the Ag_d was then eluted with 3 ml of HNO₃ 2M on-line with the ICP-MS.

The measured ¹⁰⁷Ag/¹⁰⁹Ag isotopic ratios were used to calculate Ag_d in the seawater extractions according to the equation 1 (Lanceleur et al., 2013; Rodríguez Martín-Doimeadios et al., 2003).

$$C_x = C_y \times \frac{m_y}{m_x} \times \frac{A_y - B_y \times R_n}{B_x - R_n - A_x} \times \frac{AW_x}{AW_y}$$

Equ. 1: Principle of the isotope dilution calibration with:

C_x: Ag concentration in the sample (ng.mL⁻¹)

C_y: ¹⁰⁷Ag concentration in the ¹⁰⁷Ag-spike solution (ng.l⁻¹)

m_y: the volume of the ¹⁰⁷Ag-enriched spike solution added to the sample (ml)

m_x: the volume of the sample (ml)

A_y: abundance of ¹⁰⁹Ag in the ¹⁰⁷Ag-enriched spike solution

A_x: abundance of ¹⁰⁹Ag in the sample

B_y: abundance of ¹⁰⁷Ag in the ¹⁰⁷Ag-enriched spike solution

B_x: abundance of ¹⁰⁷Ag in the sample

AW_x: the atomic weight of Ag in the sample

AW_y: the atomic weight of Ag in the ¹⁰⁷Ag-enriched spike solution

R_n: the isotopic ratio ^{109/107}Ag measured in the sample

The natural Ag_d concentration initially present in the seawater, determined in blanks analysed in parallel of each experimental part, was subtracted from Ag_d obtained after the extractions.

2.5.3. Quality control

For analyses concerning the dissolved fraction, there was no certified material for Ag in seawater or HCl 1M to our knowledge. Three method blanks were however made for each analyses session, with a measured reproducibility better than 5% r.s.d. All the results were then corrected by subtracting blanc-values.

Quality control for the particular fraction analyses was performed by measuring certified reference material (e.g. NIST 2702 and IAEA 405), with an accuracy within 5% and a precision better than 5% (r.s.d.).

3. Results

3.1. Silver mobilisation in extractions without reagent renewal

3.1.1. HCl 1M

For the batches using the HCl 1M as desorption media, desorption kinetics showed similar patterns for the three turbidity conditions. The desorption rates increased from the beginning of the experiment, reaching more than the half of the total final amount of Ag_p mobilized after only 2 hours of exposure ($49.1 \pm 3.65 \%$, $41.0 \pm 10.3 \%$ and $24.2 \pm 6.79 \%$ for SLRs of 0.1 g.l^{-1} , 1 g.l^{-1} and 20 g.l^{-1} respectively). After 4 hours of exposure, desorption rates increased more slowly or no longer increased (Fig. 2A). The final desorption rates (after 24 hours of exposure) were inversely proportional to the SLRs (Fig. 2A). Indeed, for the lowest SLR (0.1 g.l^{-1}) extraction rate of Ag_p reached $61.2 \pm 5.34 \%$ while for the two highest SLRs (1 g.l^{-1} and 20 g.l^{-1}) the extraction rates were about $54.5 \pm 12.5\%$ and $31.0 \pm 6.64 \%$ respectively.

3.1.2. Seawater

The patterns of Ag mobilisation kinetics for seawater extractions were similar for the different SLRs applied, with rapidly increasing desorption rates during the first hours, reaching near the half of total Ag_p finally desorbed after only two hours of exposure: $25.8 \pm 25.3 \%$, $3.26 \pm 5.56 \%$, and $0.25 \pm 0.44 \%$ for sediment concentrations of 0.1 g.l^{-1} , 1 g.l^{-1} and 20 g.l^{-1} respectively (Fig. 2B). After 4 hours of exposure the process slowed down to reach a plateau after 6 hours for the lowest SLR of 0.1 g.l^{-1} .

Similar to HCl extractions the final desorption rates (after 24 hours of exposure) were inversely proportional to the turbidity conditions (Fig. 2B). After 24 hours of exposure to the lowest SLR (0.1 g.l^{-1}) extraction rate was $39.4 \pm 31.0 \%$ of total metal content, while the two highest SLRs (1 g.l^{-1} and 20 g.l^{-1}) presented extraction rates of $3.74 \pm 5.38 \%$ and $0.29 \pm 0.44 \%$ respectively. For increased SLRs by respectively 10 times (from 0.1 g.l^{-1} to 1 g.l^{-1}) and 20 times (from 1 g.l^{-1} to 20 g.l^{-1}), final desorption rates decreased respectively by a factor 10 and 12.

The final Ag mobilisation rates obtained for HCl 1M were systematically higher than those obtained for the seawater experiment (Fig. 5.4).

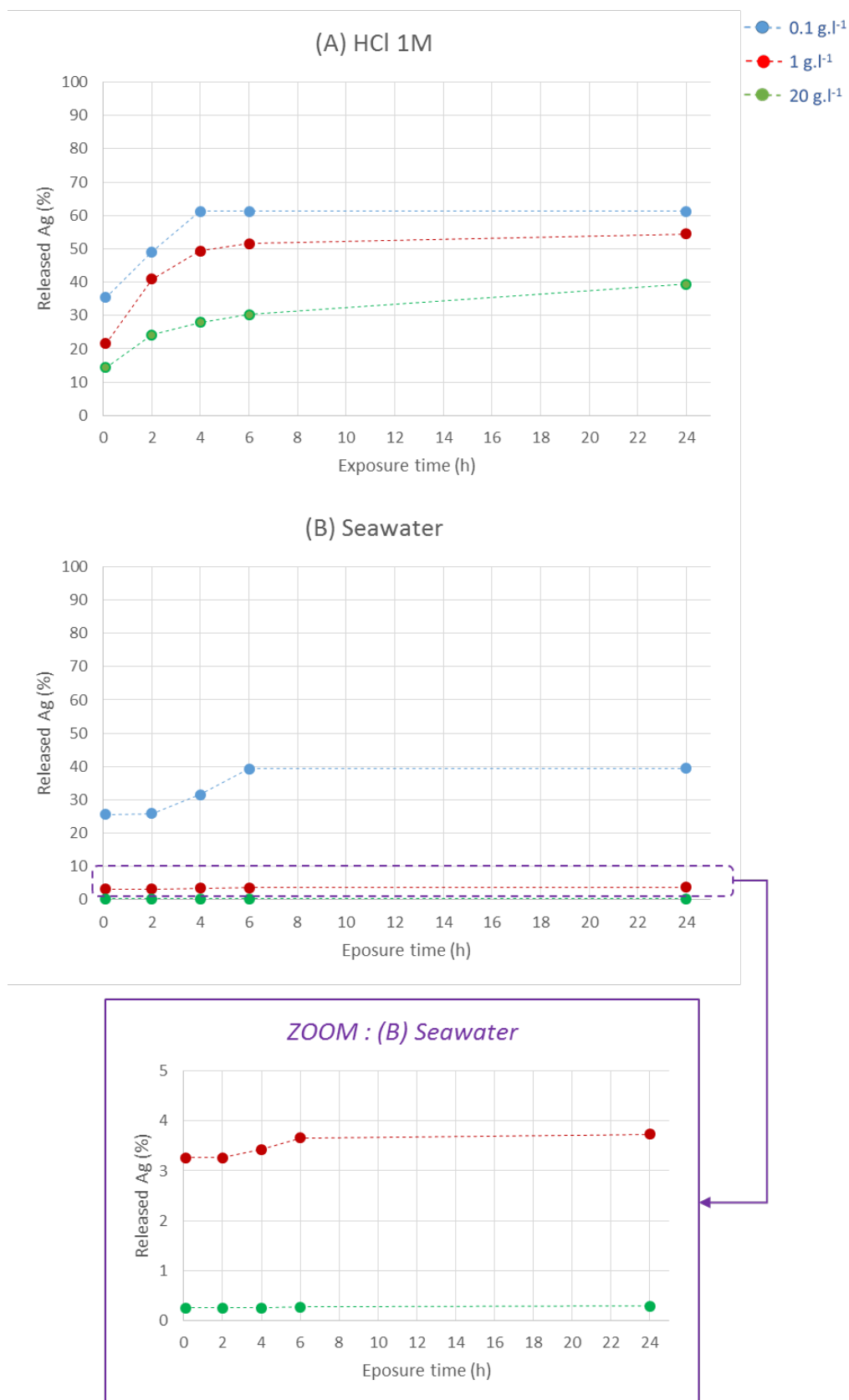


Figure 5.2: Average Ag desorption rates (%) in desorption media supernatants obtained after 10 minutes, 2, 4, 6, and 24 hours of exposure to HCl 1M (A) and seawater (B).

3.1.3. BSA

Due to the analytical constraints (difficulties encountered in the filtration and digestion of BSA-seawater supernatant samples) no kinetic data is available for the BSA extractions.

The average final Ag mobilisation rates obtained for BSA afe (62.2 ± 3.36 %, 59.2 ± 6.55 % and 2.62 ± 4.54 % for SLRs of 0.1, 1 and 20 g.l⁻¹; Fig. 3) apparently tended to be slightly higher than those obtained for the seawater experiment for all SLRs, but high uncertainties in replicate results (note that the analyses were performed on the particle residues with generally small or not measurable concentration differences, e.g. for seawater at SLR 20 g.l⁻¹ < detection limit of 1.85 ng.l⁻¹) suggest that there is no clear difference for both extracting reagents (Fig. 5.3).

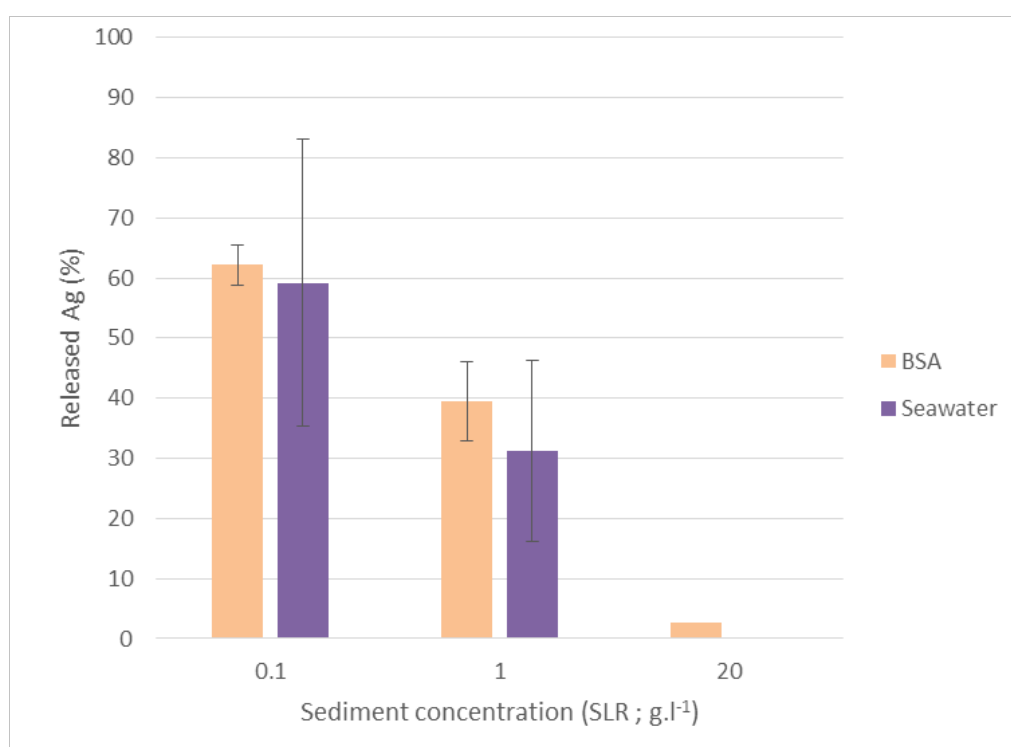


Figure 5.3: Desorption rates obtained after 24 hours for extractions by seawater and BSA-solution.

3.2. Extractions with reagent renewal

The reagents (HCl 1M and seawater) were renewed for the half of extraction series, to observe the saturation of reagent with the desorption reaching an equilibrium stage (plateau) in the case of HCl 1M, and to get closer to environmental conditions (with a constant water renewal) in the case of seawater. To compare this experimentation with most existing protocols, the reagents were not renewed for the second half of experimentation series.

For the experimental part using HCl 1M as desorption reagents, the Ag extracted amounts measured in 200 ml of supernatant reagent after 24 hours of exposure were similar when the HCl 1M was renewed after 2, 4, and 6 hours of exposure or without renewing it for SLRs of 0.1 g.l⁻¹ ($0.56 \pm 0.02 \mu\text{g.g}^{-1}$ versus $0.47 \pm 0.07 \mu\text{g.g}^{-1}$) and 1 g.l⁻¹ ($0.50 \pm 0.04 \mu\text{g.g}^{-1}$ versus $0.30 \pm 0.09 \mu\text{g.g}^{-1}$), but the renewing of the reagent increased significantly (regarding to the standard deviations) the released amounts for the highest SLR of 20 g.l⁻¹ ($0.36 \pm 0.02 \mu\text{g.g}^{-1}$ versus $0.24 \pm 0.05 \mu\text{g.g}^{-1}$ without renewing) (Fig. 5.4.A).

For the experiment using seawater as desorption reagent, the Ag extracted amounts measured in 200 ml of supernatant reagent after 24 hours of exposure tend to be systematically higher ($115 \pm 79.4 \text{ ng.g}^{-1}$, $4.58 \pm 3.04 \text{ ng.g}^{-1}$, and $0.63 \pm 0.11 \text{ ng.g}^{-1}$ for SLRs of 0.1, 1 and 20 g.l⁻¹ respectively) than without renewing the media ($99.6 \pm 0.06 \text{ ng.g}^{-1}$, $6.84 \pm 0.09 \text{ ng.g}^{-1}$, and $0.21 \pm 0.04 \text{ ng.g}^{-1}$ for SLRs of 0.1, 1 and 20 g.l⁻¹ respectively) although the high variability of results in the replicates (c.f. standard deviations) suggest that this difference is not clear (Fig. 5.4.B).

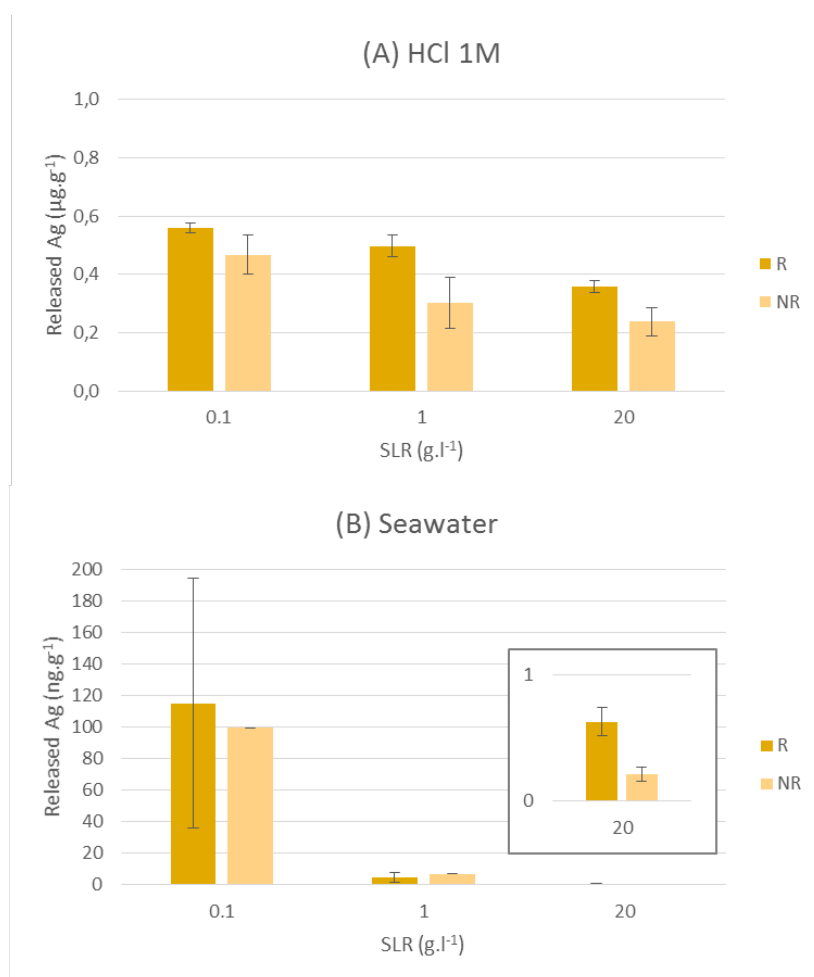


Figure 5.4: Released Ag concentrations with standard deviations obtained after 24 hours of sediment extractions in 200 ml of reagent supernatant at different sediment concentrations (SLRs) by HCl 1M (A) and seawater (B) with (R) and without (NR) renewing the reagent (after 2, 4, and 6 hours)

The renewing of the BSA media after 2, 4, and 6 hours had no significant action on Ag desorption facing the final Ag extracted rates after 24 hours ($62.2 \pm 10.4 \%$, $39.5 \pm 4.95 \%$, and $4.57 \pm 7.20 \%$ for SLRs of 0.1 g.l^{-1} , 1 g.l^{-1} and 20 g.l^{-1} respectively) in comparison with the results obtained without renewing the media regardless of the sediment concentrations.

4. Discussion

4.1. Effect of extraction time on Ag mobilization by HCl 1M and seawater

There are to date no published studies on the assessment of the Ag fraction mobilised from fluvial/estuarine particles by seawater extractions and few studies on the Ag fraction mobilised by HCl 1M. However, there are numerous studies on mobilisation of other metals by the latter extracting reagent with reported extraction times varying from 1 to 96 hours depending on the studies and particle types (Table 1). The obtained desorption rates after different extraction times as reported in the literature for HCl 1M extractions using estuarine and freshwater sediments/ particles (e.g. 2 h, estuarine sediments; (Villares et al., 2005); and 24 hours, Garonne River freshwater sediments; (Audry et al., 2006) clearly show time-dependent Ag mobilisation. In fact, the amount of Ag released after 24 hours of exposure to HCl 1M without renewal was higher by 12.1%, 13.5%, and 15.2% of the initial Ag_p concentrations (for respective SLRs of 0.1 g.l^{-1} , 1 g.l^{-1} , and 20 g.l^{-1}) than the respective values obtained after 2 hours (Fig. 2A). This means that for an estimated maximum Ag release corresponding to ~60% of the initial Ag_p in freshwater sediments, the differences in the potentially bioavailable fractions may differ by up to one fourth, depending on the extraction time.

Table 5.1: Overview of desorption times and sediment amounts used for the assessment of metal fractions mobilized by HCl 1M extractions on freshwater sediments in different published studies.

Autors/Article	Desorption time (h)	Particle amount (dw)
<i>Sutherland et al., 2001</i>	1 h	100 g.l ⁻¹
<i>Shulkin and Bogdanova, 2003</i>	1, 4, 24, 48, and 96 h	0.25 g.l ⁻¹
<i>Villares et al., 2005</i>	2 h	25 g.l ⁻¹
<i>Audry et al., 2006</i>	24 h	16 g.l ⁻¹
<i>Kalman and Turner, 2007</i>	30 min, 1, 2, 5 and 20 h	10 g.l ⁻¹
<i>Sutherland and Tack, 2008</i>	1 h	50 g.l ⁻¹
<i>Jones and Turner, 2010</i>	1 to 5 h	1 to 8.5 g.l ⁻¹
<i>Tessier et al., 1979</i>	1h	125 g.l ⁻¹

Assuming similar kinetic patterns of mobilisation for Ag and other metals, the exponential Ag release over time suggests that (i) 24 h are enough to approach a near-equilibrium distribution between the solid and liquid phases and (ii) 1 or 2 h of extraction are clearly too short to reliably estimate the potentially bioavailable (i.e. extractable by HCl 1M) metal fractions. Accordingly, extraction time is an important parameter to be taken into account which needs to be well defined for the best estimation of the potentially bioavailable fraction. A consensus-based common extraction time would be helpful in comparing potentially bioavailable metal (Ag and other metals) fractions in future research on different aquatic systems to better understand their spatial and temporal variability at the global scale.

4.2 Effect of SLR on Ag mobilization by HCl 1M and seawater

The highest Ag_p desorption rates occurred systematically for the batches using the lowest SLR (0.1 g.l⁻¹), whereas Ag mobilisation was always lowest for the highest SLR (20 g.l⁻¹). This observation made for both, HCl 1M and seawater extractions, suggests that the complexing capacities of the extraction reagent are limited compared to the amount of metals potentially extracted and that the amount of metal released at the end of the experiment represents an equilibrium distribution between the dissolved and particulate phases rather than the potentially extractable fraction. Therefore, it is likely that too high SLRs lead to underestimation of the potentially extracted fractions. Published extraction protocols to assess potentially bioavailable metal fractions in freshwater, estuarine or marine sediments recommend SLRs between 12.5 and 100 g.l⁻¹ (Sutherland and Tack, 2008). Such SPM concentrations far from representing those encountered in most fluvial or estuarine systems and probably do not really address the

potentially mobile metal fraction, which would probably need renewal of the extracting reagent (see discussion below). In the case of the Gironde Estuary, one of the most turbid European estuaries, the SPM concentrations in the surface water column (-1m) are clearly lower than those exposed above and vary from dozens of mg.l^{-1} to few g.l^{-1} in the MTZ (Sottolichio and Castaing, 1999). Therefore, SLRs greater than few g.l^{-1} may produce realistic estimates of metal release for sediment resuspension scenarios close to the bottom of the water column, but most likely are not useful to address the potentially mobile metal fractions in fluvial/estuarine surface columns. Again, consensus-based extraction protocols are needed to allow for reliable estimates of potentially bioavailable metal fractions transported from the continent to the ocean at a wider scale.

4.3 Effect of extracting reagent renewal when using HCl 1M and seawater

In the batches where the reagent was renewed after 2, 4 and 6 hours, the total extraction rates after 24 hours were similar to those in the batches without renewal for the low and intermediate SLRs (0.1 g.l^{-1} and 1 g.l^{-1}).

However, for the batches with high SLR (20 g.l^{-1}) renewal of the extracting reagent measurably increased the amount of metal extracted by +9.4% for HCl 1M and +0.22% for seawater (Fig 2). This observation clearly suggests that in the case of extraction without reagent renewal desorption capacity of the reagent is insufficient for complete mobilisation of the potentially extracted metal fraction, implying near-to-equilibrium conditions inside the reactor. Incomplete metal extraction is not compatible with the concept of assessing the potential of reactive metal mobilisation from particles. Furthermore, in estuarine environments the extracting reagents (e.g. seawater) in contact with particles in the water column are constantly renewed which results in total depletion of the reactive metal fractions (Dabrin et al., 2009; Luoma et al., 1995; Tappin et al., 2010). However, recommending the systematic renewal of extracting reagents to achieve complete metal extraction for high SLRs would imply complex time- and chemical consuming protocols and does not appear useful. Therefore, SLR in batch extractions should be sufficiently low to allow for complete extraction of the reactive metal fractions.

The maximum SLR for which complete mobilisation of the reactive metal fraction may be expected probably depends on the sediment itself, the type and concentration of the extracting reagent and the metal focussed. Accordingly, the elaboration of a universal (consensus-based) extraction protocol should account for these parameters and we recommend that some

additional extractions with reagent renewal be performed in parallel when working with unknown sediments, etc.

4.4 Role of the extraction method for the assessment of Ag mobilization in estuarine environments

Apart from the above discussed potential biases in the operational estimation of the potentially mobile metal fraction in fluvial/estuarine particles (due to inadequate extraction times and/or SLRs) the choice of the extracting reagent may be of importance.

Given that in coastal systems seawater (and its components) is the most abundant reactant interacting with particles, we have compared the extraction efficiency of seawater to that of (i) HCl 1M as a commonly applied method to estimate the potentially bioavailable metal fraction and (ii) seawater with bovine serum albumin BSA to test if in-vivo digestion processes may mobilise metals from particles resisting to seawater alone.

Comparison seawater – HCl 1M

The calculated chlorinity values for seawater and HCl 1M and were 17.2 g.kg^{-1} for seawater (salinity = 31) and 35.5 g.kg^{-1} for HCl 1M. The pH of both reagents staid stable all along the experiment, with values comprised between 0.03 and 0.07 for HCl 1M and between 7.09 and 8.09 for seawater, regardless for the SLRs.

After the first reagent renewal, the chlorinity of the seawater has been doubled (34.4 g.kg^{-1}) and was thus similar to the chlorinity of the HCl 1M at the beginning of the experiment (T0). Considering the lowest SLR of 0.1 g.l^{-1} as the most relevant of environmental conditions, the corresponding Ag extraction rates for this turbidity condition were thus similar between the both reagents (31.6 % of released Ag in seawater measured at T4 and 35.4 % released Ag in HCl 1M measured at T0). After the three renewals the final chlorinity of the seawater (from 6 to 24 hours of exposure) was 4 times higher than at the beginning of the experiment and thus estimated to be 2 times higher than the HCl 1M chlorinity. However, the Ag desorption in seawater reached a plateau after 2 renewals (T6) with 39.4 % of the total initial Ag content released, suggesting an equilibrium stage and the end of the chlorinity action on Ag mobilization. The final desorption rate obtained in HCl 1M (61.2 % of the total initial Ag content) was 20 % higher than that obtained using seawater. Assuming that the chlorinity action could be limited to a release of 40%, this difference can be related to the action HCl 1M acidity.

Simulation of metal mobilisation in the digestive system of marine bivalves compared to seawater extraction

Assuming that seawater mainly mobilises the metals weakly bound to the sediment surface (Jones and Turner, 2010), one would expect that the combination of seawater with BSA, i.e. strong metal complexants may induce additional competition between liquid complexation sites and adsorption sites on the sediments. In fact, the amphiphilic nature of the BSA gives it the ability to interact with the hydrophobic organic matter and dissolve the metals contained therein (Singh and Turner, 2009). If this was reported for other metals (e.g. Cd, Cu, Zn; (Jones and Turner, 2010; Kalman and Turner, 2007; Voparil and Mayer, 2004), similar results for seawater and BSA experiments suggest that for Ag the expected increase in mobilisation from the freshwater particles did not occur (Fig 3). This observation may be due to weak Ag complexing capacities low of the relatively low (~2-3 % Particulate Organic Carbon POC; (Coynel et al., 2005) and degraded (soil-derived; (Etcheber et al., 2007) organic matter in flood sediments. In fact, during floods, the POC in suspended particles is similar to the watershed soil POC in terms of both concentration and nature (Coynel et al., 2005; Etcheber et al., 2007).

Accordingly, seawater extractions may produce a good approximation of the Ag fractions potentially released from flood sediments in the digestive tube of estuarine bivalves. Although particles transported during floods represent the wide majority of the annual fluvial particulate transport from the continent to the coast, additional studies on particles with higher phytoplankton contents are necessary to cover the whole range of hydrological situations.

4.2. Mobility of fluvial particulate Ag in the Gironde Estuary – the potentially bioavailable fraction

In the Gironde fluvial-estuarine system up to 95% of the annual Ag transport to the estuary occurs in the particulate phase, i.e. is directly related to the SPM fluxes (Lanceleur et al., 2011a). The total Ag_p concentration in the estuarine freshwater sediments from the La Réole site used for this experiment was 0.304 mg.kg^{-1} (dry weight), which is in the range of typical Ag_p observed for this site during the past decade (Lanceleur et al., 2013); unpublished data). Comparison of metal concentrations in river SPM from different sites and/or sampling times, i.e. reflecting hydrological differences needs to account for variations in grain size composition, which may induce variations in metal concentrations. In the Gironde fluvial-estuarine system, normalisation of metal concentrations using Th_p concentration as the lithogenic reference is efficient to correct for grain-size induced metal concentration effects (Larrose et al., 2011;

Coynel et al., 2007). After Th_p normalisation, the obtained $\text{Ag}_p/\text{Th}_p = 0.032$ in these freshwater sediments was clearly higher than the grain size corrected geochemical background of $\text{Ag}_p/\text{Th}_p = 0.026$ for SPM from the Gironde Estuary watershed. These numbers suggest that ~23% of the total Ag_p in these flood particles are of anthropogenic origin (Lanceleur et al., 2011a), and are consistent with those previously reported for the Gironde MTZ particles ($\text{Ag}_p = 0.44 \pm 0.03 \text{ mg.kg}^{-1}$ and $\text{Ag}_p/\text{Th}_p = 0.033 \pm 0.003$; (Lanceleur et al., 2013). As such, the particles used in the present work are probably representative of the mass of particles circulating in the Gironde fluvial-estuarine system including the MTZ. Higher $\text{Ag}_p/\text{Th}_p = 0.04$ as observed in estuarine particles from the high salinity ($S > 20$) and low turbidity ($\text{SPM} < 20 \text{ mg.l}^{-1}$) range of the Gironde Estuary near the estuary mouth (Lanceleur, 2011; unpublished data) are probably the result of estuarine Ag recycling. In fact, such Ag_p/Th_p reflect either low Th_p and/or high Ag_p , which respectively may stand for a small lithogenic mineral fraction in these particles and/or uptake of Ag from seawater. Accordingly, the relatively high Ag_p/Th_p observed in the marine part of the estuary imply Ag mobilization from continental/estuarine particles in the estuarine biogeochemical gradients (mainly salinity; Lanceleur et al., 2013), followed by uptake/adsorption in/on marine phytoplankton in the low turbidity/high salinity zone, where primary production is possible. Silver dynamics in these particles, as the first element of the marine food chain, will need special attention in future work.

The operational assessment of the potentially bioavailable Ag fraction in freshwater particles entering the Gironde Estuary by HCl 1M produced desorption rates of $61.2 \pm 5.34 \%$ and $54.5 \pm 12.5\%$ for SLRs of 0.1 g.l^{-1} and 1 g.l^{-1} , respectively (Fig 2A). These numbers were similar to those measured by Lanceleur et al., (2013) for HCl 1M extractions conducted on particles from both SPM from the Gironde freshwater estuary upstream from the MTZ ($60 \pm 4\%$ after 24 hours; SLR 0.1 g.l^{-1}), from the MTZ ($56 \pm 5\%$ after 24 hours; SLR 1 g.l^{-1}). The low and intermediate SLRs used in this study (0.1 g.l^{-1} and 1 g.l^{-1}) correspond to real fluvial-estuarine SPM concentrations in the Gironde system. These observations confirm that even in MTZ conditions with very high SPM concentrations, more than half of the Ag_p is potentially mobilized to the dissolved phase. The minor differences between desorption rates obtained for the freshwater particles and MTZ particles have been previously attributed to particle aging, i.e. may reflect the probable partial previous desorption of metals from these estuarine particles and/or mixing of particles having different residence times in the estuary (Lanceleur et al., 2013; Masson et al., 2006). Partial depletion of particles due to contact with brackish waters and mixing of 'old'

and ‘fresh’ particles could also explain the low Ag desorption rates <25% obtained by Dabrin in (2009) (HCl 1M, 24h, SLR 0.1 g.l⁻¹ ; unpublished data) for coastal seawater SPM from the Marennes Oléron Bay. The highest SLR (20 g.l⁻¹) corresponding to particle concentrations as observed in the upper first centimetres of the fluid mud in the MTZ, produced Ag mobilisation of 43.1%. If this number probably underestimates the potentially mobile Ag fraction in these particles due to a too high SLR (see discussion above), it supports the idea that the Soft Mud layer represents an important reservoir of reactive metals (as previously reported for Cd), which will successively be released with time due to continued mixing with seawater (renewal effect, see above). The experimentally determined desorption kinetics suggest that estuarine particle residence times (10-80 days; (Castaing and Allen, 1981) are sufficiently long to allow for complete mobilisation of the reactive metal fractions, unless SLRs are too high (SPM concentrations may exceed 250 g.l⁻¹ in the bottom of the Soft Mud layer in the MTZ (Robert et al., 2004) and/or mixing with seawater (renewal) is insufficient (e.g. due to stratification during major floods).

Mass balances using the the experimental mobilisation rates after 24 h using the SLR of 0.1 g.l⁻¹ suggest that the residual particulate Ag concentrations (Ag_r) after extracting the sediments fractions were Ag_r=0.12 mg.kg⁻¹ and Ag_r/Th_p= 0.012. These values were similar to those previously obtained for SPM from the Gironde Estuary MTZ (Ag_r=0.19±0.03 mg.kg⁻¹ and Ag_r/Th_p=0.014±0.003; (Lanceleur et al., 2013). Compared to the initial Ag_p/Th_p value (Ag_p/Th_p=0.032), the Ag_r/Th_p=0.012 implies a potential mobilisation of 62.5% of Ag_p after 24 hours of exposure to HCl 1M with a SLR of 0.1 g.l⁻¹. Applying this estimation to the annual Ag_p and Ag_a gross fluxes into the Gironde Estuary for the 2013-2015 period (Tab. 5.2), the amount of potentially bioavailable Ag_a was roughly estimated at 0.27 - 0.68 t.year⁻¹. This values are consistent with the annual Ag_a net flux previously estimated by Lanceleur et al. (2013) for the last decade (0.35-0.64 t.year⁻¹), supporting important additional Ag inputs from urban and agricultural sources (Wastewater treatment plants WWTPs; cloud seeding; Deycard et al., *Under review*).

Table 5.2: Silver dissolved and particular gross fluxes into the Gironde Estuary, and respective estimated potentially bioavailable fractions for the 2013-2015 period.

Year	Ag _d gross flux (t.year ⁻¹)	Ag _p gross flux (t.year ⁻¹)	Ag _d p.bioavailable (t.year ⁻¹)
2013	0.03	1.03	0.68
2014	0.04	0.89	0.59
2015	0.02	0.40	0.27

5. Conclusion

The originality of this work was based on the methodological questioning based on the use of a wide range of sediment concentrations and extraction reagents to estimate the potential metals bioavailability from flood sediment. The results allowed to precise the necessary experimental conditions needed to get closer to environmental estimations avoiding as much as possible the potential biases induced by the sediments concentrations and the used of different reagents. Observations on HCl 1M extractions confirmed this reagent to be useful for the estimation of exchangeable sediments fractions, but results highlighted the necessity of using environmental sediment concentrations to avoid strong under-estimations (from 8.8 to 26 % in this study) induced by the use of too high turbidity conditions. Results from the seawater extractions showed the chlorinity as a limiting factor for Ag desorption beyond the limit of 40% of initial metal content. For the both reagents, the results highlighted the necessity to renew the desorption media in case of high sediment concentrations, to avoid to make it a limiting factor in the desorption process. These results highlight the bias induced by most of the existing protocols, which do not allow to qualify Ag_p fractions that may be dissolved in HCl 1M in the case where the extraction medium is not a limiting factor, and may thus underestimate the potentially bioavailable fraction.

The effect of BSA on Ag mobilization did not provide concluent results and needs still further investigations, including analytical development for direct supernatant analyses.

Transposed to the environmental conditions of the Gironde Estuary, the results allowed to calculate the recent Ag_d net fluxes (2015) which were lower than those previously estimated in 2003, suggesting important Ag inputs for the urban and agricultural sources along the Gironde Estuary.

As a perspective, it could be interesting to include the exchangeable fractions in programs assessing the sediment and water qualities (e.g. RNO ROCCHSED in France, NAWQA in

USA, ...), and extend this approach to estimate the bioavailable fractions in the most of metal contaminated estuaries, especially those using marine invertebrates as sentinel species for biomonitoring programs (e.g. RNO ROCCH, NOAA, etc...).

Aknowledgements

The authors want to thank Eleonore Köng, Teba Gil Diaz and Melina Abdou. This work was founded by le FEDER Aquitaine, “La Région Aquitaine”, the French National Research Agency (ANR-07-VULN-003) and the “Agence de l’Eau Adour-Garonne”.

Reference

- Abbe, G.R., and Sanders, J.G. (1990). Pathways of silver uptake and accumulation by the American oyster (*Crassostrea virginica*) in Chesapeake Bay. *Estuar. Coast. Shelf Sci.* 31, 113–123.
- Amiard, J.-C. (2011). Les risques chimiques environnementaux: Méthodes d’évaluation et impacts sur les organismes (Lavoisier).
- Audry, S., Schäfer, J., Blanc, G., Bossy, C., and Lavaux, G. (2004). Anthropogenic components of heavy metal (Cd, Zn, Cu, Pb) budgets in the Lot-Garonne fluvial system (France). *Appl. Geochem.* 19, 769–786.
- Audry, S., Blanc, G., and Schäfer, J. (2006). Solid state partitioning of trace metals in suspended particulate matter from a river system affected by smelting-waste drainage. *Sci. Total Environ.* 363, 216–236.
- Barriada, J.L., Tappin, A.D., Evans, E.H., and Achterberg, E.P. (2007). Dissolved silver measurements in seawater. *TrAC Trends Anal. Chem.* 26, 809–817.
- Blanc, G., Lapaquellerie, Y., Maillet, N., and Anschutz, P. (1999). A cadmium budget for the Lot-Garonne fluvial system (France). *Hydrobiologia* 331–341.
- Brügmann, L. (1995). Metals in sediments and suspended matter of the river Elbe. *Sci. Total Environ.* 159, 53–65.
- Bryan, G.W., and Langston, W.J. (1992). Bioavailability, accumulation and effects of heavy metals in sediments with special reference to United Kingdom estuaries: a review. *Environ. Pollut.* 76, 89–131.
- Campbell, P. (1988). Biologically available metals in sediments (National Research Council Canada, Associate Committee on Scientific Criteria for Environmental Quality).
- Castaing, P., and Allen, G.P. (1981). Mechanisms controlling seaward escape of suspended sediment from the Gironde: A macrotidal estuary in France. *Mar. Geol.* 40, 101–118.
- Chen, Z., and Mayer, L.M. (1998). Mechanisms of Cu Solubilization during Deposit Feeding. *Environ. Sci. Technol.* 32, 770–775.
- Chiffoleau, J.-F., Auger, D., Roux, N., Rozuel, E., and Santini, A. (2005). Distribution of silver in mussels and oysters along the French coasts: Data from the national monitoring program. *Mar. Pollut. Bull.* 50, 1719–1723.
- Cline, S.R., and Reed, B.E. (1995). Lead Removal from Soils via Bench-Scale Soil Washing Techniques. *J. Environ. Eng.* 121, 700–705.
- Coynel, A., Etcheber, H., Abril, G., Maneux, E., Dumas, J., and Hurtrez, J.-E. (2005). Contribution of small mountainous rivers to particulate organic carbon input in the Bay of Biscay. *Biogeochemistry* 74, 151–171.

- Coynel, A., Schäfer, J., Blanc, G., and Bossy, C. (2007). Scenario of particulate trace metal and metalloid transport during a major flood event inferred from transient geochemical signals. *Appl. Geochem.* 22, 821–836.
- Coynel, A., Blanc, G., Marache, A., Schäfer, J., Dabrin, A., Maneux, E., Bossy, C., Masson, M., and Lavaux, G. (2009). Assessment of metal contamination in a small mining- and smelting-affected watershed: high resolution monitoring coupled with spatial analysis by GIS. *J. Environ. Monit.* 11, 962.
- Dabrin, A. (2009). Mécanismes de transfert des éléments traces métalliques (ETM) et réactivité estuarienne - Cas des systèmes Gironde, Charente, Seudre, et Baie de Marennes Oléron. Thèse d'état. Université de Bordeaux 1.
- Dabrin, A., Schäfer, J., Blanc, G., Strady, E., Masson, M., Bossy, C., Castelle, S., Girardot, N., and Coynel, A. (2009). Improving estuarine net flux estimates for dissolved cadmium export at the annual timescale: Application to the Gironde Estuary. *Estuar. Coast. Shelf Sci.* 84, 429–439.
- Deycard V.N., Schäfer J., Blanc G., Coynel A., Petit J.C.J., Kessaci K., Lancelleur L., Dutruch L. Bossy C. Inputs, dynamics and potential impacts of Silver (Ag) from urban wastewater release into the Gironde Estuary. *Under review. Chemosphere.*
- Etcheber, H., Taillez, A., Abril, G., Garnier, J., Servais, P., Moatar, F., and Commarieu, M.-V. (2007). Particulate organic carbon in the estuarine turbidity maxima of the Gironde, Loire and Seine estuaries: origin and lability. *Hydrobiologia* 588, 245–259.
- Ettajani, H., Berthet, B., Amiard, J.-C., and Chevolot, L. (2001). Determination of Cadmium Partitioning in Microalgae and Oysters: Contribution to the Assessment of Trophic Transfer. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 40, 209–221.
- Fan, W., Wang, W.-X., and Chen, J. (2002). Geochemistry of Cd, Cr, and Zn in Highly Contaminated Sediments and Its Influences on Assimilation by Marine Bivalves. *Environ. Sci. Technol.* 36, 5164–5171.
- Geffard, A., Smith, B.D., Amiard-Triquet, C., Jeantet, A.Y., and Rainbow, P.S. (2005). Kinetics of trace metal accumulation and excretion in the polychaete *Nereis diversicolor*. *Mar. Biol.* 147, 1291–1304.
- Ifremer - envlit Ifremer - envlit / Accès aux données.
- Jones, D.E., and Turner, A. (2010). Bioaccessibility and mobilisation of copper and zinc in estuarine sediment contaminated by antifouling paint particles. *Estuar. Coast. Shelf Sci.* 87, 399–404.
- Kalman, J., and Turner, A. (2007). An evaluation of metal bioaccessibility in estuarine sediments using the commercially available protein, bovine serum albumin. *Mar. Chem.* 107, 486–497.
- Lancelleur, L., Schäfer, J., Chiffolleau, J.-F., Blanc, G., Auger, D., Renault, S., Baudrimont, M., and Audry, S. (2011a). Long-term records of cadmium and silver contamination in sediments and oysters from the Gironde fluvial–estuarine continuum – Evidence of changing silver sources. *Chemosphere* 85, 1299–1305.
- Lancelleur, L., Schäfer, J., Bossy, C., Coynel, A., Larrose, A., Masson, M., and Blanc, G. (2011b). Silver fluxes to the Gironde Estuary – Eleven years (1999–2009) of monitoring at the watershed scale. *Appl. Geochem.* 26, 797–808.
- Lancelleur, L., Schäfer, J., Blanc, G., Coynel, A., Bossy, C., Baudrimont, M., Glé, C., Larrose, A., Renault, S., and Strady, E. (2013). Silver behaviour along the salinity gradient of the Gironde Estuary. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 20, 1352–1366.
- Luoma, S.N. (1989). Can we determine the biological availability of sediment-bound trace elements? *Hydrobiologia* 176–177, 379–396.
- Luoma, S.N., Ho, Y.B., and Bryan, G.W. (1995). Proceedings of the Third International Conference on Trace Metals in

- the Aquatic Environment Fate, bioavailability and toxicity of silver in estuarine environments. *Mar. Pollut. Bull.* 31, 44–54.
- Masson, M., Blanc, G., and Schäfer, J. (2006). Geochemical signals and source contributions to heavy metal (Cd, Zn, Pb, Cu) fluxes into the Gironde Estuary via its major tributaries. *Sci. Total Environ.* 370, 133–146.
- Masson, M., Blanc, G., Schäfer, J., Parlanti, E., and Le Coustumer, P. (2011). Copper addition by organic matter degradation in the freshwater reaches of a turbid estuary. *Sci. Total Environ.* 409, 1539–1549.
- Mayer, L.M., Schick, L.L., Self, R.F.L., Jumars, P.A., Findlay, R.H., Chen, Z., and Sampson, S. (1997). Digestive environments of benthic macroinvertebrate guts: Enzymes, surfactants and dissolved organic matter. *J. Mar. Res.* 55, 785–812.
- Ndung'u, K., Ranville, M.A., Franks, R.P., and Flegal, A.R. (2006). On-line determination of silver in natural waters by inductively-coupled plasma mass spectrometry: Influence of organic matter. *Mar. Chem.* 98, 109–120.
- Owen, G. (1966). Digestion. *Physiol. Mollusca* 2, 53–96.
- Rieuwerts, J.S., Thornton, I., Farago, M.E., and Ashmore, M.R. (1998). Factors influencing metal bioavailability in soils: preliminary investigations for the development of a critical loads approach for metals. *Chem. Speciat. Bioavailab.*
- Robert, S., Blanc, G., Schäfer, J., Lavaux, G., and Abril, G. (2004). Metal mobilization in the Gironde Estuary (France): the role of the soft mud layer in the maximum turbidity zone. *Mar. Chem.* 87, 1–13.
- Rodríguez Martín-Doimeadios, R.C., Monperrus, M., Krupp, E., Amouroux, D., and Donard, O.F.X. (2003). Using Speciated Isotope Dilution with GC–Inductively Coupled Plasma MS To Determine and Unravel the Artificial Formation of Monomethylmercury in Certified Reference Sediments. *Anal. Chem.* 75, 3202–3211.
- Rozan, T.F., and Hunter, K.S. (2001). Effects of discharge on silver loading and transport in the Quinnipiac River, Connecticut. *Sci. Total Environ.* 279, 195–205.
- Schäfer, J., Blanc, G., Lapaquellerie, Y., Maillet, N., Maneux, E., and Etcheber, H. (2002). Ten-year observation of the Gironde tributary fluvial system: fluxes of suspended matter, particulate organic carbon and cadmium. *Mar. Chem.* 79, 229–242.
- Singh, N., and Turner, A. (2009). Leaching of copper and zinc from spent antifouling paint particles. *Environ. Pollut.* 157, 371–376.
- Sottolichio, A., and Castaing, P. (1999). A synthesis on seasonal dynamics of highly-concentrated structures in the Gironde estuary. *Comptes Rendus Académie Sci. - Ser. IIA - Earth Planet. Sci.* 329, 795–800.
- Sutherland, R.A., and Tack, F.M.G. (2008). Extraction of labile metals from solid media by dilute hydrochloric acid. *Environ. Monit. Assess.* 138, 119–130.
- Sutherland, R.A., Tack, F.M.G., Tolosa, C.A., and Verloo, M.G. (2001). Metal Extraction from Road Sediment using Different Strength Reagents: Impact on Anthropogenic Contaminant Signals. *Environ. Monit. Assess.* 71, 221–242.
- Tappin, A.D., Barriada, J.L., Braungardt, C.B., Evans, E.H., Patey, M.D., and Achterberg, E.P. (2010). Dissolved silver in European estuarine and coastal waters. *Water Res.* 44, 4204–4216.
- Trefry, J.H., and Metz, S. (1984). Selective leaching of trace metals from sediments as a function of pH. *Anal. Chem.* 56, 745–749.
- Villares, R., Carral, E., Puente, X.M., and Carballeira, A. (2005). Metal Concentrations in Estuarine Invertebrates in Relation to Sediments. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 75, 592–599.
- Voparil, I.M., and Mayer, L.M. (2004). Commercially Available Chemicals That

- Mimic a Deposit Feeder's (*Arenicola marina*) Digestive Solubilization of Lipids. *Environ. Sci. Technol.* **38**, 4334–4339.
- Weimin, Y., Batley, G.E., and Ahsanullah, M. (1992). The ability of sediment extractants to measure the bioavailability of metals to three marine invertebrates. *Sci. Total Environ.* **125**, 67–84.
- Yang, L., and Sturgeon, R.E. (2002). On-line determination of silver in sea-water and marine sediment by inductively coupled plasma mass spectrometry. *J. Anal. At. Spectrom.* **17**, 88–93.
- Zhong, H., and Wang, W.-X. (2006). Sediment-Bound Inorganic Hg Extraction Mechanisms in the Gut Fluids of Marine Deposit Feeders. *Environ. Sci. Technol.* **40**, 6181–6186.

5.3. Cas de Cu

The observations of Cu desorption kinetics over time for HCl 1M extractions showed similar patterns for each SLR, resulting in more than the two-thirds of total Cu_p finally desorbed reached after only 2 hours of exposure (61.4 ± 12.8 %, 42.6 ± 2.06 %, and 24.6 ± 1.50 % released Ag for sediment for SLRs of 0.1, 1 and 20 g.l^{-1} respectively) and a slowdown over the following hours until the end of the experiment (Fig. 5.5.A). After 24 hours of exposure, final desorption rates reached 91.4 ± 15.0 %, 50.8 ± 1.73 %, and 30.6 ± 1.74 % of the total initial metal content (Fig. 5.5.A).

The desorption results for extractions using seawater showed a slower Cu release over time than HCl 1M extractions, with a regular kinetic over time especially for the 6 first hours of experiment. At the end of experiment, desorption rates reached $86,1 \pm 7.43$ %, 12.0 ± 5.01 %, and 1.08 ± 0.79 % of total initial Cu_p content sediment for respective SLRs of 0.1, 1 and 20 g.l^{-1} (Fig. 5.5.B).

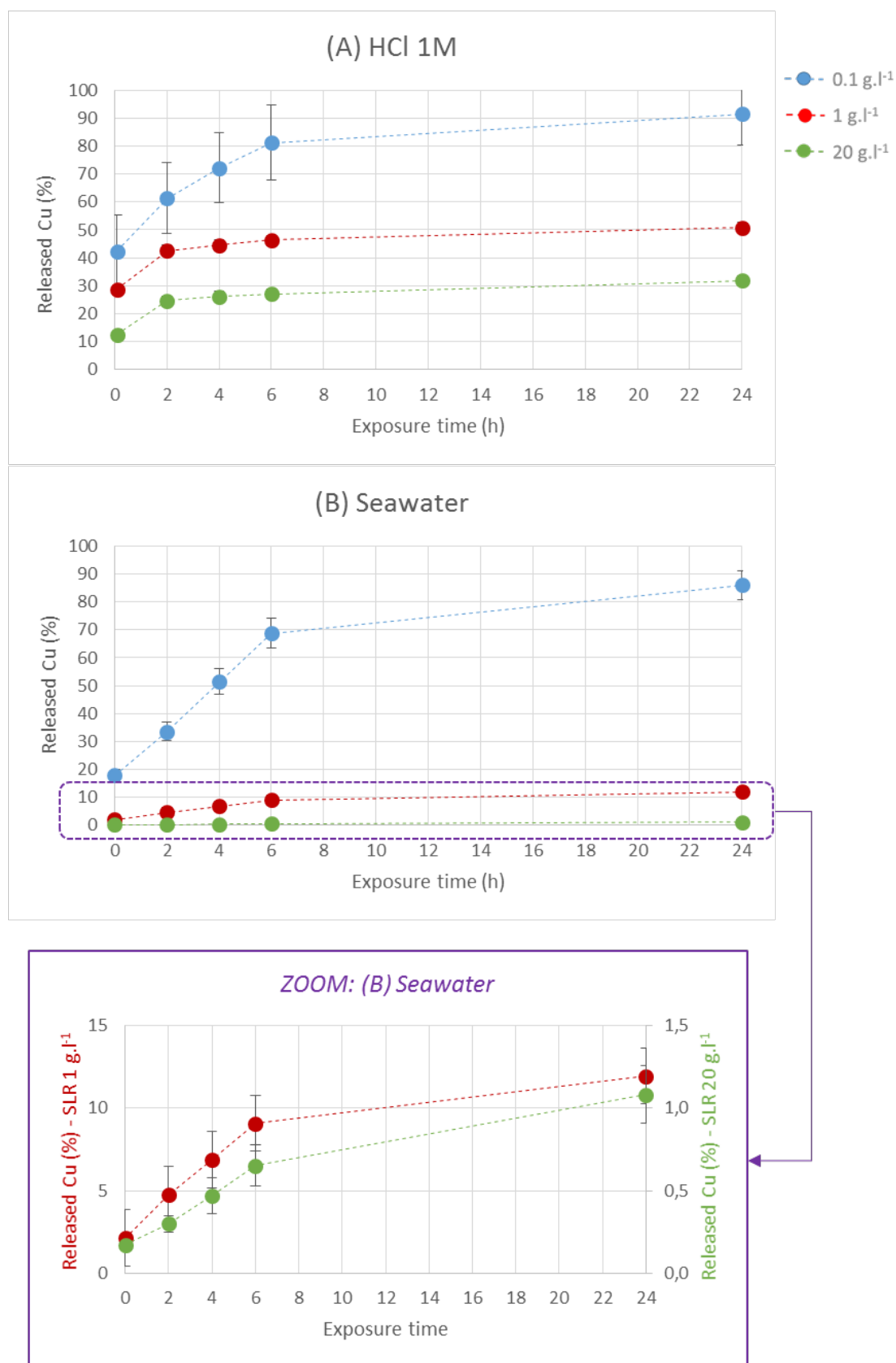


Figure 5.5: Average Cu desorption rates (%) in desorption media supernatants obtained after 10 minutes, 2, 4, 6, and 24 hours of exposure to HCl 1M (A) and seawater (B).

Regardless to the reagent, no equilibrium stage was reached contrary to the Ag results, consistently with previous results of Dabrin in 2009, who conclude on the long-term Cu desorption of estuarine particles from ironed Estuary to the coastal zone of Marennes Oléron Bay. The comparison between HCl 1M and seawater final desorption rates show similar values (91.4 ± 15.0 % and 86.1 ± 7.43 % respectively) for the SLR of 0.1 g.l^{-1} . However, for the two other SLRs (1 and 20 g.l^{-1}) the HCl 1M allowed to release close to 4 times and 30 times more Cu than seawater. The final rates obtained for HCl 1M extractions after 24 hours are lower (30.6 ± 1.74 %) than those obtained by Audry et al., (2006) after 24 hour extractions in HCl 0.5 M with the SLR of 16 g.l^{-1} (45-55 %), probably because of the nature of our particles collected after an important flood event which could explain the relatively low initial Cu measured concentration (26.5 mg.kg^{-1}) related to the natural pre-desorption.

As described in the first part concerning the Ag, the reagents were renewed in the half of the experimental studies. For the HCl 1M extractions, the media renewing seemed to increase efficiently the final desorption rates (31.8 ± 1.74 % of total initial metal content) with renewed media versus 24.2 ± 3.83 % without renewing it) only for the highest SLR of 20 g.l^{-1} (Fig. 5.6.A).

For the experimental part using seawater as the extraction media, the desorption rates obtained after renewing the media were systematically higher (86.1 ± 5.20 %, 12.0 ± 0.91 %, and 1.08 ± 0.17 % for SLRs of 0.1 , 1 and 20 g.l^{-1} respectively) than those obtained with no renewal (34.1 ± 7.43 %, 5.01 ± 0.18 % and 0.79 ± 0.02 % for SLRs of 0.1 , 1 and 20 g.l^{-1} respectively) (Fig 5.6.B).

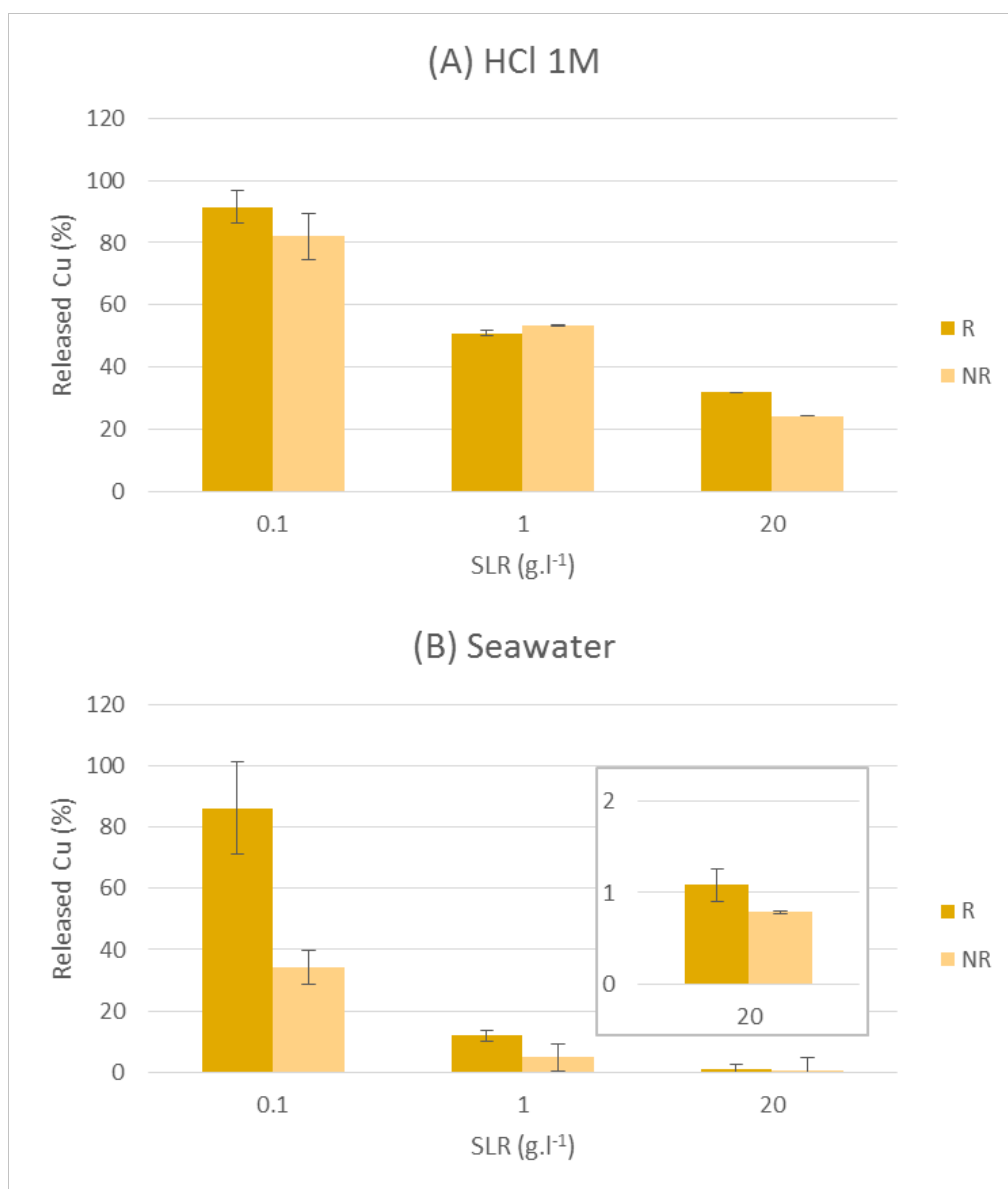


Figure 5.6: Released Ag concentrations with standard deviations obtained after 24 hours of sediment extractions in 200 ml of reagent supernatant at different sediment concentrations (SLRs) by HCl 1M (A) and seawater (B) with (R) and without (NR) renewing the reagent (after 2, 4, and 6 hours)

It seems interesting to notice that the final desorption rate value for seawater after media renewal (86.1 ± 5.20 %) is similar to that obtained for HCl 1M extractions without renewal (91.4 ± 15.0 %). These results suggest that for environmental conditions (SLR = 0.1 g.l^{-1}) both reagents are efficient to estimate the Cu potentially available amounts, but for higher sediment concentrations (i.e. occurring in MTZ) the use of seawater instead of HCl 1M can induce an under-estimation of Cu mobilization estimated of 41% and 23% for SLRs of 1 g.l^{-1} and 20 g.l^{-1} respectively. On the other hand, the use of seawater in Cu extraction experiment needs a reagent renewal to obtain equivalent results than using HCl 1M and thus to avoid an under-estimation

of final Cu desorption rate, which was estimated of 52 % in this experiment for a SLR of 0.1 g.l⁻¹. The use of high sediment concentrations can induce an important under-estimation of potential Cu exchangeable fraction regardless of the reagent used, but more pronounced for the seawater extractions: in this study the use of a SLR of 20 g.l⁻¹ instead of 0.1 g.l⁻¹ induces an under-estimation of a factor of 3.4 for HCl 1M and a factor of 43 for seawater.

Mass balance using the final (after 24 hours) experimental desorption rates suggest that the residual particulate Cu concentrations (Cu_r) were Cu_r=4.77 mg.kg⁻¹ and Cu_r/Th_p=0.50. These values compared to the initial Cu_p/Th_p=2.82 imply a potential mobilization of 82% of Cu_p after 24 hours of exposure to HCl 1M for a SLR of 0.1 g.l⁻¹. Applying this estimation to the annual gross Cu fluxes into the Gironde Estuary for the 2013-2015 period (unpublished data; Tab. 5.3), the potentially bioavailable Cu_d amount was estimated at 51.5-136 t.year⁻¹. It is important to notice that if these estimations were based on HCl 1M extractions using a SLR of 1 g.l⁻¹, the final net fluxes for 2015 would be under-estimated of about 26% (13.5 t.year⁻¹).

Table 5.3: Copper dissolved and particular gross fluxes into the Gironde Estuary (unpublished data), and respective estimated potentially bioavailable fractions for the 2013-2015 period.

Year	Cu _d gross flux (t.year ⁻¹)	Cu _p gross flux (t.year ⁻¹)	Cu _d p.bioavailable (t.year ⁻¹)
2013	20.8	140	136
2014	17.4	58.7	65.5
2015	12.9	47.0	51.5

5.4. Conclusion

Le questionnement méthodologique basé sur l'utilisation d'une large gamme de concentrations sédimentaires et de trois milieux d'extraction différents visant à évaluer le potentiel de mobilité et de biodisponibilité de Ag et Cu à partir de laisse de crues a constitué l'originalité de ce travail. Les expérimentations menées dans le cadre de cette étude précisent les conditions expérimentales nécessaires afin de se rapprocher des estimations environnementales de biodisponibilité, tout en s'affranchissant d'un maximum de biais pouvant être induits par l'utilisation de concentrations sédimentaires trop importantes ou de réactifs inappropriés. En réponse aux objectifs énoncés en introduction, les résultats ont permis de :

- ✓ estimer à 82,0% et 62,5% respectivement, la fraction potentiellement biodisponible de Cu et Ag dans les particules girondines, ceci grâce aux extractions à l'HCl 1M,
- ✓ estimer les flux nets en Ag_d (0,27-0,68 t.an⁻¹) et Cu_d (51,5-136 t.an⁻¹) sortant de l'estuaire de la Gironde pour l'année 2015,
- ✓ mettre en évidence la nécessité de renouveler le réactif au cours de l'expérimentation afin d'éviter la sous-estimation des flux nets dissous, résultant d'un réactif limitant la réaction. Le renouvellement est conseillé pour le cas de concentrations en sédiments élevées pour les expérimentations utilisant de l'HCl 1M, et systématiquement quelle que soit la concentration en sédiments utilisée dans le cas de l'eau de mer,
- ✓ mettre en évidence la nécessité d'utiliser des rapports solide/liquide réalistes (proches des valeurs environnementales) afin d'éviter une sous-estimation de la biodisponibilité potentielle des métaux dans l'environnement aquatique, évaluée dans cette étude d'un facteur 1,8 dans le cas de Ag, et d'un facteur 43 dans le cas de Cu pour des protocoles d'extraction décrits dans la littérature (Tab. 5.1).

Ce travail constitue un pas nécessaire vers une homogénéisation des protocoles d'estimation de biodisponibilité, afin de permettre une meilleure comparaison entre les résultats obtenus au sein de la communauté scientifique. Cette évolution contribuerait à terme à une meilleure estimation environnementale des flux nets métalliques et donc de la vulnérabilité des organismes aquatiques qui y sont exposés.

CONCLUSION GENERALE

et PERSPECTIVES

Les réseaux de biosurveillance sont à l'origine de découvertes notables en termes de contamination métallique et d'identification de sources potentielles. Face à la généralisation de son utilisation et un besoin d'intercomparaison à grande échelle, cette technique constitue un outil indispensable au suivi réglementaire de la qualité environnementale et dispose d'un grand potentiel pour la recherche scientifique qui mérite d'être développé. En réponse à cette problématique, ce travail avait pour objectif principal de s'interroger sur l'aide que peuvent apporter les outils géochimiques dans l'optimisation de l'interprétation du message environnemental transmis par ces programmes de biosurveillance. Les résultats obtenus à l'issue de cette thèse ont permis de dégager les conclusions suivantes :

1. L'estimation opérationnelle de la biodisponibilité potentielle des contaminants particuliers transportés du continent vers l'océan, nécessite des approches expérimentales adaptées aux paramètres environnementaux afin de ne pas être sous-estimée. Les processus géochimiques estuariens modifient fortement la repartition de Ag et Cu entre les phases dissoute et particulaire lors du cheminement du continent vers l'océan côtier. Ceci a des implications profondes sur les flux bruts et nets, respectivement à l'entrée et à la sortie de l'estuaire, et la biodisponibilité des ETM. Les extractions à l'HCl 1M ont permis d'estimer la fraction de Ag et Cu potentiellement désorbable le long de l'estuaire respectivement à 62,5 % et 82 % du flux particulaire brut. Cette estimation a permis de calculer des flux nets théoriques pour l'estuaire de la Gironde de 0,27 t de Ag_d et 51.5 t de Cu_d pour l'année 2015. Ces valeurs correspondent à la quantité de Ag et Cu potentiellement disponible pour les organismes vivant à l'embouchure de l'estuaire, dont les bancs d'huîtres sauvages échantillonnées annuellement par l'IFREMER dans le cadre du programme de biosurveillance RNO/ROCCH.

La comparaison des résultats obtenus par les extractions soumises aux différentes conditions expérimentales a permis de mettre en évidence la nécessité de s'approcher au plus des conditions environnementales. Nous avons ainsi pu observer l'impact d'un réactif limitant sur la sous-estimation de la biodisponibilité potentielle des éléments, pouvant atteindre jusqu'à

26,4 % pour Ag et 57,8 % pour Cu dans le cas d'une extraction à l'HCl 1M. Les résultats ont ainsi souligné la nécessité d'utiliser des concentrations en sédiment les plus proches des conditions environnementales ciblées par la simulation expérimentale, et de renouveler le milieu de désorption dans le cas d'une turbidité élevée.

2. L'expression combinée d'un ensemble de biomarqueurs induite par une exposition des organismes à Ag et Cu module le message environnemental et pourrait compléter les informations fournies par la biosurveillance. Dans le cas de l'exposition à Ag et Cu par voie directe, les observations effectuées sur les huîtres exposées dans des conditions expérimentales contrôlées proches de celles de la Gironde ont montré d'importantes atteintes histopathologiques au niveau des glandes digestives, comparables à celles observées sur les huîtres sauvages prélevées à l'embouchure de l'estuaire de la Gironde. Cette constatation témoigne de l'effet direct de la pollution métallique sur l'état physiologique des huîtres sauvages. L'expression d'un ensemble de biomarqueurs combinés a également été mesurée sur les organismes expérimentaux, témoignent d'un état de stress important des organismes généré par leur exposition à Ag et Cu (c.f. Rementeria et al., ANNEXE 2).

3. La cinétique d'accumulation directe des isotopes ^{107}Ag et ^{63}Cu par les huîtres a permis de confirmer un effet synergique de l'exposition à Cu sur l'accumulation de Ag, les résultats suggérant également un léger antagonisme de Ag sur l'accumulation de Cu à des niveaux d'exposition réalistes. L'ensemble de ces observations confirme la réponse de nombreux processus physiologiques mis en jeu dans l'accumulation des métaux par les organismes, et suggère l'importance que leur prise en compte systématique pourrait compléter l'interprétation du message environnemental fourni par la biosurveillance.

4. La méthode du dopage isotopique s'est avérée très puissante et précise pour le traçage simultané des dynamiques de bioaccumulation de Ag et Cu par voie directe à des niveaux de concentrations réalistes. Le dopage isotopique est un outil d'avenir vers et dans le biote. Par le passé, seul l'emploi de radio-isotopes à courte durée de vie permettait ce type de suivi expérimental (e.g. ^{110}Ag) avec des limitations importantes principalement liées à la disponibilité de radio-isotopes ainsi qu'à leur utilisation (permis de manipulation, infrastructure lourde). Le dopage par isotopes stables et leur détection dans les tissus permet d'observer une accumulation dès les premiers jours d'exposition des organismes, avec une sensibilité

clairement améliorée par rapport à des analyses de concentrations classiques. La sensibilité de la méthode classique est fortement limitée par (i) les incertitudes analytiques et (ii) la forte variabilité inter-individuelle observée à l'intérieur des différents lots d'organismes. L'analyse du rapport isotopique modifié par le dopage est clairement plus sensible. Il permet également de tracer simultanément l'accumulation de différents ETM dans les différents organes (organotropisme) en utilisant l'isotope dopé.

5. La méthode du dopage isotopique apporte une plus-value aux approches expérimentales classiques utilisées en écotoxicologie par le fait de pouvoir quantifier (i) la quantité de métal accumulée pendant la période d'exposition, et (ii) la quantité de métal initialement (avant exposition) présente dans les tissus d'un même individu. Ceci est complètement impossible pour les méthodes écotoxicologiques classiques basées sur l'analyse élémentaire des métaux utilisant un lot d'organismes de référence sacrifié au début de l'expérimentation et/ou un autre lot d'organismes comme témoin, afin d'estimer l'accumulation de contaminants dans un troisième lot d'organismes exposés. En effet, la mesure de l'isotope en excès permet de quantifier l'accumulation pendant l'expérimentation, et la quantité de métal ayant un rapport isotopique naturel représente le contenu métallique initial dans les tissus. Malgré ces belles avancées méthodologiques, les expérimentations mises en place dans le cadre de cette thèse n'ont pas permis d'évaluer le rôle de la voie trophique dans la contamination des huîtres aux faibles niveaux d'exposition appliqués. Le protocole nécessite la mise au point de plusieurs optimisations afin de mener une expérimentation sur le long-terme, qui permettrait d'expliquer les concentrations importantes mesurées dans les glandes digestives des huîtres sauvages de l'estuaire de la Gironde. Au-delà de ces améliorations, les résultats observés sur les algues permettent cependant de considérer la méthode du dopage isotopique comme un outil prometteur pour le traçage de la voie trophique.

6. L'application de rapports élémentaires aux données de biosurveillance en complément des concentrations absolues mesurées dans les huîtres, permet de compléter le message environnemental des réseaux de biosurveillance. Les rapports élémentaires Cu/Ag mesurés dans les huîtres du RNO/ROCCH le long de la façade atlantique française ont permis une discrimination des sites en Rade de Brest mettant en évidence des sources de contamination là où les concentrations absolues n'avaient pas indiqué d'anomalies. Les résultats ont également permis de mettre en avant l'utilité de l'utilisation du rapport élémentaire

Cu/Ag dans le but de diminuer la variabilité inter-individuelle à l'intérieur des pools d'huîtres sauvages, ainsi que de la variabilité saisonnière observable sur les enregistrements historiques dans les huîtres du RNO/ROCCH. Les huîtres exposées à Ag et Cu dans des conditions expérimentales présentaient des rapports Cu/Ag 4 fois supérieurs à celui de l'eau après 28 jours d'exposition. Cependant, le suivi de la cinétique d'accumulation des isotopes ^{107}Ag et ^{63}Cu a montré un ajustement rapide du rapport Cu/Ag aux conditions d'exposition puisqu'il était modifié dès 7 jours d'exposition des organismes aux contaminants. Les rapports élémentaires Cu/Ag mesurés dans les huîtres sauvages de la côte atlantique ne reflètent donc pas de manière linéaire les concentrations auxquelles les huîtres sont exposées dans l'eau. Ainsi, l'application des rapports élémentaires aux données de biosurveillance nécessite la prise en compte des processus d'accumulation des éléments concernés par les organismes ciblés, la régulation ou l'excrétion préférentielle d'un des éléments pouvant constituer un biais dans l'interprétation du message environnemental.

Face à l'émergence de nouvelles techniques analytiques et l'amélioration constante des connaissances sur les réponses des espèces sentinelles aux contaminants, les réseaux de biosurveillance présentent un grand potentiel d'évolution. Enfin, les résultats originaux acquis dans le cadre de cette thèse ont permis d'envisager de nouvelles perspectives pour les travaux à venir :

- Le rôle de la voie trophique à des niveaux de contaminations métalliques réalistes reste encore mal documenté, et nécessite un travail approfondi sur les protocoles expérimentaux. Il serait intéressant de pouvoir observer avec précision la cinétique de bioaccumulation des ETM avec des expérimentations longues (plusieurs mois) pour les deux types de voie de contamination (directe et trophique) afin d'expliquer les concentrations mesurées par les réseaux de biosurveillance. Si la méthode du dopage isotopique offre d'importantes performances de traçage, ce genre d'expérimentation reste soumis à de nombreuses contraintes techniques (entretien quotidien des aquariums, quantité d'organismes nécessaires, coût analytique, infrastructures adaptées...) pouvant constituer un obstacle à la réalisation de ce type de projets.
- Le fort potentiel de la méthode de dopage isotopique mériterait d'être exploité à une large échelle (autres ETM, autres organismes), en observant des cinétiques de co-accumulation

d'autres cocktails de métaux afin d'identifier plus précisément les phénomènes de co-régulations entre ETM à des niveaux d'exposition réalistes. Ces connaissances couplées à l'utilisation des rapports élémentaires permettraient *in fine* d'améliorer la précision du message environnemental transmis par les organismes sentinelles.

- La mise en place d'expérimentations *in vivo* en laboratoire puis *in situ* visant à calibrer des capteurs passifs (e.g. DGT) serait souhaitable. En effet, la comparaison de l'accumulation des ETM par les bivalves à celle dans les capteurs passifs, permettrait d'évaluer la variabilité de la réponse de différentes populations face à une exposition donnée. De plus, le potentiel des capteurs passifs pour quantifier la spéciation des métaux dissous (fraction labile) pourrait contribuer à meilleure compréhension des voies de transfert.
- L'étude systématique de l'expression de la batterie de biomarqueurs sur l'ensemble des sites biosurveillés, permettrait à terme de calibrer les réponses physiologiques à une exposition donnée.

BIBLIOGRAPHIE

Abbe, G.R., and Sanders, J.G. (1990). Pathways of silver uptake and accumulation by the American oyster (*Crassostrea virginica*) in Chesapeake Bay. *Estuar. Coast. Shelf Sci.* **31**, 113–123.

Abril, G., Etcheber, H., Le Hir, P., Bassoullet, P., Boutier, B., and Franki-Gnoulle, M. (1999). Oxic/anoxic oscillations and organic carbon mineralization in an estuarine maximum turbidity zone (The Gironde, France). *Limnol. Oceanogr.* **44**, 1304–1315.

Abril, G., Nogueira, M., Etcheber, H., Cabeçadas, G., Lemaire, E., and Brogueira, M.J. (2002). Behaviour of organic carbon in nine contrasting European estuaries. *Estuar. Coast. Shelf Sci.* **54**, 241–262.

Achterberg, E.P., Herzl, V.M., Braungardt, C.B., and Millward, G.E. (2003). Metal behaviour in an estuary polluted by acid mine drainage: the role of particulate matter. *Environ. Pollut.* **121**, 283–292.

Adams, N.W.H., and Kramer, J.R. (1998). Reactivity of Ag⁺ ion with thiol ligands in the presence of iron sulfide. *Environ. Toxicol. Chem.* **17**, 625–629.

Ahner, B.A., and Morel, F.M.M. (1995). Phytochelatin production in marine algae. 2. Induction by various metals. *Limnol. Oceanogr.* **40**, 658–665.

Alzieu, C. (1998). Tributyltin: case study of a chronic contaminant in the coastal environment. *Ocean Coast. Manag.* **40**, 23–36.

Alzieu, C.L., Sanjuan, J., Deltreil, J.P., and Borel, M. (1986). Tin contamination in Arcachon Bay: Effects on oyster shell anomalies. *Mar. Pollut. Bull.* **17**, 494–498.

Amiard, J.-C. (2011). Les risques chimiques environnementaux: Méthodes d'évaluation et impacts sur les organismes (Lavoisier), 782 pp.

Amiard, J.-C., and Amiard-Triquet, C. (2008). Les biomarqueurs dans l'évaluation de l'état écologique des milieux aquatiques (Lavoisier), 403 pp.

Amiard, J.-C., Perrein-Ettajani, H., Gérard, A., Baud, J.P., and Amiard-Triquet, C. (2004). Influence of Ploidy and Metal–Metal Interactions on the Accumulation of Ag, Cd, and Cu in Oysters *Crassostrea Gigas* Thunberg. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* **48**, 68–74.

Amiard, J.-C., Amiard-Triquet, C., Barka, S., Pellerin, J., and Rainbow, P.S. (2006). Metallothioneins in aquatic invertebrates: Their role in metal detoxification and their use as biomarkers. *Aquat. Toxicol.* **76**, 160–202.

Amiard-Triquet, C. (2009). Behavioral Disturbances: The missing link between sub-organismal and supra-organismal responses to stress? Prospects based on aquatic research. *Hum. Ecol. Risk Assess. Int. J.* **15**, 87–110.

Amiard-Triquet, C., and Dauvin, J.C. (2009). Chemical contamination and bioavailability of contaminants. in: Amiard-Triquet, C., and Rainbow, P.S. (Ed), CRC Press, pp. 2-7. In Environmental Assessment of Estuarine Ecosystems. (Amiard-Triquet, C., and Rainbow, P.S.), pp. 2–7.

Amiard-Triquet, C., Berthet, B., and Martoja, R. (1991). Influence of salinity on trace metal (Cu, Zn, Ag) accumulation at the molecular, cellular and organism level in the oyster *Crassostrea gigas*. *Biol. Met.* 4, 144–150.

Apte, S.C., Gardner, M.J., and Ravenscroft, J.E. (1990). An investigation of copper complexation in the Severn estuary using differential pulse cathodic stripping voltammetry. *Mar. Chem.* 29, 63–75.

Arzul, G., and Maguer, J.-F. (1990). Influence of pig farming on the copper content of estuarine sediments in Brittany, France. *Mar. Pollut. Bull.* 21, 431–434.

Au, D.W.T. (2004). The application of histo-cytopathological biomarkers in marine pollution monitoring: a review. *Mar. Pollut. Bull.* 48, 817–834.

Audry, S., Schäfer, J., Blanc, G., and Jouanneau, J.-M. (2004a). Fifty-year sedimentary record of heavy metal pollution (Cd, Zn, Cu, Pb) in the Lot River reservoirs (France). *Environ. Pollut.* 132, 413–426.

Audry, S., Schäfer, J., Blanc, G., Bossy, C., and Lavaux, G. (2004b). Anthropogenic components of heavy metal (Cd, Zn, Cu, Pb) budgets in the Lot-Garonne fluvial system (France). *Appl. Geochem.* 19, 769–786.

Audry, S., Blanc, G., and Schäfer, J. (2004c). Cadmium transport in the Lot–Garonne River system (France) – temporal variability and a model for flux estimation. *Sci. Total Environ.* 319, 197–213.

Audry, S., Blanc, G., and Schäfer, J. (2006). Solid state partitioning of trace metals in suspended particulate matter from a river system affected by smelting-waste drainage. *Sci. Total Environ.* 363, 216–236.

Audry, S., Blanc, G., Schäfer, J., and Robert, S. (2007). Effect of estuarine sediment resuspension on early diagenesis, sulfide oxidation and dissolved molybdenum and uranium distribution in the Gironde estuary, France. *Chem. Geol.* 238, 149–167.

Ballan-Dufrançais, C., Marcaillou, C., and Amiard-Triquet, C. (1991). Response of the phytoplanktonic alga *Tetraselmis suecica* to copper and silver exposure: vesicular metal bioaccumulation and lack of starch bodies. *Biol. Cell* 72, 103–112.

Barillé, L., Prou, J., Héral, M., and Bourgrier, S. (1993). No influence of food quality, but ration-dependent retention efficiencies in the Japanese oyster *Crassostrea gigas*. *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 171, 91–106.

Barille, L., Heral, M., and Barilleboyer, A. (1997). Ecophysiological deterministic model for *Crassostrea gigas* in an estuarine environment. *Aquat. Living Resour.* 10, 31–48.

Barillé, L., Prou, J., Héral, M., and Razet, D. (1997). Effects of high natural seston concentrations on the feeding, selection, and absorption of the oyster *Crassostrea gigas* (Thunberg). *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 212, 149–172.

Barriada, J.L., Tappin, A.D., Evans, E.H., and Achterberg, E.P. (2007). Dissolved silver measurements in seawater. *TrAC Trends Anal. Chem.* 26, 809–817.

Baudrimont, M., Andrès, S., Metivaud, J., Lapaquellerie, Y., Ribeyre, F., Maillet, N., Latouche, C., and 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.

Baudrimont, M., Schäfer, J., Marie, V., Maury-Brachet, R., Bossy, C., Boudou, A., and Blanc, G. (2005). Geochemical survey and metal bioaccumulation of three bivalve species (*Crassostrea gigas*, *Cerastoderma edule* and *Ruditapes philippinarum*) in the Nord Médoc salt marshes (Gironde estuary, France). *Sci. Total Environ.* 337, 265–280.

Bell, R.A., and Kramer, J.R. (1999). Structural chemistry and geochemistry of silver-sulfur compounds: Critical review. *Environ. Toxicol. Chem.* 18, 9–22.

Bell, R.A., Bennett, S., Britten, J.F., and Hu, M. (1997). Silver complexes of environmental and related thiols: Structural studies. *Hamilt. Can.* 10–15.

Bielmyer, G., Brix, K., and Grosell, M. (2008). Is Cl⁻ protection against silver toxicity due to chemical speciation? *Aquat. Toxicol.* 87, 81–87.

Bielmyer, G.K., Grosell, M., and Brix, K.V. (2006). Toxicity of Silver, Zinc, Copper, and Nickel to the Copepod *Acartia tonsa* Exposed via a Phytoplankton Diet. *Environ. Sci. Technol.* 40, 2063–2068.

Bielmyer-Fraser, G.K., Jarvis, T.A., Lenihan, H.S., and Miller, R.J. (2014). Cellular Partitioning of Nanoparticulate versus Dissolved Metals in Marine Phytoplankton. *Environ. Sci. Technol.* 48, 13443–13450.

Blanc, G., Lapaquellerie, Y., Maillet, N., and Anschutz, P. (1999). A cadmium budget for the Lot-Garonne fluvial system (France). *Hydrobiologia* 331–341.

Bossuyt, B.T.A., and Janssen, C.R. (2005). Copper regulation and homeostasis of *Daphnia magna* and *Pseudokirchneriella subcapitata*: influence of acclimation. *Environ. Pollut.* 136, 135–144.

Bougrier, S., Collet, B., Geairon, P., Geffard, O., Héral, M., and Deslous-Paoli, J.. (1998). Respiratory time activity of the Japanese oyster *Crassostrea gigas* (Thunberg). *J. Exp. Mar. Biol. Ecol.* 219, 205–216.

Boutier, B. (1981). Synthèse des résultats de la surveillance des micropolluants dans la matière vivante en 1979. Institut Scientifique et Technique des pêches Maritimes, IFREMER, 63 pp.

Boutier, B., Chiffolleau, J.-F., Jouanneau, J.-M., Latouche, C., and Philipps, I. (1989). La contamination de la Gironde par le cadmium : origine, extension, importance. Rapport scientifique et technique de l'IFREMER, 104 pp.

- Bova, F. (2011). Les filières pêches et aquaculture (Montreuil-sous-Bois: France Agrimer).
- Boyle, E., Collier, R., Dengler, A.T., Edmond, J.M., Ng, A.C., and Stallard, R.F. (1974). On the chemical mass-balance in estuaries. *Geochim. Cosmochim. Acta* 38, 1719–1728.
- Boyle, E.A., Husted, S.S., and Grant, B. (1982). The chemical mass balance of the amazon plume—II. Copper, nickel, and cadmium. *Deep Sea Res. Part Oceanogr. Res. Pap.* 29, 1355–1364.
- Brook, R.D., Franklin, B., Cascio, W., Hong, Y., Howard, G., Lipsett, M., Luepker, R., Mittleman, M., Samet, J., Smith, S.C., et al. (2004). Air Pollution and Cardiovascular Disease. *Circulation* 109, 2655–2671.
- Brown, B.E. (1982). THE FORM AND FUNCTION OF METAL-CONTAINING “GRANULES” IN INVERTEBRATE TISSUES. *Biol. Rev.* 57, 621–667.
- Brown, D.A., and Parsons, T.R. (1978). Relationship between cytoplasmic distribution of mercury and toxic effects to zooplankton and chum salmon (*Oncorhynchus keta*) exposed to mercury in a controlled ecosystem. *J. Fish. Res. Board Can.* 35, 880–884.
- Brown, L.N., Robinson, M.G., and Hall, B.D. (1988). Mechanisms for copper tolerance in *Amphora coffeaeformis*-internal and external binding. *Mar. Biol.* 97, 581–586.
- Brügmann, L. (1995). Metals in sediments and suspended matter of the river Elbe. *Sci. Total Environ.* 159, 53–65.
- Bryan, G.W., and Langston, W.J. (1992). Bioavailability, accumulation and effects of heavy metals in sediments with special reference to United Kingdom estuaries: a review. *Environ. Pollut.* 76, 89–131.
- Buffle, J., and Leppard, G.G. (1995). Characterization of Aquatic Colloids and Macromolecules. 1. Structure and Behavior of Colloidal Material. *Environ. Sci. Technol.* 29, 2169–2175.
- C**almon, P., Garnier-Laplace, J., and Fortin, C. (2002). Argent 110m et environnement. 15 pp.
- Camara, M.D., Griffith, S.M., and Evans, S. (2005). Can selective breeding reduce the heavy metals content of pacific oysters (*crassostrea gigas*), and are there trade-offs with growth or survival? *J. Shellfish Res.* 24, 979–986.
- Campbell, P. (1988). Biologically available metals in sediments (National Research Council, Ottawa, Canada, Associate Committee on Scientific Criteria for Environmental Quality), 298 pp.
- Campbell, P., and Couillard, Y. (2004). Prise en charge et détoxification des métaux chez les organismes aquatiques. *Écotoxicologie Moléculaire-Principes Fondam. Perspect. Dév.* Ed. E Pelletier PGC Campbell F Denizeau Press. Univ. Qué. Ste-Foy Quebec Can. 9–61.
- Campbell, P.G., Errécalde, O., Fortin, C., Hiriart-Baer, V.P., and Vigneault, B. (2002). Metal bioavailability to phytoplankton—applicability of the biotic ligand model. *Comp. Biochem. Physiol. Part C Toxicol. Pharmacol.* 133, 189–206.

- Cantillo, A.. (1998). Comparison of results of Mussel Watch Programs of the United States and France with Worldwide Mussel Watch Studies. *Mar. Pollut. Bull.* 36, 712–717.
- Carpene, E. (1993). Metallothionein in marine molluscs. In *Ecotoxicology of Metals in Invertebrates*, pp. 55–72.
- Castaing, P., and Allen, G.P. (1981). Mechanisms controlling seaward escape of suspended sediment from the Gironde: A macrotidal estuary in France. *Mar. Geol.* 40, 101–118.
- Chang, H., Jwo, C., Lo, C., Tsung, T., Kao, M., and Lin, H. (2005). Rheology of CuO nanoparticle suspension prepared by ASNSS. *Rev Adv Mater Sci* 10, 128–132.
- Chen, Z., and Mayer, L.M. (1998). Mechanisms of Cu Solubilization during Deposit Feeding. *Environ. Sci. Technol.* 32, 770–775.
- Chiffolleau, J.-F., Cossa, D., Auger, D., and Truquet, I. (1994). Trace metal distribution, partition and fluxes in the Seine estuary (France) in low discharge regime. *Mar. Chem.* 47, 145–158.
- Chiffolleau, J.-F., Auger, D., Chartier, E., Grouhel, A., and Thébaud, M.-J. (2003). Dosage de certains métaux traces: (Ag, Cd, Cr, Cu, Ni, Pb, V, Zn) dans les organismes marins par absorption atomique (IFREMER, Editions Quae). 36 pp.
- Chiffolleau, J.-F., Auger, D., Roux, N., Rozuel, E., and Santini, A. (2005). Distribution of silver in mussels and oysters along the French coasts: Data from the national monitoring program. *Mar. Pollut. Bull.* 50, 1719–1723.
- Chuttani, H.K., Gupta, P.S., Gulati, S., and Gupta, D.N. (1965). Symposium on Antibiotics Acute copper sulfate poisoning. *Am. J. Med.* 39, 849–854.
- Claisse, D. (1989). Chemical contamination of French coasts: the results of a ten years mussel watch. *Mar. Pollut. Bull.* 20, 523–528.
- Claisse, D. (2012). Cahier de procédures et de programmation du ROCCH sanitaire. 17 pp.
- Cline, S.R., and Reed, B.E. (1995). Lead Removal from Soils via Bench-Scale Soil Washing Techniques. *J. Environ. Eng.* 121, 700–705.
- Coale, K.H., and Bruland, K.W. (1988). Copper complexation in the Northeast Pacific. *Limnol. Oceanogr.* 33, 1084–1101.
- Cobelo-García, A., Prego, R., and Labandeira, A. (2004). Land inputs of trace metals, major elements, particulate organic carbon and suspended solids to an industrial coastal bay of the NE Atlantic. *Water Res.* 38, 1753–1764.
- Comber, S.D.W., Gunn, A.M., and Whalley, C. (1995). Comparison of the partitioning of trace metals in the Humber and Mersey estuaries. *Mar. Pollut. Bull.* 30, 851–860.
- Connell, D.B., Sanders, J.G., Riedel, G.F., and Abbe, G.R. (1991). Pathways of silver uptake and trophic transfer in estuarine organisms. *Environ. Sci. Technol.* 25, 921–924.

Couillard, Y., Campbell, P.G.C., Auclair, J.G., and Pellerin-Massicotte, J. (1995). Field transplantation of a freshwater bivalve, *Pyganodon grandis*, across a metal contamination gradient. II. Metallothionein response to Cd and Zn exposure, evidence for cytotoxicity, and links to effects at higher levels of biological organization. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 52, 703–715.

Cowan, C.E., Jenne, E.A., and Crecelius, E.A. (1985). Silver speciation in seawater: the importance of sulfide and organic complexation. In *Marine and Estuarine Geochemistry*, (Michigan: Sigleo, A.C., Hattori, A.), pp. 285–303.

Coynel, A., Etcheber, H., Abril, G., Maneux, E., Dumas, J., and Hurtrez, J.-E. (2005). Contribution of small mountainous rivers to particulate organic carbon input in the Bay of Biscay. *Biogeochem.* 74, 151–171.

Coynel, A., Schäfer, J., Blanc, G., and Bossy, C. (2007). Scenario of particulate trace metal and metalloid transport during a major flood event inferred from transient geochemical signals. *Appl. Geochem.* 22, 821–836.

Coynel, A., Blanc, G., Marache, A., Schäfer, J., Dabrin, A., Maneux, E., Bossy, C., Masson, M., and Lavaux, G. (2009). Assessment of metal contamination in a small mining- and smelting-affected watershed: high resolution monitoring coupled with spatial analysis by GIS. *J. Environ. Monit.* 11, 962.

Cross, I., and Rebordinos, L. (2003). Effect of marine contamination on the genetic population structure of the bivalve *Crassostrea angulata*. *Cienc. Mar.* 29, 239–250.

Croteau, M.-N., Luoma, S.N., Topping, B.R., and Lopez, C.B. (2004). Stable Metal Isotopes Reveal Copper Accumulation and Loss Dynamics in the Freshwater Bivalve *Corbicula*. *Environ. Sci. Technol.* 38, 5002–5009.

Dabrin, A. (2009). Mécanismes de transfert des éléments traces métalliques (ETM) et réactivité estuarienne - Cas des systèmes Gironde, Charente, Seudre, et Baie de Marennes Oléron. Thèse d'état. Université de Bordeaux 1, 397 pp.

Dabrin, A., Schäfer, J., Blanc, G., Strady, E., Masson, M., Bossy, C., Castelle, S., Girardot, N., and Coynel, A. (2009). Improving estuarine net flux estimates for dissolved cadmium export at the annual timescale: Application to the Gironde Estuary. *Estuar. Coast. Shelf Sci.* 84, 429–439.

Dagnino, A., Allen, J., Moore, M., Broeg, K., Canesi, L., and Viarengo, A. (2007). Integration of biomarker data into an organism health index: Development of an expert system and its validation with field and laboratory data in mussels. *Biomarkers* 12, 155–172.

Daskalakis, K.D. (1996). Variability of metal concentrations in oyster tissue and implications to biomonitoring. *Mar. Pollut. Bull.* 32, 794–801.

David, V. (2006). Variabilité spatio-temporelle du zooplancton dans l'estuaire de la Gironde et implications au sein du réseau trophique planctonique. Thèse d'état. Université de Bordeaux 1.

Davies, M.S., Hawkins, S.J., and Jones, H.D. (1990). Mucus production and physiological energetics in *Patella vulgata*. *J. Molluscan Stud.* 56, 499–503.

De Lafontaine, Y., Gagné, F., Blaise, C., Costan, G., Gagnon, P., and Chan, H.M. (2000). Biomarkers in zebra mussels (*Dreissena polymorpha*) for the assessment and monitoring of water quality of the St Lawrence River (Canada). *Aquat. Toxicol.* 50, 51–71.

Debelius, B., Forja, J.M., DelValls, Á., and Lubián, L.M. (2009). Toxicity and bioaccumulation of copper and lead in five marine microalgae. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 72, 1503–1513.

Deslous-Paoli, J.-M., Heral, M., Goulletquer, P., Boromthanarat, W., Razet, D., Garnier, J., Prou, J., and Barille, L. (1987). Evolution saisonnière de la filtration de bivalves intertidaux dans des conditions naturelles. *Océanis* 13, 575–579.

Deycard V.N., Schäfer J., Blanc G., Coynel A., Petit J.C.J., Kessaci K., Lanceleur L., Dutruch L., Bossy C. Inputs, dynamics and potential impacts of Silver (Ag) from urban wastewater release into the Gironde Estuary. *Chemosphere* 167, 501–511.

Deycard, V.N., Schäfer, J., Blanc, G., Coynel, A., Petit, J.C.J., Lanceleur, L., Dutruch, L., Bossy, C., and Ventura, A. (2014). Contributions and potential impacts of seven priority substances (As, Cd, Cu, Cr, Ni, Pb, and Zn) to a major European Estuary (Gironde Estuary, France) from urban wastewater. *Mar. Chem.* 167, 123–134.

Di Toro, D.M., Allen, H.E., Bergman, H.L., Meyer, J.S., Paquin, P.R., and Santore, R.C. (2001). Biotic ligand model of the acute toxicity of metals. 1. Technical Basis. *Environ. Toxicol. Chem.* 20, 2383–2396.

Eisler, R. (1996). Silver hazards to fish, wildlife, and invertebrates: a synoptic review. Contaminant Hazard Reviews. National biological service laurel md patuxent wildlife research center, 53 pp.

Elbaz-Poulichet, F., Goye, Garnier, J.-M., Guan, D.M., Martin, J.-M., and Thomas, A.J. (1996). The Conservative Behaviour of Trace Metals (Cd, Cu, Ni and Pb) and As in the Surface Plume of Stratified Estuaries: Example of the Rhône River (France). *Estuar. Coast. Shelf Sci.* 42, 289–310.

EPA (2016). US Environmental Protection Agency. www.epa.gov. Dernière consultation le 22 juin 2016.

Etcheber, H., Taillez, A., Abril, G., Garnier, J., Servais, P., Moatar, F., and Commarieu, M.-V. (2007). Particulate organic carbon in the estuarine turbidity maxima of the Gironde, Loire and Seine estuaries: origin and lability. *Hydrobiologia* 588, 245–259.

Etcheber, H., Castaing, P., Schmidt, S., Maneux, E., Sottolichio, A., Moatar, F., and Commarieu, M. (2009). Réseau MAGEST, Mesures automatisées pour la surveillance de la Gironde: rapport d'activité du 1er novembre 2007 au 31 octobre 2008, Interprétation des données. 8 pp.

Ettajani, H., Amiard-Triquet, C., and Amiard, J.-C. (1992a). Etude expérimentale du transfert de deux éléments traces (Ag, Cu) dans une chaîne trophique marine: Eau - Particules (sédiment

natural, microalgue) - Mollusques filtreurs (*Crassostrea gigas* Thunberg). Water. Air. Soil Pollut. 65, 215–236.

Ettajani, H., Amiard-Triquet, C., and Amiard, J. (1992b). Experimental Study on the Transfer of Two Trace Elements (Ag, Cu) through a Marine Trophic Chain: Water-Particulate Matter(Natural Sediment, Microalgae) - Filter-Feeding Mollusks(*Crassostrea gigas*). Water Air Soil Pollut. WAPLAC 65.

Ettajani, H., Berthet, B., Amiard, J.-C., and Chevolot, L. (2001). Determination of Cadmium Partitioning in Microalgae and Oysters: Contribution to the Assessment of Trophic Transfer. Arch. Environ. Contam. Toxicol. 40, 209–221.

Fabrega, J., Luoma, S.N., Tyler, C.R., Galloway, T.S., and Lead, J.R. (2011). Silver nanoparticles: Behaviour and effects in the aquatic environment. Environ. Int. 37, 517–531.

Fan, W., Wang, W.-X., and Chen, J. (2002). Geochemistry of Cd, Cr, and Zn in Highly Contaminated Sediments and Its Influences on Assimilation by Marine Bivalves. Environ. Sci. Technol. 36, 5164–5171.

FAO (2016). Fisheries & Aquaculture - Programme d'Information sur les espèces aquatiques cultivées - *Crassostrea gigas* (Thunberg, 1793).

Fisher, N.S., and Wang, W.-X. (1998). Trophic transfer of silver to marine herbivores: A review of recent studies. Environ. Toxicol. Chem. 17, 562–571.

Flemming, C.A., and Trevors, J.T. (1989). Copper toxicity and chemistry in the environment: a review. Water. Air. Soil Pollut. 44, 143–158.

Fortin, C., and Campbell, P.G.C. (2001). Thiosulfate Enhances Silver Uptake by a Green Alga: Role of Anion Transporters in Metal Uptake. Environ. Sci. Technol. 35, 2214–2218.

Frías-Espericueta, M.G., Osuna-López, J.I., and Páez-Osuna, F. (1999). Gonadal maturation and trace metals in the mangrove oyster *Crassostrea corteziensis*: seasonal variation. Sci. Total Environ. 231, 115–123.

García-Luque, E., Sáenz, I., Riba, I., Del-Valls, T.A., Forja, J.M., and Gómez-Parra, A. (2003). Heavy metals at the Guadalquivir estuary. Cienc. Mar. 29, 457–468.

Geffard, A., Smith, B.D., Amiard-Triquet, C., Jeantet, A.Y., and Rainbow, P.S. (2005). Kinetics of trace metal accumulation and excretion in the polychaete *Nereis diversicolor*. Mar. Biol. 147, 1291–1304.

Geffard, A., Geffard, O., Amiard, J.C., His, E., and Amiard-Triquet, C. (2007). Bioaccumulation of Metals in Sediment Elutriates and Their Effects on Growth, Condition Index, and Metallothionein Contents in Oyster Larvae. Arch. Environ. Contam. Toxicol. 53, 57–65.

Géret, F. (2002). Influence of metal exposure on metallothionein synthesis and lipid peroxidation in two bivalve mollusks: the oyster (*Crassostrea gigas*) and the mussel (*Mytilus edulis*). Aquat. Living Resour. 15, 61–66.

Gleason, R.P. (1968). Exposure to Copper Dust. *Am. Ind. Hyg. Assoc. J.* 29, 461–462.

Goldberg, E.D., Bowen, V.T., Farrington, J.W., Harvey, G., Martin, J.H., Parker, P.L., Risebrough, R.W., Robertson, W., Schneider, E., and Gamble, E. (1978). The Mussel Watch. *Environ. Conserv.* 5, 101–125.

Gold-Bouchot, G., Simá-Alvarez, R., Zapata-Pérez, O., and Güemez-Ricalde, J. (1995). Histopathological effects of petroleum hydrocarbons and heavy metals on the American oyster (*Crassostrea virginica*) from Tabasco, Mexico. *Mar. Pollut. Bull.* 31, 439–445.

Goosen, N.K., Kromkamp, J., Peene, J., van Rijswijk, P., and van Breugel, P. (1999). Bacterial and phytoplankton production in the maximum turbidity zone of three European estuaries: the Elbe, Westerschelde and Gironde. *J. Mar. Syst.* 22, 151–171.

Gordon, M., Knauer, G.A., and Martin, J.H. (1980). *Mytilus californianus* as a bioindicator of trace metal pollution: Variability and statistical considerations. *Mar. Pollut. Bull.* 11, 195–198.

Goulletquer, P. (1995). Cycle de reproduction naturelle de l’huître creuse *Crassostrea gigas*. Bivalves Aquaculture Marine, Groupe de travail sur la Reproduction des Mollusques. 12 pp.

Guillard, R.R.L. (1975). Culture of Phytoplankton for Feeding Marine Invertebrates. 31 pp.

Hayes, M.O. (1975). Morphology of sand accumulation in estuaries: an introduction to the symposium. *Estuar. Res.* 2, 3–22.

Hiriartbaer, V., Fortin, C., Lee, D., and Campbell, P. (2006). Toxicity of silver to two freshwater algae, *Chlamydomonas reinhardtii* and *Pseudokirchneriella subcapitata*, grown under continuous culture conditions: Influence of thiosulphate. *Aquat. Toxicol.* 78, 136–148.

His, E. (1975). La détection des pontes dans le milieu naturel : application de l’ostréographie à l’étude de la reproduction des huîtres. Ifremer, 10 pp.

Holloway, G.J., Sibly, R.M., and Povey, S.R. (1990). Evolution in Toxin-Stressed Environments. *Funct. Ecol.* 4, 289.

Ifremer – envlit accès aux données. www.envlit.ifremer.fr.

INERIS (2005). Cuivre et ses dérivés. Fiche de données toxicologiques et environnementales des substances chimiques. 66 pp.

INERIS (2014). Données technico-économiques sur les substances chimiques en France: Argent et Nano-argent, DRC-14-136881-07002A, 44 pp.

Institut Européen du Cuivre. www.copperalliance.fr. Dernière consultation le 2 septembre 2016.

Jing, G., Li, Y., Xie, L., and Zhang, R. (2006). Metal accumulation and enzyme activities in gills and digestive gland of pearl oyster (*Pinctada fucata*) exposed to copper. *Comp. Biochem. Physiol. Part C Toxicol. Pharmacol.* 144, 184–190.

Jones, D.E., and Turner, A. (2010). Bioaccessibility and mobilisation of copper and zinc in estuarine sediment contaminated by antifouling paint particles. *Estuar. Coast. Shelf Sci.* 87, 399–404.

Jouanneau, J.-M. (1982). Matières en suspension et oligo-éléments métalliques dans le système estuarien Girondin: comportement et flux. Thèse d'état. Université de Bordeaux 1. 150 pp.

Jouanneau, J.M., Boutier, B., Chiffoleau, J.-F., Latouche, C., and Philipps, I. (1990). Fate and Effects of Toxic Chemicals in Large Rivers and Their Estuaries Cadmium in the Gironde fluvioestuarine system: Behaviour and flow. *Sci. Total Environ.* 97, 465–479.

Jouanneau, J.M., Lapaquellerie, Y., and Latouche, C. (1993). Origin and pathways of Cadmium Contamination in the Gironde estuary, Garonne river and tributaries. In *Studies in Environmental Science*, (Elsevier), pp. 373–389.

Kalman, J., and Turner, A. (2007). An evaluation of metal bioaccessibility in estuarine sediments using the commercially available protein, bovine serum albumin. *Mar. Chem.* 107, 486–497.

Kapkov, V.I., and Belenikina, O.A. (2007). A study of the resistance of mass marine algae to heavy metals. *Mosc. Univ. Biol. Sci. Bull.* 62, 30–33.

Katranitsas, A., Castritsi-Catharios, J., and Persoone, G. (2003). The effects of a copper-based antifouling paint on mortality and enzymatic activity of a non-target marine organism. *Mar. Pollut. Bull.* 46, 1491–1494.

Kim, Y., Powell, E.N., Wade, T.L., and Presley, B.J. (2008). Relationship of parasites and pathologies to contaminant body burden in sentinel bivalves: NOAA Status and Trends “Mussel Watch” Program. *Mar. Environ. Res.* 65, 101–127.

Kraepiel, A.M.L., Chiffoleau, J.-F., Martin, J.-M., and Morel, F.M.M. (1997). Geochemistry of trace metals in the Gironde estuary. *Geochim. Cosmochim. Acta* 61, 1421–1436.

Lanceleur, L. (2011). L'argent: sources, transfert et bioaccumulation -CAs du système fluvio-estuarien girondin-. Thèse d'état. Université de Bordeaux 1. 293 pp.

Lanceleur, L., Schäfer, J., Bossy, C., Coynel, A., Larrose, A., Masson, M., and Blanc, G. (2011a). Silver fluxes to the Gironde Estuary – Eleven years (1999–2009) of monitoring at the watershed scale. *Appl. Geochem.* 26, 797–808.

Lanceleur, L., Schäfer, J., Chiffoleau, J.-F., Blanc, G., Auger, D., Renault, S., Baudrimont, M., and Audry, S. (2011b). Long-term records of cadmium and silver contamination in sediments and oysters from the Gironde fluvial–estuarine continuum – Evidence of changing silver sources. *Chemosphere* 85, 1299–1305.

Lanceleur, L., Schäfer, J., Blanc, G., Coynel, A., Bossy, C., Baudrimont, M., Glé, C., Larrose, A., Renault, S., and Strady, E. (2013). Silver behaviour along the salinity gradient of the Gironde Estuary. *Environ. Sci. Pollut. Res.* 20, 1352–1366.

Lapaquellerie, Y., Jouanneau, J.M., Maillet, N., and Latouche, C. (1995). Cadmium pollution in sediments of the Lot River (France), estimate of the mass of cadmium. *Environ. Technol.* **16**, 1145–1154.

Lawrence, D.R., and Scott, G.I. (1982). The Determination and Use of Condition Index of Oysters. *Estuaries* **5**, 23.

Le Floch, P. (1961). Propagation de la marée dans l'Estuaire de la Seine et en Seine Maritime. Thèse d'état. Université de Paris. 507 pp.

Lemière, B., Clozel, B., and Charbonnier, P. (2002). Etude de l'origine des pollutions métalliques naurelles du bassin versant de la Rade de Brest. BRGM. 29 pp.

Leung, K.M.Y., Taylor, A.C., and Furness, R.W. (2000). Temperature-dependent physiological responses of the dogwhelk *Nucella lapillus* to cadmium exposure. *J. Mar. Biol. Assoc. U. K.* **80**, 647–660.

Lobel, P.B., Belkhode, S.P., Jackson, S.E., and Longerich, H.P. (1989). A universal method for quantifying and comparing the residual variability of element concentrations in biological tissues using 25 elements in the mussel *Mytilus edulis*. *Mar. Biol.* **102**, 513–518.

Lobel, P.B., Bajdik, C.D., Belkhode, S.P., Jackson, S.E., and Longerich, H.P. (1991). Improved protocol for collecting mussel watch specimens taking into account sex, size, condition, shell shape, and chronological age. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* **21**, 409–414.

Luoma, S.N. (1989). Can we determine the biological availability of sediment-bound trace elements? *Hydrobiologia* **176–177**, 379–396.

Luoma, S.N., Ho, Y.B., and Bryan, G.W. (1995). Proceedings of the Third International Conference on Trace Metals in the Aquatic Environment Fate, bioavailability and toxicity of silver in estuarine environments. *Mar. Pollut. Bull.* **31**, 44–54.

Maguer, J.-F. (1990). Analyse du cuivre dans les sédiments des estuaires bretons. Relation avec quelques paramètres physicochimiques. Influence de l'élevage porcin.

Marchand, J., Quiniou, L., Riso, R., Thebaut, M.-T., and Laroche, J. (2004). Physiological cost of tolerance to toxicants in the European flounder *Platichthys flesus*, along the French Atlantic Coast. *Aquat. Toxicol.* **70**, 327–343.

Marie, V. (2005). Etude de la réponse des métallothionéines chez les bivalves, *Corbicula fulminea*, *Dreissena polymorpha* et *Crassostrea gigas*, après exposition au cadmium et au zinc. Approches in situ et expérimentales. Thèse d'état. Université de Bordeaux 1. 461 pp.

Marigómez, I., Soto, M., Cajaraville, M.P., Angulo, E., and Giamberini, L. (2002). Cellular and subcellular distribution of metals in molluscs. *Microsc. Res. Tech.* **56**, 358–392.

Martin, D., and Rainbow, P.. (1998a). Haemocyanin and the binding of cadmium and zinc in the haemolymph of the shore crab *Carcinus maenas* (L.). *Sci. Total Environ.* **214**, 133–152.

Martin, D.J., and Rainbow, P.S. (1998b). The kinetics of zinc and cadmium in the haemolymph of the shore crab *Carcinus maenas* (L.). *Aquat. Toxicol.* **40**, 203–231.

- Martoja, R., and Martoja-Pierson, M. (1970). *Técnicas de histología animal*. 350 pp.
- Martoja, R., Ballan-Dufrançais, C., Jeantet, A.-Y., Gouzerh, P., Amiard, J.-C., Amiard-Triquet, C., Berthet, B., and Baud, J.-P. (1988). Effets chimiques et cytologiques de la contamination expérimentale de l'huître *Crassostrea gigas* Thunberg par l'argent administré sous forme dissoute et par voie alimentaire. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 45, 1827–1841.
- Mason, A., and Jenkins, K. (1995). Metal detoxification in aquatic organisms. In *Metal Speciation and Bioavailability in Aquatic Systems*, (Chichester: John Wiley & Sons), pp. 479–608.
- Masson, M., Blanc, G., and Schäfer, J. (2006). Geochemical signals and source contributions to heavy metal (Cd, Zn, Pb, Cu) fluxes into the Gironde Estuary via its major tributaries. *Sci. Total Environ.* 370, 133–146.
- Masson, M., Blanc, G., Schäfer, J., Parlanti, E., and Le Coustumer, P. (2011). Copper addition by organic matter degradation in the freshwater reaches of a turbid estuary. *Sci. Total Environ.* 409, 1539–1549.
- Mayer, L.M., Schick, L.L., Self, R.F.L., Jumars, P.A., Findlay, R.H., Chen, Z., and Sampson, S. (1997). Digestive environments of benthic macroinvertebrate guts: Enzymes, surfactants and dissolved organic matter. *J. Mar. Res.* 55, 785–812.
- Michel, P., and Averty, B. (1999). Contamination of French Coastal Waters by Organotin Compounds: 1997 Update. *Mar. Pollut. Bull.* 38, 268–275.
- Michel, P., Boutier, B., and Chiffoleau, J.-F. (2000). Net Fluxes of Dissolved Arsenic, Cadmium, Copper, Zinc, Nitrogen and Phosphorus from the Gironde Estuary (France): Seasonal Variations and Trends. *Estuar. Coast. Shelf Sci.* 51, 451–462.
- Mikolaczyk, M., Rementeria, A., Lanceleur, L., Schäfer, J., Petit, J.C., Zaldibar, B., Chiffoleau, J.-F., Soto, M., Marigomez, I., and Blanc, G. (2015). Silver and copper bioaccumulation kinetics in oyster *Crassostrea gigas* tissues at environmentally relevant exposure levels using stable isotope spikes. *Estuar. Coast. Shelf Sci.* 179, 134–145.
- Morel, F.M.. (1983). *Principles and Applications of Aquatic Chemistry* (New York: J. Wiley and Sons).
- N**AS (1980). *The International Mussel Watch: Report of a Workshop Sponsored by the Environmental Studies Board*. (Washington: Natural Resources Commission of National Academy of Sciences).
- Ndung'u, K., Thomas, M.A., and Flegal, A.R. (2001). Silver in the western equatorial and South Atlantic Ocean. *Deep Sea Res. Part II Top. Stud. Oceanogr.* 48, 2933–2945.
- Ndung'u, K., Ranville, M.A., Franks, R.P., and Flegal, A.R. (2006). On-line determination of silver in natural waters by inductively-coupled plasma mass spectrometry: Influence of organic matter. *Mar. Chem.* 98, 109–120.

Ng, T.Y.T., AmiardTriquet, C., Rainbow, P.S., Amiard, J.C., and Wang, W.X. (2005). Physico-chemical form of trace metals accumulated by phytoplankton and their assimilation by filter-feeding invertebrates. *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 299, 179–191.

Olsen, C.R., Cutshall, N.H., and Larsen, I.L. (1982). Pollutant—particle associations and dynamics in coastal marine environments: a review. *Mar. Chem.* 11, 501–533.

OMI (2001). Convention internationale sur le contrôle des systèmes antisalissure nuisibles sur les navires. www.omi.org. Dernière consultation le 30 juin 2016.

OMS IPCS (1998). Environmental Health Criteria n°200: Copper. World Health Organisation, International Program on Chemical Safety.

OSPAR (1992). JAMP Guidelines for Monitoring Contaminants in Biota. Ospar Comission Monitoring Guidelines. Ref 1992-2.

Otvos, J., Liu, X., Li, H., Shen, G., and Basti, M. (1993). Dynamic aspects of metallothionein structure. *Met. III* 57–74.

Owen, G. (1966). Digestion. *Physiol. Mollusca* 2, 53–96.

Páez-Osuna, F., Frías-Espericueta, M.G., and Osuna-López, J.I. (1995). Trace metal concentrations in relation to season and gonadal maturation in the oyster *Crassostrea iridescens*. *Mar. Environ. Res.* 40, 19–31.

Pan, K., and Wang, W.-X. (2009). Biodynamics To Explain the Difference of Copper Body Concentrations in Five Marine Bivalve Species. *Environ. Sci. Technol.* 43, 2137–2143.

Paquin, P.R., Gorsuch, J.W., Apte, S., Batley, G.E., Bowles, K.C., Campbell, P.G.C., Delos, C.G., Di Toro, D.M., Dwyer, R.L., Galvez, F., et al. (2002). The biotic ligand model: a historical overview. *Comp. Biochem. Physiol. Part C Toxicol. Pharmacol.* 133, 3–35.

Perrein, H., Amiard, J.-C., and Haure, J. (1999). Effects of metals (Ag, Cd, Cu) on the biochemical composition and compartmentalization of these metals in two microalgae *Skeletonema costatum* and *Tetraselmis suecica*. *Can J Fish Aquat Sci* 56, 1757–1765.

Pipe, R., Coles, J., Carissan, F.M., and Ramanathan, K. (1999). Copper induced immunomodulation in the marine mussel, *Mytilus edulis*. *Aquat. Toxicol.* 46, 43–54.

Pougnet, F., Schäfer, J., Dutruch, L., Garnier, C., Tessier, E., Dang, D.H., Lanceleur, L., Mullot, J.-U., Lenoble, V., and Blanc, G. (2014). Sources and historical record of tin and butyl-tin species in a Mediterranean bay (Toulon Bay, France). *Environ. Sci. Pollut. Res.* 21, 6640–6651.

Pyza, E., Mak, P., Kramarz, P., and Laskowski, R. (1997). Heat Shock Proteins (HSP70) as Biomarkers in Ecotoxicological Studies. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 38, 244–251.

Rainbow, P.S. (1995). Physiology, physicochemistry and metal uptake—A crustacean perspective. *Mar. Pollut. Bull.* 31, 55–59.

Ranville, M.A., and Flegal, A.R. (2005). Silver in the North Pacific Ocean. *Geochem. Geophys. Geosystems* 6, Q03M01.

Raposo, J.C., Bartolomé, L., Cortazar, E., Arana, G., Zabaljauregui, M., de Diego, A., Zuloaga, O., Madariaga, J.M., and Etxebarria, N. (2009). Trace Metals in Oysters, *Crassostrea* spp., from UNESCO Protected Natural Reserve of Urdaibai: Space-Time Observations and Source Identification. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 83, 223–229.

Ratte, H.T. (1999). Bioaccumulation and toxicity of silver compounds: A review. *Environ. Toxicol. Chem.* 18, 89–108.

Ray, S., McLeese, D.W., Waiwood, B.A., and Pezzack, D. (1980). The disposition of cadmium and zinc in *Pandalus montagui*. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 9, 675–681.

Reinecke, S.A., Prinsloo, M.W., and Reinecke, A.J. (1999). Resistance of *Eisenia fetida* (Oligochaeta) to Cadmium after Long-Term Exposure. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 42, 75–80.

Reinfelder, J.R., Wang, W.-X., Luoma, S.N., and Fisher, N.S. (1997). Assimilation efficiencies and turnover rates of trace elements in marine bivalves: a comparison of oysters, clams and mussels. *Mar. Biol.* 129, 443–452.

Rementeria, A., Mikolaczyk, M., Lanceleur, L., Blanc, G., Soto, M., Schäfer, J., and Zaldibar, B. (In press). Assessment of the effects of Cu and Ag in oysters *Crassostrea gigas* (Thuberg, 1973) using a battery of cell and tissue level biomarkers. *Mar. Environ. Res.* *In press*.

Riba, I., Blasco, J., Jiménez-Tenorio, N., González de Canales, M.L., and Ángel DelValls, T. (2005). Heavy metal bioavailability and effects: II. Histopathology–bioaccumulation relationships caused by mining activities in the Gulf of Cádiz (SW, Spain). *Chemosphere* 58, 671–682.

Rieuwerts, J. S., Thornton, I., Farago, M. E., & Ashmore, M. R. (1998). Factors influencing metal bioavailability in soils: preliminary investigations for the development of a critical loads approach for metals. *Chem. Speciat. Bioavailab.* 10, 61-75.

Rivera-Duarte, I., Flegal, A., Sañudo-Wilhelmy, S., and Véron, A. (1999). Silver in the far North Atlantic Ocean. *Deep Sea Res. Part II Top. Stud. Oceanogr.* 46, 979–990.

RNO (2006). Surveillance du milieu marin. Travaux du RNO. Ifremer et Ministère de l'Ecologie et du Développement Durable. 56 pp.

Robert, S., Blanc, G., Schäfer, J., Lavaux, G., and Abril, G. (2004). Metal mobilization in the Gironde Estuary (France): the role of the soft mud layer in the maximum turbidity zone. *Mar. Chem.* 87, 1–13.

Rodríguez Martín-Doimeadios, R.C., Monperrus, M., Krupp, E., Amouroux, D., and Donard, O.F.X. (2003). Using Speciated Isotope Dilution with GC–Inductively Coupled Plasma MS To Determine and Unravel the Artificial Formation of Monomethylmercury in Certified Reference Sediments. *Anal. Chem.* 75, 3202–3211.

Roméo, M., and Giambérini, L. (2008). Historique. In *Les Biomarqueurs Dans L'évaluation de L'état Écologique Des Milieux Aquatiques.*, (Paris: Amiar, J.C., Amiard-Triquet, C.), pp. 17–54.

Ross, K., Cooper, N., Bidwell, J.R., and John Elder (2002a). Genetic diversity and metal tolerance of two marine species: a comparison between populations from contaminated and reference sites. *Mar. Pollut. Bull.* 44, 671–679.

Ross, K., Cooper, N., Bidwell, J.R., and John Elder (2002b). Genetic diversity and metal tolerance of two marine species: a comparison between populations from contaminated and reference sites. *Mar. Pollut. Bull.* 44, 671–679.

Roux, M., and Simonet, F. (1987). Pollutions accidentelles du Lot: Flux polluant. *Rev. L'Agence L'eau Adour-Garonne* 34, 7–9.

Rozan, T.F., and Hunter, K.S. (2001). Effects of discharge on silver loading and transport in the Quinnipiac River, Connecticut. *Sci. Total Environ.* 279, 195–205.

Salomon, J.. (2002). L'inondation dans la vallée de la Garonne et del'Estuaire de la Gironde lors de la "Tempête du siècle" (27-28 décembre 1999) / Flooding in the Garonne Valley and the Gironde Estuary caused by the "Storm of the century" '27-28 december 1999). *Géomorphologie Relief Process. Environnment* 8, 127–134.

Sanders, J., Abbe, G., and Riedel, G. (1990). Silver uptake and subsequent effects on growth and species composition in an estuarine community. *Sci. Total Environ.* 97–98, 761–769.

Santore, R.C., Di Toro, D.M., Paquin, P.R., Allen, H.E., and 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.

Sanudo-Wilhelmy, S.A., and Flegal, A.R. (1992). Anthropogenic silver in the Southern California Bight: a new tracer of sewage in coastal waters. *Environ. Sci. Technol.* 26, 2147–2151.

Schafer, J., and Blanc, G. (2002). Relationship between ore deposits in river catchments and geochemistry of suspended particulate matter from six rivers in southwest France. *Sci. Total Environ.* 298, 103–118.

Schäfer, J., Blanc, G., Lapaquellerie, Y., Maillet, N., Maneux, E., and Etcheber, H. (2002). Ten-year observation of the Gironde tributary fluvial system: fluxes of suspended matter, particulate organic carbon and cadmium. *Mar. Chem.* 79, 229–242.

Schäfer, J., Blanc, G., Audry, S., Cossa, D., and Bossy, C. (2006). Mercury in the Lot–Garonne River system (France): Sources, fluxes and anthropogenic component. *Appl. Geochem.* 21, 515–527.

Sedlak, D.L., Phinney, J.T., and Bedsworth, W.W. (1997). Strongly Complexed Cu and Ni in Wastewater Effluents and Surface Runoff. *Environ. Sci. Technol.* 31, 3010–3016.

Shiller, A.M., and Boyle, E.A. (1991). The Macalpine Hills Lunar Meteorite Consortium Trace elements in the Mississippi River Delta outflow region: Behavior at high discharge. *Geochim. Cosmochim. Acta* 55, 3241–3251.

Shuster, C., and Pringle, B. (1969). Trace metal accumulation by the American eastern oyster, *Crassostrea virginica*. In *Proc. natn. Shellfish. Ass.* p. 103.

Singh, N., and Turner, A. (2009). Leaching of copper and zinc from spent antifouling paint particles. *Environ. Pollut.* 157, 371–376.

Smith, I.C., and Carson, B.L. (1977). Trace metals (Ann Arbor, Michigan.: Ann Arbor Science Publishers).

Soletchnik, P., Prou, J., Heral, M., Barille, L., Razet, D., and Guezennec, L. (1991). Influence de la charge particulaire sur la filtration d'une population d'huître *Crassostrea gigas* dans le bassin estuarien de Marennes-Oléron (France) : analyse de deux cycles de marée. *Ifremer*. 6 pp.

Soletchnik, P., Goulletquer, P., Héral, M., Razet, D., and Geairon, P. (1996a). Evaluation of the energetic budget of rite Japanese oyster, *Crassostrea gigas*, in Marennes-Oleron Bay. *Aquat. Living Resour.* 9, 65–73.

Soletchnik, P., Goulletquer, P., Geairon, P., and Razet, D. (1996b). Seuil de production de pseudo-fécès de l'huître creuse du Pacifique : *Crassostrea gigas* (Thunberg) dans des conditions de faibles charges particulaires. *Haliotis* 25, 13–24.

Soto, M., Zaldibar, B., Cancio, I., Taylor, M.G., Turner, M., Morgan, A.J., and Marigómez, I. (2002). Subcellular Distribution of Cadmium and its Cellular Ligands in Mussel Digestive Gland Cells as Revealed by Combined Autometallography and X-ray Microprobe Analysis. *Histochem. J.* 34, 273–280.

Sottolichio, A., and Castaing, P. (1999). A synthesis on seasonal dynamics of highly-concentrated structures in the Gironde estuary. *Comptes Rendus Académie Sci. - Ser. IIA - Earth Planet. Sci.* 329, 795–800.

Spurgeon, D.J., and Hopkin, S.P. (1999). Tolerance to Zinc in Populations of the Earthworm *Lumbricus rubellus*. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 37, 332–337.

Spurgeon, D.J., and Hopkin, S.P. (2000). The development of genetically inherited resistance to zinc in laboratory-selected generations of the earthworm *Eisenia fetida*. *Environ. Pollut.* 109, 193–201.

Srinivasan, M., and Swain, G.W. (2007). Managing the Use of Copper-Based Antifouling Paints. *Environ. Manage.* 39, 423–441.

Strady, E. (2010). Mécanismes biogéochimiques de la contamination des huîtres *Crassostrea gigas* en Cadmium en Baie de Marennes Oléron. Thèse d'état. Université de Bordeaux 1. 293 pp.

Strady, E., Schäfer, J., Baudrimont, M., and Blanc, G. (2011). Tracing cadmium contamination kinetics and pathways in oysters (*Crassostrea gigas*) by multiple stable Cd isotope spike experiments. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 74, 600–606.

Sunda, W.G., and Lewis, J.A.M. (1978). Effect of complexation by natural organic ligands on the toxicity of copper to a unicellular alga, *Monochrysis lutheri* 1: Complexation and copper toxicity. *Limnol. Oceanogr.* 23, 870–876.

Sutherland, R.A., and Tack, F.M.G. (2008). Extraction of labile metals from solid media by dilute hydrochloric acid. *Environ. Monit. Assess.* 138, 119–130.

Sutherland, R.A., Tack, F.M.G., Tolosa, C.A., and Verloo, M.G. (2001). Metal Extraction from Road Sediment using Different Strength Reagents: Impact on Anthropogenic Contaminant Signals. *Environ. Monit. Assess.* 71, 221–242.

Tappin, A.D., Barriada, J.L., Braungardt, C.B., Evans, E.H., Patey, M.D., and Achterberg, E.P. (2010). Dissolved silver in European estuarine and coastal waters. *Water Res.* 44, 4204–4216.

The Silver Institute. www.thesilverinstitute.org. Dernière consultation le 30 juin 2016.

Trefry, J.H., and Metz, S. (1984). Selective leaching of trace metals from sediments as a function of pH. *Anal. Chem.* 56, 745–749.

Turner, A. (2010). Marine pollution from antifouling paint particles. *Mar. Pollut. Bull.* 60, 159–171.

Underwood, E., and Suttle, N. (1999). Copper. In *The Mineral Nutrition of Livestock*. 3rd Edition, (Wallingford, United Kingdom), pp. 283–342.

U.S. Public Health Service (PHS) (1990). Toxicological profile for silver. Agency for Toxic Substances and Disease Registry TP-90-24.

Vega, M.M., Marigomez, J.A., and Angulo, E. (1989). Quantitative alterations in the structure of the digestive cell of *Littorina littorea* on exposure to cadmium. *Mar. Biol.* 103, 547–553.

Veyssy, E., Etcheber, H., Lin, R.G., Buat-Menard, P., and Maneux, E. (1998). Seasonal variation and origin of Particulate Organic Carbon in the lower Garonne River at La Reole (southwestern France). *Hydrobiologia* 391, 113–126.

Villares, R., Carral, E., Puente, X.M., and Carballeira, A. (2005). Metal Concentrations in Estuarine Invertebrates in Relation to Sediments. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 75, 592–599.

Visviki, I., and Rachlin, J.W. (1994). Acute and chronic exposure of *Dunaliella salina* and *Chlamydomonas bullosa* to copper and cadmium: Effects on growth. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 26, 154–162.

Voparil, I.M., and Mayer, L.M. (2004). Commercially Available Chemicals That Mimic a Deposit Feeder's (*Arenicola marina*) Digestive Solubilization of Lipids. *Environ. Sci. Technol.* 38, 4334–4339.

Waeles, M., Riso, R.D., Maguer, J.-F., and Le Corre, P. (2004). Distribution and chemical speciation of dissolved cadmium and copper in the Loire estuary and North Biscay continental shelf, France. *Estuar. Coast. Shelf Sci.* 59, 49–57.

Wallace, W., and Luoma, S. (2003). Subcellular compartmentalization of Cd and Zn in two bivalves. II. Significance of trophically available metal (TAM). *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 257, 125–137.

Wallace, W., Lee, B., and Luoma, S. (2003). Subcellular compartmentalization of Cd and Zn in two bivalves. I. Significance of metal-sensitive fractions (MSF) and biologically detoxified metal (BDM). *Mar. Ecol. Prog. Ser.* 249, 183–197.

Wang, W.-X., Yang, Y., Guo, X., He, M., Guo, F., and Ke, C. (2011). Copper and zinc contamination in oysters: Subcellular distribution and detoxification. *Environ. Toxicol. Chem.* 30, 1767–1774.

Wedderburn, J., McFadzen, I., Sanger, R.C., Beesley, A., Heath, C., Hornsby, M., and Lowe, D. (2000). The Field Application of Cellular and Physiological Biomarkers, in the Mussel *Mytilus edulis*, in Conjunction with Early Life Stage Bioassays and Adult Histopathology. *Mar. Pollut. Bull.* 40, 257–267.

Wedepohl, K.H. (1995). The composition of the continental crust. *Geochim. Cosmochim. Acta* 59, 1217–1232.

Weimin, Y., Batley, G.E., and Ahsanullah, M. (1992). The ability of sediment extractants to measure the bioavailability of metals to three marine invertebrates. *Sci. Total Environ.* 125, 67–84.

Wen, L.-S., Santschi, P.H., Gill, G.A., Paternostro, C.L., and Lehman, R.D. (1997). Colloidal and Particulate Silver in River and Estuarine Waters of Texas. *Environ. Sci. Technol.* 31, 723–731.

Wen, L.-S., Santschi, P.H., Gill, G.A., and Tang, D. (2002). Silver concentrations in Colorado, USA, watersheds using improved methodology. *Environ. Toxicol. Chem.* 21, 2040–2051.

Wright, D.A., and Welbourn, P. (2002). *Environmental Toxicology* (Cambridge University Press).

Wright, D.A., Mihursky, J.A., and Phelps, H.L. (1985). Trace metals in Chesapeake Bay oysters: Intra-sample variability and its implications for biomonitoring. *Mar. Environ. Res.* 16, 181–197.

Yang, L., and Sturgeon, R.E. (2002). On-line determination of silver in sea-water and marine sediment by inductively coupled plasma mass spectrometry. *J. Anal. At. Spectrom.* 17, 88–93.

Zamuda, C.D., and Sunda, W.G. (1982). Bioavailability of dissolved copper to the American oyster *Crassostrea virginica*. I. Importance of chemical speciation. *Mar. Biol.* 66, 77–82.

Zhang, Y., Amakawa, H., and Nozaki, Y. (2001). Oceanic profiles of dissolved silver: precise measurements in the basins of western North Pacific, Sea of Okhotsk, and the Japan Sea. *Mar. Chem.* 75, 151–163.

Zhang, Y., Obata, H., and Nozaki, Y. (2004). Silver in the Pacific Ocean and the Bering Sea. *Geochem. J.* 38, 623–633.

Zhong, H., and Wang, W.-X. (2006). Sediment-Bound Inorganic Hg Extraction Mechanisms in the Gut Fluids of Marine Deposit Feeders. *Environ. Sci. Technol.* 40, 6181–6186.

Zhou, J., Liu, Y., and Abrahams, P.. (2003). Trace metal behaviour in the Conwy estuary, North Wales. *Chemosphere* 51, 429–440.

Zhou, K., Wang, R., Xu, B., and Li, Y. (2006). Synthesis, characterization and catalytic properties of CuO nanocrystals with various shapes. *Nanotechnology* 17, 3939–3943.

Global Invasive Species Database. <http://www.iucngisd.org/gisd/>. Dernière consultation le 12 juin 2016.

ANNEXES

ANNEXE 1

Production scientifique écrite

1. **Mikolaczyk, M.**, Lancelleur, L., Schäfer, J., Chiffolleau, J-F., Zaldibar, B, Soto, M. Spatial and temporal recording of Cu and Ag in oysters along the French Atlantic Coast: potential and limitations. *A soumettre*.
2. **Mikolaczyk, M.**, Lancelleur, L., Schäfer, J., Gardes, T., Bossy, C., Dutruch, L., Blanc, G. Experimental study of Ag mobilization from flood particles: desorption kinetics and estimations of bioavailable fraction applied to the Gironde Estuary case. *A soumettre*.
3. Rementeria, A., **Mikolaczyk, M.**, Lancelleur, L., Blanc, G., Soto, M., Schäfer, J., & Zaldibar, B. (2016). Assessment of the effects of Cu and Ag in oysters *Crassostrea gigas* (Thunberg, 1793) using a battery of cell and tissue level biomarkers. Marine Environmental Research. *Sous presse*.
4. S. Schiavo, N. Duroudier, E. Bilbao, **M. Mikolaczyk**, J. Schäfer, M. P. Cajaraville, S. Manzo, submitted. Growth inhibition of three species of microalgae exposed to different sizes of Ag NPs and to coating agent PVP/PEI. *À soumettre*
5. Petit J.C.J., Schafer J., Coynel A., Blanc G., Chiffolleau J.F., Auger D., Bossy C., Derriennic H., **Mikolaczyk M.**, Dutruch L., Mattielli N. (2015). The estuarine geochemical reactivity of Zn isotopes and its relevance for the biomonitoring of anthropogenic Zn and Cd contaminations from metallurgical activities: Example of the Gironde fluvial-estuarine system, France. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 170, 108-125.
6. **Mikolaczyk M.**, Lancelleur L., Rementeria A., Schäfer J., Petit JC., Zaldibar B., Chiffolleau J-F., Soto M., Marigomez I., Blanc G., 2015. Silver and copper bioaccumulation kinetics in oyster *Crassostrea gigas* tissues at environmentally relevant exposure levels using stable isotope spikes. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*. 179, 135-144