



HAL
open science

Développement d'une méthodologie pour l'amélioration du suivi chimique des eaux continentales. Approche de biosurveillance active sur *Gammarus fossarum*

J.P. Besse, Olivier Geffard, C. Lopes, Arnaud Chaumot, Marina Coquery

► To cite this version:

J.P. Besse, Olivier Geffard, C. Lopes, Arnaud Chaumot, Marina Coquery. Développement d'une méthodologie pour l'amélioration du suivi chimique des eaux continentales. Approche de biosurveillance active sur *Gammarus fossarum*. [Rapport de recherche] irstea. 2012, pp.63. hal-02599951

HAL Id: hal-02599951

<https://hal.inrae.fr/hal-02599951>

Submitted on 16 May 2020

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.

*Partenariat 2012 – Domaine substances polluantes
Action 44 – Surveillance des substances prioritaires dans le biote*

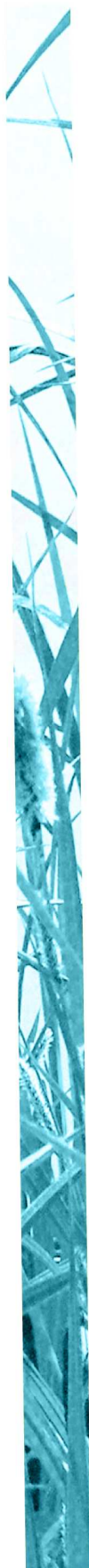
Développement d'une méthodologie pour l'amélioration du suivi chimique des eaux continentales

*Approche de biosurveillance active sur
Gammarus fossarum*

Rapport final

*BESSE Jean-Philippe, GEFFARD Olivier, LOPES Christelle, CHAUMOT
Arnaud, COQUERY Marina
(Irstea Lyon)*

Décembre 2012



Contexte de programmation et de réalisation

Ce rapport a été réalisé dans le cadre du partenariat ONEMA – Cemagref, au titre de l'action 20 (2011) et 44 (2012) « Surveillance des substances prioritaires dans le biote ».

En vue d'atteindre les objectifs de la DCE concernant le suivi des tendances temporelles et spatiales de la concentration des contaminants dans les eaux, et notamment des substances hydrophobes présentes à l'état de traces dans la colonne d'eau, ainsi que l'application des normes de qualité environnementale (NQE), il convient aujourd'hui de développer des méthodes basées sur l'utilisation du biote, d'en harmoniser et standardiser les méthodologies d'échantillonnage et les critères de choix des organismes sentinelles.

Dans ce contexte, cette action concerne la définition d'un cadre méthodologique pour la mise en oeuvre de la surveillance chimique des milieux d'eau douce à l'aide du biote. L'intérêt d'utiliser le biote pour la surveillance est la définition d'indicateurs de contamination reposant sur la notion de bio-disponibilité. Pour le milieu littoral des méthodologies utilisées depuis plusieurs années ont montré leur pertinence dans le suivi de la qualité chimique de ces milieux. Pour le milieu continental, il n'existe pas à l'heure actuelle de méthodologie rodée et appliquée à large échelle. Aujourd'hui, il est donc devenu indispensable de mener une réflexion sur la meilleure méthode de biosurveillance à mettre en place (type d'approche, espèce à échantillonner) et d'en évaluer sa pertinence.

Les auteurs

Jean-Philippe BESSE

Chargé de Recherche, jean-philippe.besse@irstea.fr

Laboratoire de chimie des milieux aquatiques / Laboratoire d'écotoxicologie, UR MALY, Irstea Lyon

Christelle LOPES

Chargé de Recherche, Christelle.lopes@irstea.fr

Laboratoire d'écotoxicologie, UR MALY, Irstea Lyon

Arnaud CHAUMOT

Chargé de Recherche, Arnaud.chaumot@irstea.fr

Laboratoire d'écotoxicologie, UR MALY, Irstea Lyon

Marina COQUERY

Directrice de Recherche, Marina.coquery@irstea.fr

Laboratoire de chimie des milieux aquatiques, UR MALY, Irstea Lyon

Olivier GEFFARD

Chargé de Recherche, Olivier.geffard@irstea.fr

Laboratoire d'écotoxicologie, UR MALY, Irstea Lyon

Les correspondants

Onema : Olivier PERCEVAL, DAST, olivier.perceval@onema.fr

Irstea : Marina COQUERY, UR MALY, marina.coquery@irstea.fr

Référence du document : Besse, J.P., Geffard, O., Lopes, C., Chaumot, A., Coquery, M. (2012). Développement d'une méthodologie pour l'amélioration du suivi chimique des eaux continentales. Approche de biosurveillance active sur *Gammarus fossarum*. Irstea, 63p.

Droits d'usage :	Public
Couverture géographique :	France – Région Rhône-Alpes
Niveau géographique :	National
Niveau de lecture :	Professionnels, experts
Nature de la ressource :	Rapport final

Développement d'une méthodologie pour l'amélioration du suivi chimique des eaux continentales - Proposition d'une approche de biosurveillance active sur le macroinvertébré *Gammarus fossarum*

Rapport final

Besse, J.P., Geffard, O., Lopes, C., Chaumot, A., Coquery, M.

Résumé

Ce travail porte sur l'évaluation de la pertinence et de la faisabilité d'une approche de biosurveillance active (basée sur l'utilisation d'organismes encagés) pour le suivi des tendances de la contamination des substances prioritaires (au titre de la Directive Cadre sur l'Eau) pour les eaux continentales.

L'espèce de crustacé amphipode *Gammarus fossarum* a été choisie comme organisme d'intérêt. Les facteurs biotiques tels que le sexe, le poids et l'apport en aliments sont contrôlés dans la méthodologie afin de proposer une approche robuste et des résultats comparables.

Des gammarens encagés ont été déployés sur 27 sites de la région Rhône-Alpes au début de l'automne 2009. Les sites d'étude ont été choisis pour représenter une large gamme de caractéristiques physico-chimiques ainsi que diverses pressions anthropiques. Après une semaine d'exposition, les concentrations de 8 métaux (Cd, Pb, Hg, Ni, As, Cr, Cu et Zn) et de 28 substances organiques hydrophobes (HAP, PCB, PBDE, et pesticides organochlorés) appartenant à la liste des substances prioritaires (ou en cours de révision), ont été mesurés dans les gammarens.

Tous les métaux et 23 substances organiques ont été quantifiés dans *G. fossarum*, montrant que cette espèce est pertinente pour la biosurveillance des substances prioritaires. Le contrôle des facteurs biotiques permet une comparaison robuste et directe des niveaux de contamination mesurés entre les différents sites. Dans l'ensemble, les résultats démontrent la fiabilité de l'approche méthodologique pour évaluer les tendances spatiales et temporelles de la contamination dans les eaux continentales.

Sur la base des données acquises durant cette campagne, nous avons déterminé des « valeurs seuils de contamination biodisponible » dans les gammarens ou BBAC (« Bioavailable Background Assessment Concentration »). Par BBAC, on entend toute valeur de concentration au-dessus de laquelle une concentration mesurée chez les organismes exposés peut être interprétée comme une contamination d'origine anthropique. Deux approches ont été utilisées afin de définir ces valeurs, une approche statistique et un modèle cinétique. Les BBAC ont pu être déterminées pour la quasi-totalité des substances étudiées dans cette étude. Ces valeurs permettent l'identification des contaminants problématiques et un classement des sites en termes de contaminants biodisponibles.

Mots clés (thématique et géographique)

Directive cadre sur l'eau ; surveillance chimique ; substances prioritaires ; eaux continentales ; biosurveillance active ; gammarens ; Bioavailable Background Assessment Concentration

Implementing a methodology to improve characterization of contamination trends in continental waters - Development of an active biomonitoring approach based on caged *Gammarus fossarum* (crustacea).

Rapport final

Besse, J.P., Geffard, O., Lopes, C., Chaumot, A., Coquery, M.

Abstract

We investigated the suitability of an active biomonitoring approach, using the ecologically relevant species *Gammarus fossarum*, to assess trends of bioavailable contamination in continental waters with regard to the priority substances of the Water Framework Directive.

Biotic factors such as sex, weight and food availability were controlled in order to provide robust and comparable results. Gammarids were translocated into cages at 27 sites in the Rhône-Alpes region (France) during early autumn 2009. Study sites were chosen to represent different physico-chemical characteristics and various anthropic pressures.

After one week of exposure, concentrations of 8 metals/metalloids (Cd, Pb, Hg, Ni, Zn, Cr, Cu and As) and 28 hydrophobic organic substances including polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs), polychlorobiphenyles (PCBs), pentabromodiphenylethers (PBDEs) and organochlorine pesticides, were measured in gammarids.

All metals and 23 organic substances among 28 were quantified in *G. fossarum*, showing that this species is relevant for chemical biomonitoring. The control of biotic factors allowed a robust and direct inter-site comparison of the bioavailable contamination levels. Overall, our results show the interest and robustness of the proposed methodological approach for assessing trends of bioavailable contamination, notably for metals and hydrophobic organic contaminants, in continental waters.

Furthermore, we built threshold values of bioavailable contamination in gammarids, named "Bioavailable Background Assessment Concentration" or BBAC, above which measured concentrations are expected to reveal a bioavailable contamination at the sampling site. Two ways to define such values were investigated, a statistical approach and a model fit. Threshold values were determined for almost all the substances investigated in this study and similar values were generally derived from the two approaches. Then, levels of contaminants measured in *G. fossarum* at the 27 study were compared to the threshold values obtained using the model fit. These threshold values could serve as a basis for further implementation of quality grids to rank sites according to the extent of the bioavailable contamination, with regard to the applied methodology.

Keywords

Water Framework Directive ; Chemical monitoring ; Priority substances ; Continental waters ; Active biomonitoring ; Gammarids ; Bioavailable Background Assessment Concentration

Développement d'une méthodologie pour l'amélioration du suivi chimique des eaux continentales - Proposition d'une approche de biosurveillance active sur le macroinvertébré *Gammarus fossarum*

Rapport final

Besse, J.P., Geffard, O., Lopes, C., Chaumot, A., Coquery, M.

Synthèse pour l'action opérationnelle

Contexte général

La présente étude s'inscrit dans le contexte de la Directive cadre sur l'eau (DCE) et notamment dans celui de la surveillance de l'état chimique pour les eaux continentales. Dans ce domaine, l'objectif de la DCE est double :

1. déterminer si les stations étudiées sont en conformité avec les normes de qualité environnementale (NQE) ;
2. évaluer les tendances temporelles de la contamination dans les différents compartiments des écosystèmes aquatiques.

Dans ce cadre, il est aujourd'hui nécessaire de mettre en place un programme de surveillance chimique dans le biote pour le suivi des substances prioritaires. D'une part, l'utilisation du biote a été formalisée par la publication de NQE biote pour 3 substances prioritaires dans la directive 2008/105/CE ; et d'autre part, le suivi des tendances temporelles (non-détérioration dans le temps des masses d'eau) devient une obligation, et les matrices intégratrices (dont le biote) sont fortement recommandées pour ce faire, notamment pour le suivi des substances hydrophobes.

Dans un précédent rapport (Besse *et al.* 2011), nous avons établi que parmi les approches de biosurveillance existantes, les approches dites actives, basées sur des organismes transplantés (ou encagés) étaient les plus à même fournir des valeurs de contamination fiables et robustes. En effet, elles peuvent être appliquées même si les sites d'étude sont dépourvus d'organismes autochtones, elles permettent de limiter la variabilité biologique des organismes puisque ces derniers proviennent d'une population de référence, et enfin le temps d'exposition peut être contrôlé.

Objectifs

Ce travail vise à évaluer l'intérêt et la faisabilité d'une approche de biosurveillance active, basée sur l'amphipode *Gammarus fossarum*, afin de répondre aux objectifs de la DCE pour la surveillance chimique des eaux continentales.

L'objectif principal de cette étude est d'évaluer la pertinence et la robustesse d'une approche d'encagement sur *Gammarus fossarum*, où les facteurs biotiques (masse / taille, sexe et alimentation) sont contrôlés, pour le suivi des métaux trace et des substances organiques, de manière à proposer des mesures de contamination fiables, robustes et comparables à large échelle.

Le deuxième objectif est de construire une méthodologie permettant la détermination de « valeurs seuils de contamination biodisponible » (« Bioavailable Background Assessment Concentration » ou BBAC) dans les organismes, en faisant l'hypothèse que toute concentration mesurée supérieure à ces valeurs est représentative d'une contamination biodisponible sur le site d'étude.

Ces valeurs de BBAC devraient améliorer la discrimination entre sites contaminés et sites non contaminés, mais également servir de base à la mise en œuvre ultérieure de grilles de qualité qui permettent de classer les sites en fonction de niveaux d'intensité de contamination biodisponible.

Méthodologie

Des gammars encagés (8 réplicats de 25 individus) ont été déployés sur 27 sites de la région Rhône-Alpes au début de l'automne 2009 sur une période 7 jours. Les sites d'étude ont été choisis pour représenter une large gamme de caractéristiques physico-chimiques ainsi que diverses pressions anthropiques.

Pour limiter l'influence de la taille, de la croissance et du sexe des organismes sur l'accumulation de contaminants, seuls des gammars mâles matures de même classe d'âge ont été exposés. Pour optimiser les conditions de survie des gammars les gammars ont été nourris *ad libitum*.

Après une semaine d'exposition, les concentrations de 8 métaux (Cd, Pb, Hg, Ni, As, Cr, Cu et Zn) et de 28 substances organiques hydrophobes (HAP, PCB, PBDE, et pesticides organochlorés) appartenant à la liste des substances prioritaires (ou en cours de révision), ont été mesurés dans les gammars.

Pour la définition des BBAC, les valeurs de contamination mesurées dans les gammars ont tout d'abord été classées par ordre croissant. Puis deux approches ont été utilisées pour déterminer une valeur de BBAC sur la base de cette représentation des données :

- une approche statistique, basée sur l'hypothèse que les niveaux de contamination dans les organismes sont distribués selon une loi normale uniquement sur des sites dépourvus de toute pression anthropique ;
- une approche cinétique, basée sur l'ajustement d'un modèle de croissance bactérienne.

Principaux acquis

Les résultats de cette étude montrent que l'encagement de gammare est un outil pertinent pour la surveillance des substances prioritaires et candidates de la DCE pour les eaux continentales. L'approche permet une totale liberté du choix des sites, mais également un suivi robuste, reproductible et comparable dans le temps des tendances de la contamination.

La définition de « valeurs seuil de contamination biodisponible » (BBAC), rendues possibles par l'utilisation d'une méthode permettant le contrôle des facteurs biotiques, permet une classification fine des sites d'études – réalisable à large échelle – en fonction des valeurs de contamination biodisponible mesurées, et permet de dresser des typologies de contamination pour les sites étudiés.

Concernant le premier objectif (vérification de la conformité aux NQE), il apparaît possible de comparer les concentrations mesurées dans les organismes avec les NQE eau, moyennant l'utilisation de modèles de transfert adéquats. Pour la vérification de la conformité aux NQE biote, il faudra recourir à l'utilisation de facteurs de conversion pour prendre en compte le niveau trophique à partir duquel les NQE biote ont été dérivées par rapport à celui des gammars.

Concernant le second objectif de la DCE (suivi des tendances temporelles), cette méthodologie pourrait être appliquée à différents intervalles de temps, afin de suivre l'évolution des niveaux de contamination et de vérifier la non-dégradation de l'état des masses d'eau dans le temps.

Pour en savoir plus

Besse, J.P., Geffard, O., Coquery, M. (2011). Développement d'une méthodologie pour l'amélioration du suivi chimique des eaux continentales - Etat de l'art sur les approches de biosurveillance et application dans le cadre de la DCE. Cemagref-Irstea, 100 p.

Besse, J.P., Geffard, O., Coquery, M. (2012). Relevance and applicability of active biomonitoring in continental waters under the Water Framework Directive. *TrAC - Trends in Analytical Chemistry* 36, 113-127.

Besse, J.-P., Coquery, M., Lopes, C., Chaumot, A., Budzinski, H., Labadie, P., Geffard, O. (2013). Caged *Gammarus fossarum* (Crustacea) as a robust tool for the characterization of bioavailable contamination levels in continental waters: Towards the determination of threshold values. *Water Research* 47, 650-660.

Remerciements

La réalisation de ce travail a bénéficié de la précieuse collaboration de plusieurs personnes, que nous remercions pour leur grande disponibilité :
Lysiane Dherret, Josiane Gahou, Eloise Vray, Hervé Quéau d'Irstea Lyon ;

Ainsi que les membres du comité de pilotage de l'étude : Olivier Perveval et Pierre-François Staub de l'Onema, Jean Prygiel de l'AE AP, Thomas Pelte de l'AE RM&C, Xavier Bourrain de l'AE LB, Anne-Sophie Allonier-Fernandes de l'AE SN, Sandrine Andrés de l'INERIS et Stéphanie Schaan du MEDDE/DGALN/DEB/GR3.

Sommaire

Synthèse pour l'action opérationnelle	5
Sommaire	8
Liste des définitions	9
Liste des abréviations	10
Liste des figures	11
1. Introduction	12
1.1. Contexte	12
1.2. Objectifs de la démarche	13
2. Protocole d'exposition	15
2.1. Organismes	15
2.2. Choix des sites d'étude	16
2.3. Protocole d'exposition	19
2.4. Suivi des paramètres physico-chimiques	20
3. Substances ciblées et méthodes analytiques	21
3.1. Substances analysées	21
3.2. Méthodes d'analyse	22
4. Résultats - évaluation de la contamination chimique des organismes	23
4.1. Taux de survie des organismes	23
4.2. Intérêt de <i>G. fossarum</i> pour la surveillance chimique des eaux continentales	23
4.3. Robustesse de la méthodologie, influence des facteurs biotiques et abiotiques	25
5. Détermination de valeurs seuil de contamination	27
5.1. Définition.....	27
5.2. Détermination des BBAC	27
5.3. Résultats.....	29
5.4. Discussion	29
5.5. Etude de cas, application des BBAC aux sites d'étude.....	32
6. Intérêt de la biosurveillance active sur <i>Gammarus fossarum</i> dans le cadre de la DCE. ..	35
6.1. Suivi des tendances de la contamination	35
6.2. Vérification de la conformité aux NQE	35
Références	37
Annexes	41

Liste des définitions

Bioaccumulation : processus lié à l'absorption par un organisme d'une ou plusieurs substances chimiques présentes dans l'eau, et qui entraîne une concentration accrue de ces substances dans les tissus de l'organisme par rapport à la concentration initialement présente dans l'eau.

Biosurveillance (*biomonitoring*) : le terme de biosurveillance recouvre l'ensemble de méthodes utilisées pour détecter et mesurer la concentration des polluants dans des organismes biologiques, afin de renseigner sur l'état de contamination dans les eaux continentales.

Biosurveillance active (*caging*) : méthode de biosurveillance reposant sur la transplantation (ou encagement) sur le site d'étude d'organismes provenant d'un site de référence ou d'un élevage.

Biosurveillance passive : méthode de biosurveillance reposant sur le prélèvement d'organismes indigènes (natifs du site d'étude).

Capacité trophique : ressource alimentaire d'un site.

Etat chimique : l'état chimique, au titre de la directive cadre sur l'eau (DCE), est l'appréciation de la qualité d'une eau sur la base des concentrations en polluants. L'évaluation de l'état chimique repose sur la comparaison, pour 33 substances prioritaires et familles de substances prioritaires ainsi que pour 8 autres polluants issus de la Directive 76/464/CE, entre des mesures de la concentration de ces substances dans l'eau et les normes de qualité environnementale (NQE), établies par la Directive Fille (2008/105/CE) du 18 décembre 2008 ; ces listes de substances et les NQE correspondantes sont soumises à révision tous les 4 ans.

Masse d'eau : portion de cours d'eau, canal, aquifère, plan d'eau ou zone côtière homogène. Il s'agit d'un découpage élémentaire des milieux aquatiques destiné à être l'unité d'évaluation de la DCE. Une masse d'eau de surface est une partie distincte et significative des eaux de surface, telle qu'un lac, un réservoir, une rivière, un fleuve ou un canal, une partie de rivière, de fleuve ou de canal, une eau de transition ou une portion d'eaux côtières. Pour les cours d'eau, la délimitation des masses d'eau est basée principalement sur la taille du cours d'eau, la notion d'hydro-écorégion et les pressions qui s'y exercent. Les masses d'eau sont regroupées en types homogènes qui servent de base à la définition de la notion de bon état.

Réseau de Contrôle Opérationnel : ce réseau doit permettre d'établir l'état des masses d'eau identifiées comme risquant de ne pas répondre à leurs objectifs environnementaux. Ces contrôles sont réalisés au niveau de sites représentatifs de la situation d'ensemble de chaque masse d'eau à risque. Ils consistent en la surveillance des seuls paramètres qui posent problème. Ce réseau a vocation à s'interrompre dès que la masse d'eau recouvrera le bon état. Ce réseau sert également d'une part, à préciser les raisons de la dégradation des masses d'eaux et d'autre part, au suivi des améliorations de l'état de ces masses d'eau suite aux actions mises en place dans le cadre des programmes de mesures.

Réseau de Contrôle de Surveillance : ce réseau doit permettre d'évaluer l'état général des eaux à l'échelle de chaque bassin et son évolution à long terme. Ce réseau pérenne est constitué de sites représentatifs des diverses situations rencontrées sur chaque bassin. Le contrôle de surveillance est destiné à donner une image de l'état général des masses d'eaux.

Liste des abréviations

CMR : Carcinogène, mutagène, reprotoxique

DCE : Directive cadre sur l'eau (Directive 2000/60/CE)

DDT : Dichlorodiphényltrichloroéthane

HAP : Hydrocarbures aromatiques polycycliques

HCB : Hexachlorocyclobenzène

NOEC : No Observed Effect Concentration, plus forte concentration testée sans effet

NQE : Norme de qualité environnementale

NQE-CMA : Norme de qualité environnementale exprimée sous forme de concentration maximale admissible

NQE-MA : Norme de qualité environnementale exprimée sous forme de moyenne annuelle

PCB : Polychlorobiphényles

PBDE : Polybromodiphényléthers

RCO : Réseau de contrôle opérationnel

RCS : Réseau de contrôle de surveillance

Liste des tableaux

Tableau 1. Liste et caractéristiques des 12 sites <i>a priori</i> peu ou pas impactés.	18
Tableau 2. Liste et caractéristiques des 15 sites <i>a priori</i> impactés.	18
Tableau 3. Tableau récapitulatif des substances organiques retenues dans le cadre de l'étude. 21	
Tableau 4. Concentrations métalliques (en $\mu\text{g.g}^{-1}$ de poids sec) dans les gammares encagés après 7 jours d'exposition ; et corrélation des concentrations mesurées avec la température moyenne et la dureté mesurées aux niveaux des sites d'étude.	24
Tableau 5. Concentrations en substances organiques (en ng.g^{-1} de poids sec) mesurées chez <i>Gammarus fossarum</i> après 7 jours d'encagement et corrélation (R^2) avec la température moyenne mesurée au niveau des sites d'étude.	24
Tableau 6. BBAC déterminées pour les substances sélectionnées dans cette étude. Les valeurs sont exprimées en $\mu\text{g.g}^{-1}$ de poids sec (ps) pour les métaux, et en ng.g^{-1} ps pour les substances organiques.	30
Tableau 7. Classement des sites d'étude sur la base des valeurs de BBAC définies selon l'approche cinétique.	33

Liste des figures

Figure 1. <i>Gammarus fossarum</i> mâle	15
Figure 2. Localisation du site de prélèvement	15
Figure 3. Stabulation des gammares au laboratoire.....	16
Figure 4. Situation géographique des 27 sites sélectionnés en région Rhône-Alpes.....	17
Figure 5. Systèmes d'encagement des gammares.	19
Figure 6. Fixation des systèmes d'exposition dans la cage.	19
Figure 7. Caisse lestée et camouflée.....	19
Figure 8. Exemple de BBAC déterminée pour le cadmium, selon la méthode statistique.....	28
Figure 9. Exemple de BBAC déterminée pour le cadmium, selon l'approche cinétique (modèle de Baranyi).....	28
Figure 10. BBAC calculées pour le Zn, après inclusion de données additionnelles provenant d'une campagne de terrain antérieure (Lacaze et al., 2011b).	32
Figure 11. Taux de survie des gammares après 7 jours d'exposition sur l'ensemble des sites (n=27).	47
Figure 12. Valeurs seuils déterminées pour les métaux et les substances organiques prioritaires sélectionnées dans cette étude. Les valeurs seuil sont données en $\mu\text{g/g}$ (poids sec) pour les métaux et en ng/g (poids sec) pour les substances organiques.....	49

1. Introduction

1.1. Contexte

1.1.1. Contexte réglementaire

Dans le cadre de la surveillance chimique des eaux continentales, la directive cadre sur l'eau (Directive 2000/60/CE ; DCE) requiert des États membres de l'Union européenne que le bon état chimique soit atteint dans toutes les masses d'eau d'ici 2015, pour une liste de polluants spécifiques. Cette liste est actuellement fixée à 41 polluants (33 substances prioritaires et 8 autres polluants) figurant à l'annexe I de la directive 2008/105/CE (CE, 2008).

L'objectif de la DCE est double et consiste d'une part, à déterminer si les stations étudiées sont en conformité avec les normes de qualité environnementale (ou NQE), et d'autre part, à évaluer les tendances temporelles de la contamination dans les différents compartiments des écosystèmes aquatiques.

Pour remplir ce double objectif, l'utilisation du biote comme matrice pour la surveillance de l'état chimique apparaît aujourd'hui nécessaire ; en effet, depuis l'adoption de la directive 2008/105/CE dite directive fille NQE (CE, 2008) :

- l'utilisation du biote a été formalisée par la publication de NQE biote pour 3 substances prioritaires ;
- le suivi des tendances temporelles (non-détérioration dans le temps des masses d'eau) devient une obligation, et les matrices intégratrices (biote et sédiment) sont fortement recommandées pour ce faire, notamment pour le suivi des substances hydrophobes (CE, 2010) ;
- une proposition d'amendement (2011/0429) à la directive fille NQE a établi des NQE biote pour 11 substances (ou familles de substances) chimiques supplémentaires (CE, 2012).

Il est donc aujourd'hui nécessaire de mettre en place un programme de surveillance chimique dans le biote (biosurveillance) permettant, si possible à la fois, d'évaluer la conformité aux NQE et d'assurer le suivi des tendances temporelles.

1.1.2. Intérêt du biote dans la surveillance chimique

L'utilisation d'organismes vivants pour surveiller les niveaux et les tendances de la contamination chimique de l'eau (biosurveillance chimique) a été suggérée dans le milieu des années 1970 pour les eaux côtières (Goldberg, 1975), et a été expérimenté dans plusieurs programmes de surveillance des eaux marines et continentales.

Le précédent rapport bibliographique (Besse *et al.*, 2011) a montré que l'utilisation du biote présente en effet plusieurs intérêts pour le suivi de la contamination chimique :

1. En tant que matrice intégratrice, il permet une mesure fiable des métaux traces et des contaminants organiques hydrophobes, car les concentrations retenues par ces organismes sont supérieures à celles retrouvées dans l'eau ;
2. le biote reflète les fractions biodisponible et bioaccumulable des contaminants, qui sont d'un intérêt écotoxicologique direct ;
3. enfin, le biote permet des mesures intégrées dans le temps sur l'ensemble de la période d'exposition et peut donc être utilisé pour établir des tendances spatiales et temporelles de la contamination biodisponible (CE, 2010 ; Andral *et al.*, 2004 ; Rainbow, 1995).

Actuellement, il existe deux stratégies différentes de biosurveillance : la biosurveillance active et passive. Les approches passives s'appuient sur des organismes autochtones (Sudaryanto *et al.*, 2002 ; Goldberg, 1975), tandis que les approches actives reposent sur des organismes transplantés (encagés) provenant d'un site de référence (Benedicto *et al.*, 2011 ; Andral *et al.*, 2004).

Bien que les approches passives se soient révélées précieuses pour suivre les tendances de contamination des métaux et de plusieurs contaminants organiques dans les eaux marines et continentales, elles sont reconnues pour présenter deux inconvénients majeurs : i) elles dépendent de la présence effective de l'organisme natif sur les sites d'étude ; et ii) plusieurs facteurs (comme la variabilité dans le temps d'exposition, l'âge et la taille des organismes prélevés) peuvent limiter la fiabilité des résultats et en compliquer l'interprétation (Besse *et al.*, 2011, 2012).

Les approches actives basées sur des organismes transplantés ont été développées plus récemment dans le but d'améliorer la fiabilité des résultats. En effet, ces approches peuvent être appliquées même si les sites d'étude sont dépourvus d'organismes autochtones. De plus, elles permettent de limiter la variabilité biologique des organismes puisque ces derniers proviennent d'une même population et que les facteurs biotiques comme la taille et le sexe peuvent être contrôlés. De plus, le temps d'exposition peut être contrôlé (Bourgeaut *et al.*, 2010 ; Bervoets *et al.*, 2005 ; Andral *et al.*, 2004 ; Mersch *et al.*, 1996).

Ceci apporte une plus grande robustesse dans les résultats ainsi qu'une bonne reproductibilité, ce qui est un avantage notamment pour le suivi des tendances spatiales et temporelles. Si certains programmes de biosurveillance actives ont été mis en œuvre dans le milieu marin (Benedicto *et al.*, 2011 ; Andral *et al.*, 2004), aucune approche de ce type n'a été menée sur une grande échelle pour surveiller la contamination dans les eaux continentales (Besse *et al.* 2011, 2012).

En ce qui concerne la sélection de l'espèce d'intérêt à utiliser dans une approche active, le choix est délicat car idéalement l'espèce doit :

1. accumuler les substances ciblées par la réglementation ;
2. être pertinente pour la comparaison aux NQE biote (nourriture potentielle pour les prédateurs supérieurs – oiseaux piscivores et mammifères ou l'Homme) ;
3. être facile à identifier, échantillonner et pouvoir supporter l'encagement et la transplantation (CMA, 2010).

La revue bibliographique de Besse *et al.* (2011) a montré que les invertébrés sont de bons candidats si l'on souhaite que le programme de biosurveillance puisse répondre au double objectif de la DCE. Parmi les genres et espèces d'invertébrés, le genre *Gammarus* a été identifié comme intéressant pour développer, à court terme, une méthodologie de biosurveillance active.

1.2. Objectifs de la démarche

Pour le milieu littoral des méthodologies sont disponibles et utilisées depuis plusieurs années et ont montré leur pertinence dans le suivi de la qualité chimique de ces milieux. Pour le milieu continental, il n'existe pas à l'heure actuelle de méthodologie rodée et appliquée à large échelle. Aujourd'hui, il est donc devenu indispensable de mener une réflexion sur la meilleure méthode de biosurveillance à mettre en place (type d'approche, espèce à échantillonner) et d'en évaluer sa pertinence.

Dans ce rapport, nous proposons donc d'évaluer l'intérêt et la faisabilité d'une approche de biosurveillance active, basée sur l'amphipode *Gammarus fossarum*, afin de répondre aux objectifs de la DCE pour la surveillance chimique des eaux continentales.

L'objectif principal de cette étude est d'évaluer la pertinence et la robustesse d'une approche d'encagement sur *Gammarus fossarum*, où les facteurs biotiques (masse / taille,

sexe et alimentation) sont contrôlés, pour le suivi des métaux trace et des substances organiques, de manière à proposer des mesures de contamination fiables, robustes et comparables à large échelle.

Le deuxième objectif de cette étude est de bénéficier de ces mesures robustes pour construire une méthodologie permettant la détermination de « valeurs seuils de contamination biodisponible » (« Bioavailable Background Assessment Concentration » ou BBAC) dans les organismes, en faisant l'hypothèse que toute concentration mesurée supérieure à ces valeurs est représentative d'une contamination biodisponible sur le site d'étude. En effet, pour les gestionnaires cette notion de valeurs seuils est indispensable pour classer les eaux en fonction du niveau de contamination et pour identifier quel(s) polluant(s) est problématique ; ces valeurs de BBAC devraient améliorer la discrimination entre sites contaminés et sites non contaminés, mais également servir de base à la mise en œuvre ultérieure de grilles de qualité qui permettent de classer les sites en fonction de niveaux d'intensité de contamination biodisponible.

A titre d'exemple, en milieu continental de telles valeurs seuils ont été établies pour améliorer l'exploitation et l'interprétation des résultats de la contamination métallique chez les mousses (AE, 1998). Des concentrations dites « repères » ont été déterminées en utilisant la médiane des concentrations métalliques mesurées dans des mousses échantillonnées sur un grand nombre de sites de référence. Ces concentrations « repères » ont servi de base à la définition d'une grille de qualité et de classes de contamination métallique pour la classification des milieux.

Par ailleurs, en milieu marin (où les approches de biosurveillance sont plus développées qu'en milieu continental ; voir Besse *et al.*, 2011), la Commission OSPAR a mis en place un certain nombre de critères, basés sur des données obtenues dans le cadre de démarches passives. Ce sont des outils statistiques qui permettent de déterminer si les concentrations mesurées, dans les sédiments ou le biote, peuvent être considérées comme proches des concentrations de fond (ICES 2004) :

- la « Background Concentration » (concentration de fond - BC) est la concentration d'un contaminant dans un site de référence ou éloigné de tout apport, basée sur des données contemporaines ou historiques. Pour la Commission OSPAR, la BC d'un contaminant de synthèse est considérée égale à zéro (ICES, 2004) ;
- la « Low Concentration » (concentration faible - LC) est une valeur utilisée pour permettre la dérivation des BAC lorsqu'il est difficile de constituer une série de données sur les concentrations dans des zones éloignées de tout apport (ou de référence) à partir desquelles on déduit des BC. Logiquement, une LC peut donc être légèrement supérieure à la BC.
- enfin, la « Background Assessment Concentration » ou « teneur ambiante d'évaluation » (BAC) est un outil statistique défini par rapport à la concentration de fond (BC) ou à la concentration faible (LC). C'est une valeur au-dessous de laquelle une concentration peut être qualifiée de proche ou égale au fond géochimique.

Des « valeurs seuils de contamination biodisponible » fiables ne peuvent être déterminées que si les mesures de contamination à partir desquelles elles sont déterminées sont comparables dans l'espace et dans le temps. Ceci nécessite la maîtrise des facteurs confondants qui peuvent biaiser l'interprétation des valeurs de contamination ; et c'est dans cet objectif qu'a été développée l'approche de biosurveillance active sur *Gammarus fossarum*.

2. Protocole d'exposition

2.1. Organismes

2.1.1. Justification de l'espèce utilisée

Sur la base de critères définis dans le précédent rapport bibliographique (Besse *et al.*, 2011), le choix de l'espèce s'est porté sur l'amphipode *Gammarus fossarum*, en effet :

- le gammare est un genre répandu et commun dans les rivières d'Europe occidentale, où il se trouve souvent en densités élevées ;
- il est écologiquement pertinent car il représente une réserve importante de nourriture pour les macroinvertébrés, poissons, oiseaux et amphibiens (Macneil *et al.*, 1997 ; Welton 1979), et joue un rôle majeur dans les processus de décomposition des litières ;
- le gammare remplit plusieurs recommandations du Guide CMA (CE, 2010) pour la sélection des espèces du biote à l'égard de la mise en œuvre de la DCE (notamment en ce qui concerne les métaux traces) ;
- dans le cadre de la mise en œuvre d'une stratégie de biosurveillance active, les gammares sont des organismes intéressants car ils peuvent être triés en fonction de leur taille. De plus, les sexes peuvent être identifiés et séparés, et il est possible de les alimenter durant toute la durée de l'expérimentation ;
- enfin, *G. fossarum* est un taxon commun et abondant en Europe occidentale, il est facile à identifier et sa physiologie est assez bien connue ; par ailleurs il a fait l'objet de plusieurs travaux en écotoxicologie au laboratoire et sur le terrain (Khan *et al.*, 2011 ; Lacaze *et al.*, 2011a, 2011b ; Coulaud *et al.*, 2011 ; Xuereb *et al.*, 2009).

2.1.2. Prélèvement et stabulation des organismes

Les gammares ont été prélevés à « La Tour du Pin », une station de référence située sur la Bourbre, Isère (38) (Figure 2). La Bourbre est un affluent du Rhône en amont de Lyon. Ce cours d'eau affiche une bonne qualité de l'eau selon les données du réseau de contrôle de surveillance national (RCS)¹ ; cette station présente également une forte densité de gammares compatible avec des études à large échelle.



Figure 1. *Gammarus fossarum* mâle

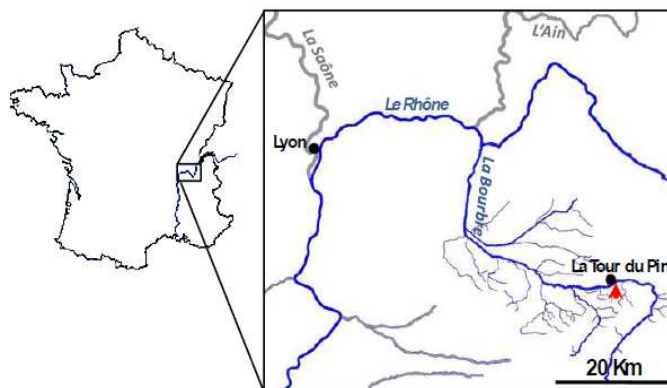


Figure 2. Localisation du site de prélèvement

¹ <http://sierm.eaurmc.fr/eaux-superficielles/index.php>

Les gammares ont été prélevés à l'aide d'un filet de type troubleau puis tamisés (mailles de 2 et de 2,5 mm) afin de séparer les individus adultes des juvéniles. Ils ont ensuite été rapidement transportés dans des glacières au laboratoire.

Les organismes de la taille requise (comprise entre 2 et 2,5 mm) ont été maintenus en stabulation au laboratoire pendant 14 jours dans des aquariums de 30 L, sous aération constante, dans une eau maintenue à une température de $12 \pm 0,2^\circ\text{C}$ et à une photopériode de 16 h de jour / 8 h de nuit (Figure 3).

Les organismes ont été acclimatés à deux conductivités (300 et $600 \mu\text{s}\cdot\text{cm}^{-1}$ soit des duretés respectives de 112 et 223 mg L^{-1} de CaCO_3). Le choix de la conductivité dépend de la conductivité des sites d'étude. En pratique, pour des sites dont la conductivité est inférieure ou égale à $400 \mu\text{s}\cdot\text{cm}^{-1}$, des gammares acclimatés à $300 \mu\text{s}\cdot\text{cm}^{-1}$ ont été utilisés ; pour des conductivités des sites d'étude supérieures à $400 \mu\text{s}\cdot\text{cm}^{-1}$, des gammares acclimatés à $600 \mu\text{s}\cdot\text{cm}^{-1}$ ont été utilisés.

Les gammares ont été nourris à l'aide de feuilles d'aulne (*Alnus glutinosa*) récoltées sur un site peu anthropisé dans les monts du Lyonnais. Deux fois par semaine, les organismes ont reçu comme supplément protéique des vers lyophilisés de *Tubifex sp.*

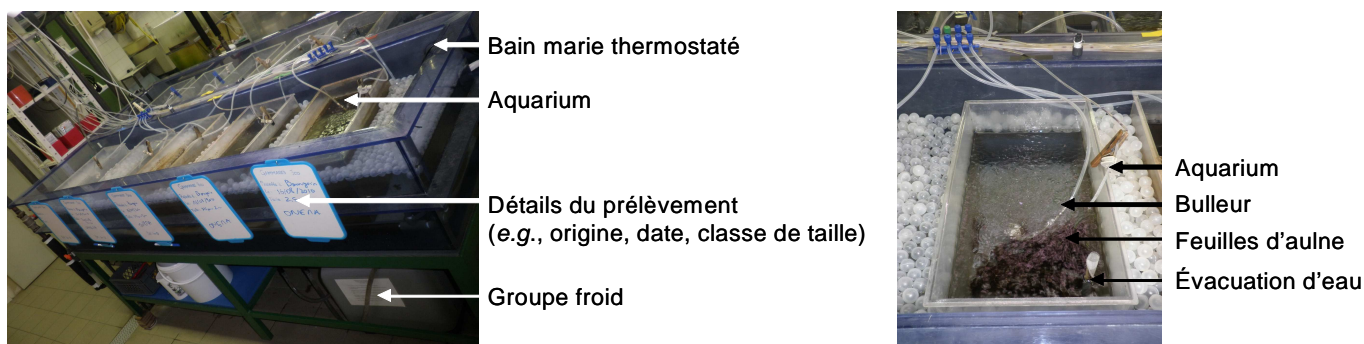


Figure 3. Stabulation des gammares au laboratoire.

2.2. Choix des sites d'étude

Les sites d'étude ont été choisis parmi les stations du réseau français de contrôle de surveillance (RCS)¹. La sélection des sites étudiés a bénéficié de la collaboration et des échanges avec les différents partenaires de ce projet : l'ONEMA, l'agence de l'eau Rhône-Méditerranée & Corse (R&C) et la DIREN Rhône-Alpes (Lopes *et al.*, 2012).

Le choix des sites a reposé sur les critères suivants :

- sélection de sites représentatifs des différents systèmes hydrologiques de la région Rhône-Alpes ;
- au sein de ce groupe de sites représentatifs, sélection de 12 sites *a priori* peu ou pas contaminés et de 15 sites *a priori* exposés à une contamination anthropique.

Vingt-sept sites ont ainsi été sélectionnés dans la région Rhône-Alpes, couvrant une large gamme de lieux géographiques (environ $20\,000 \text{ km}^2$), une grande diversité de systèmes hydrologiques et une large gamme de caractéristiques physico-chimiques, et pour les sites impactés, différents types de pressions anthropiques (Figure 4).

2.2.1. Sites non impactés

Depuis la mise en œuvre de la DCE, environ 50 stations de référence ont été sélectionnées au sein de la région administrative Rhône-Alpes. Ces stations sont classées soit comme « référence » (sans altérations anthropiques) soit comme « référence par défaut » (soumis à des altérations anthropiques, mais avec un très faible impact sur le milieu).

Sur la base de cette sélection réalisée préalablement par l'AE RM&C et leurs partenaires, 12 sites ont été retenus. Les sites retenus sont présentés dans le Tableau 1. Les caractéristiques physico-chimiques détaillées sont présentées en Annexe A.

2.2.2. Sites impactés

La sélection des sites dits « impactés » dans la région Rhône-Alpes est basée sur l'état des lieux des masses d'eau réalisé pour les services de l'état en 2003 dans le cadre de la mise en œuvre de la DCE. Au total, 15 sites ont été retenus ; ces sites montrent une mauvaise qualité chimique de l'eau et / ou des indices écologiques faibles et / ou sont situés en aval des sites non impactés. Les sites choisis, le type et l'intensité des pressions sont présentés dans le Tableau 2. Les caractéristiques physico-chimiques détaillées pour les sites impactés sont présentées en Annexe A.

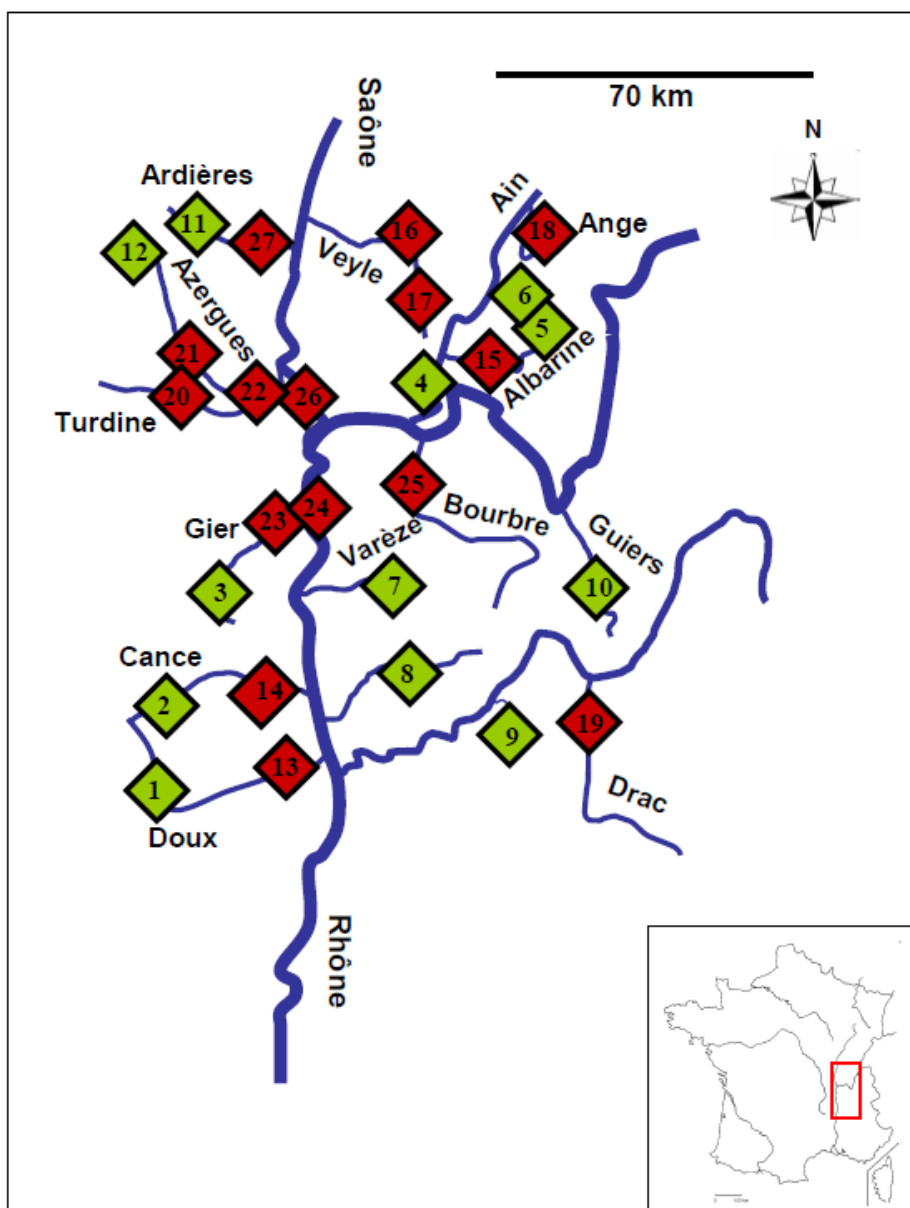


Figure 4. Situation géographique des 27 sites sélectionnés en région Rhône-Alpes.

Les sites qualifiés de non impactés apparaissent en vert et les sites qualifiés d'impactés en rouge.

Tableau 1. Liste et caractéristiques des 12 sites *a priori* peu ou pas impactés.

Code (Irstea)	Rivière	Nom du Site	Rang de Strahler ^a	Taille ^b	Référence par défaut
1	Doux	Labatie d'Andaure	3	P	Non
2	Cance	Saint Julien Vocance	2	TP	Non
3	Gier	la Valla en Gier	3	P	Non
4	Ain	Saint Maurice de Gourdans	5	G	Oui
5	Albarine	Chaley	3	P	Oui
6	Mandorne	Oncieu	2	TP	Non
7	Varèze	Cours et Buis	2	TP	Non
8	Galaveyson	Saint Clair sur Galaure	1	TP	Non
9	Drevenne	Rovon	3	P	Non
10	Guiers Mort	Saint Laurent du pont	3	P	Oui
11	Ardières	Ardillats	1	TP	Non
12	Ergues	Poules les Echarmeaux	1	TP	Non

^a : indicateur simple de classification de l'importance d'un cours d'eau : il démarre à la valeur 1 à la source de tout ruisseau. Les rangs de 1 à 3 caractérisent les petits cours d'eau ou têtes de bassin. Les rangs de 4 à 8 caractérisent les cours d'eau les plus larges et les fleuves.

^b : indication sur la taille du cours d'eau : TP = très petit, P = petit et G = grand.

Tableau 2. Liste et caractéristiques des 15 sites *a priori* impactés.

Code (Irstea)	Rivière	Nom du Site	Aval référence	Pression ¹	Contaminants ²		
					métaux	pesticides	autres
13	Doux	St Jean de Muzols	Oui	Ind, Agri, Urb			
14	Cance	Sarras	Oui	Ind, Urb			
15	Albarine	Saint Rambert en Bugey	Non	Ind 1, Urb 2			
16	Veyle	Lent	Non	Agri 3			
17	Veyle	Servas	Non	Agri 3			
18	Ange	Brion	Non	Ind 3, Urb 2			
19	Drac	Fontaine	Oui	Ind 3			
20	Turdine	l'Arbresle	Oui	Ind 3, Urb			
21	Azergues	Legny	Oui				
22	Azergues	Lucenay	Oui	Agri 3, Ind 2			
23	Gier	Givors	Oui	Urb			
24	Rhône	aval Givors	Non	Urb, Ind			
25	Bourbre	Pont de Cheruy	Non	Urb 2, ind 2			
26	Saône	Ile Barbe	Non	Urb, Ind			
27	Ardières	Saint Jean d'Ardières	Oui	Agri 3, Ind 2			

¹ : Les chiffres indiquent l'intensité d'impact de la pression : 3 = fort ; 2 = moyen ; 1 = faible.

² : Les cellules colorées indiquent le niveau d'impact de la contamination sur le milieu : rouge =fort ; orange=intermédiaire ; jaune=moyen.

Ind : industriel ; Urb : urbain ; Agri : agricole.

2.3. Protocole d'exposition

L'exposition des gammares est réalisée dans des récipients de 180 mL en polypropylène (longueur 10 cm, diamètre 5,5 cm) dont le bouchon a été percé et le fond remplacé par un tamis (maille : 1 mm). Le système est fermé à l'aide d'un autre tamis (maille : 500 µm) fixé par le bouchon percé. Grâce aux tamis, les organismes sont en contact permanent avec l'eau ; ceci permet également de maintenir un taux d'oxygène optimal dans le système (Figure 5).

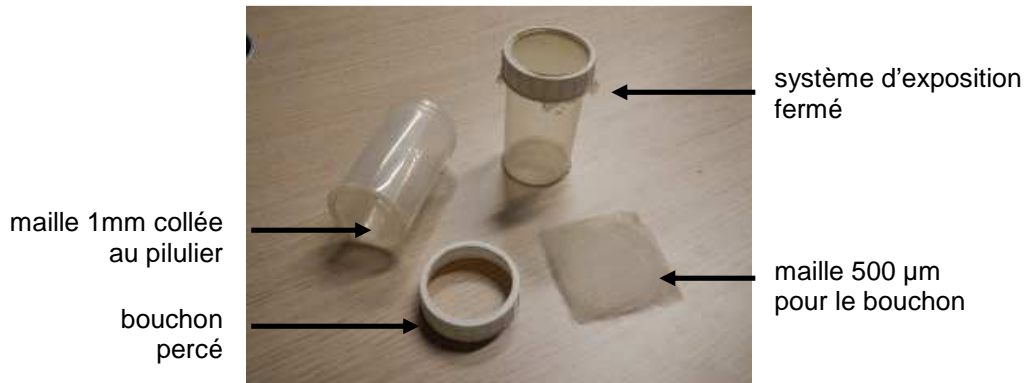


Figure 5. Systèmes d'encagement des gammares.

Les systèmes sont fixés de manière parallèle au courant à l'intérieur de cages en plastique rigide grâce à des colliers en polychlorure de vinyle (Figure 6). Les cages d'exposition peuvent contenir jusqu'à 8 systèmes pour les gammares. Les cages sont lestées et camouflées avec des pierres prélevées sur le site (Figure 7).



Figure 6. Fixation des systèmes d'exposition dans la cage.

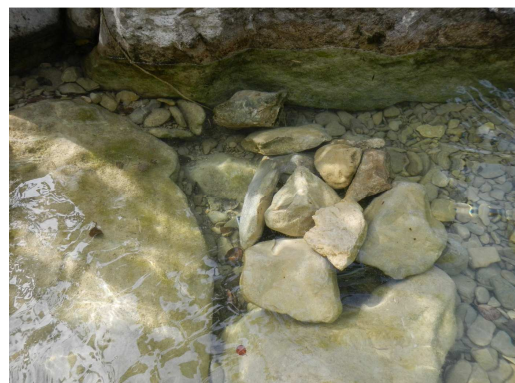


Figure 7. Caisse lestée et camouflée.

Pour les besoins de notre étude, 8 répliquats de 25 individus ont été exposés sur une période 7 jours.

Pour limiter l'influence de la taille, de la croissance et du sexe des organismes sur l'accumulation de contaminants, seuls des gammares mâles matures de même classe d'âge ont été exposés (taille moyenne de 9 ± 1 mm et poids moyen compris entre 4 à 6 mg de poids sec).

Pour optimiser les conditions de survie des gammares (i.e. éviter le cannibalisme ainsi que toute influence d'un défaut d'alimentation sur les taux de survie des organismes et sur l'accumulation des contaminants) 20 disques de feuilles d'aulne (*A. glutinosa*, les mêmes que celles utilisées en laboratoire) ont été placés dans chaque système.

Après les 7 jours d'exposition, les gammares ont été récoltés, comptés pour la détermination du taux de survie, séchés, *poolés* en vue des analyses chimiques puis congelés dans l'azote liquide et conservés à -80°C.

2.4. Suivi des paramètres physico-chimiques

Des sondes fixées aux cages ont assuré la mesure de la température toutes les heures, durant les 7 jours de l'exposition. La conductivité, la concentration en oxygène et le pH ont été mesurés *in situ* à la pose puis à la récupération des cages (à 0 et 7 jours). Les ions majeurs ont également été mesurés à 0 et 7 jours (prélèvements d'eau ponctuels ramenés pour analyse en laboratoire), ce qui a permis de déterminer la dureté de l'eau au niveau des sites d'étude.

3. Substances ciblées et méthodes analytiques

3.1. Substances analysées

Les substances analysées (substances organiques et métaux) font partie des substances ciblées dans le cadre de la convention ONEMA-Cemagref 2009, action n°22 (Lopes *et al.*, 2012).

Pour les métaux, les 4 métaux et métalloïde de l'état chimique (cadmium, plomb, nickel et mercure), ainsi que les 4 métaux de l'état écologique (arsenic, chrome, cuivre et zinc) ont été pris en compte.

Pour les substances organiques, celles retenues comme substances prioritaires, dangereuses ou candidates (CE, 2008) dans la surveillance de l'état chimique, ainsi que les polychlorobiphényles (PCB) indicateurs ont été ciblés, soit au total 28 substances organiques (Tableau 3).

Remarque : Le choix des substances à analyser dans ce travail a été effectué avant la publication de la proposition de révision de la liste de substances prioritaires par la Commission européenne (CE, 2012). Il a donc été basé d'une part sur la liste des substances prioritaires définies dans la directive 2008/105/CE (CE, 2008) et d'autre part, sur les substances soumises à révision pour leur inclusion sur la liste des substances prioritaires, selon le groupe de travail Européen SG-R « sub-group on review of the WFD priority substances list. Concernant les PCB, ce sont les PCB « dioxin-like » qui ont finalement été inclus sur la liste des substances prioritaires.

Tableau 3. Tableau récapitulatif des substances organiques retenues dans le cadre de l'étude.

Substances organiques étudiées	Statut dans l' « état chimique »
Pesticides organochlorés	
Hexachlorobenzène	Prioritaire
Lindane	Prioritaire
Heptachlore et heptachlore époxyde	Candidates
DDT	
2,4' DDE	Dangereuse
4, 4' DDE (+ Dieldrine)	Dangereuse
2,4' DDD	Dangereuse
4, 4' DDD	Dangereuse
2, 4' DDT	Dangereuse
4, 4' DDT	Dangereuse
Hydrocarbures aromatiques polycycliques	
Naphthalène	Prioritaire
Anthracène	Prioritaire
Fluoranthène	Prioritaire
Benzo(b,k,i)fluoranthène	Prioritaire
Benzo(a)pyrène	Prioritaire
Indeno(1,2,3-cd)pyrène	Prioritaire
Benzo(g,h,i)pérylène	Prioritaire
Polychlorobiphényles indicateurs	
Congénères numéros 50 + 28 ; 52 ; 101 ; 118 ; 138 ; 153 ; 180	Candidates
Polybromodiphényléthers	
Congénères numéros 47 ; 99 ; 119 et 153	Candidates

3.2. Méthodes d'analyse

3.2.1. Métaux

Toutes les analyses chimiques sur les métaux ont été menées au LAMA (Laboratoire de chimie des milieux aquatiques), Irstea de Lyon.

Les individus ont été *poolés* (5 organismes par échantillon) pour obtenir une masse moyenne de 150 mg de poids frais (environ 30 mg de poids sec). Des triplicats de 5 organismes ont été soumis à analyse après lyophilisation.

Le cadmium (Cd), le plomb (Pb), le nickel (Ni), l'arsenic (As), le chrome (Cr), le cuivre (Cu) et le zinc (Zn) ont été analysés par plasma à couplage inductif couplé à la spectrométrie de masse (ICP-MS, Thermo série X7 II). Le mercure (Hg) total a été analysé (sur 1 seul échantillon par site) par spectrométrie d'absorption atomique à vapeur froide. L'analyse automatique des concentrations en Hg est réalisée après incinération de l'échantillon sous flux d'O₂ directement dans l'appareil (MILESTONE, Direct Mercury Analyser 80).

Pour le contrôle qualité, des essais à blanc ont systématiquement été effectués afin de détecter toute contamination possible le long de la chaîne d'analyse. De plus, des matériaux référence certifiés ont été utilisés (CRM, TORT-2, hépatopancreas de homard ; et AIEA-407, poisson).

Les limites de quantification (LQ) (exprimées en $\mu\text{g.g}^{-1}$ de poids sec) sont de $0,04 \mu\text{g.g}^{-1}$ pour Cd ; $0,074 \mu\text{g.g}^{-1}$ pour Pb ; $0,19 \mu\text{g.g}^{-1}$ pour Ni ; $0,74 \mu\text{g.g}^{-1}$ pour Zn ; $0,20 \mu\text{g.g}^{-1}$ pour Cu, As et le Cr ; et $0,01 \mu\text{g.g}^{-1}$ pour Hg.

3.2.2. Substances organiques

Toutes les analyses chimiques ont été réalisées au Centre de Développement et de Transfert Analytique (CDTA, Bordeaux).

Les individus de *G. fossarum* ont été *poolés* (75 organismes par échantillon) pour obtenir une masse moyenne de 2300 mg de poids frais (environ 400 mg de poids sec).

Les méthodes d'extraction et la quantification des hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP), des PCB et des pesticides organochlorés sont décrits en détail dans les articles suivants : Cailleaud *et al.* (2007) et Thompson et Budzinski (2000). En résumé, les contaminants accumulés dans *G. fossarum* ont été extraits en utilisant le dichlorométhane par micro-extraction assistée (350 Maxidigest VWR, Fontenay sous Bois, France), puis les extraits organiques ont été purifiés à l'acide sulfurique et séchés au sulfate de sodium anhydre. Les concentrations en PCB et en pesticides organochlorés ont été mesurées par chromatographie gazeuse (Hewlett-Packard 5890A série IIGC, Avondale, MA, USA, équipé d'un détecteur à capture d'électrons 63Ni). Les HAP ont été mesurés en chromatographie gazeuse (GC) couplée à un spectromètre de masse (GC modèle Hewlett-Packard 6890A et détecteur Agilent Networks 5973, Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA).

Des blancs (matériel en verre et solvants) ont été régulièrement effectués. Pour les PCB et les HAP, l'efficacité des différentes procédures d'analyse a été évaluée par l'analyse de matériel de référence : tissus de moule MRS-2978 du National Institute of Standards and Technology Standard Reference Material (NIST).

Les limites de quantification ont été établies à 0.3 ng.g^{-1} pour l'ensemble des substances organiques.

4. Résultats - évaluation de la contamination chimique des organismes

4.1. Taux de survie des organismes

Après les 7 jours d'exposition, le taux de survie des gammares est resté élevé (B) avec un taux moyen de survie supérieur à 80% pour 22 des 27 sites, validant les conditions de l'exposition et permettant de récupérer suffisamment de gammares pour assurer l'analyse des contaminants.

4.2. Intérêt de *G. fossarum* pour la surveillance chimique des eaux continentales

4.2.1. Accumulation des métaux

Contrairement à d'autres invertébrés d'eau douce, comme le bivalve invasif *Dreissena polymorpha*, les gammares n'ont que peu été utilisés pour mesurer la contamination chimique dans les eaux continentales. Ainsi, pour les métaux, très peu de données de biosurveillance passive (Schaller *et al.*, 2011 ; Amyot *et al.*, 1996) et de biosurveillance active (Dedourge-Geffard *et al.*, 2009 ; Khan *et al.*, 2011 ; Lacaze *et al.*, 2011b) sont disponibles.

Les niveaux de concentration en métaux et mercure dans *G. fossarum* sont présentés dans le Tableau 4. La très grande majorité des valeurs mesurées sont supérieures à la LQ. Le Cd, le Hg, l'As, le Cu, et le Zn ont été quantifiés sur l'ensemble des sites ; alors que le Pb, le Ni et le Cr ont été quantifiés sur tous les sites à l'exception de 2, 4, et 8 sites, respectivement.

Afin d'augmenter la capacité de discrimination entre les sites étudiés, il est important que l'organisme choisi soit un bon accumulateur des contaminants (Rainbow, 2002). Pour estimer cette capacité d'accumulation de *G. fossarum* vis à vis des polluants étudiés, nous avons déterminé un facteur d'enrichissement empirique, calculé comme le ratio de la concentration maximale (Max) mesurée sur la concentration minimale (Min) mesurée (\geq LQ). Les résultats montrent que gammares ont bien accumulé le Ni, le Cd et le Pb avec des ratios Max / Min variant de 4,8 à 10,4 (Tableau 4). Le Hg, le Cu et le Zn ont également été accumulés mais les ratios Max / Min sont inférieurs à ceux des autres métaux, en particulier pour le Cu et le Zn, avec un ratio Max / Min de 1,7 et de 1,6 respectivement.

Toutefois, la pertinence de *G. fossarum* pour la surveillance chimique semble être limitée dans le cas spécifique du Cu : comme le Cu est impliqué dans la synthèse de l'hémocyanine chez les gammaridés, il est donc très régulé et les gammares sont donc connus pour être de mauvais indicateurs de ce métal (Dedourge-Geffard *et al.*, 2009 ; Taylor et Anstiss, 1999).

4.2.2 Accumulation des organiques

D'une manière générale, les résultats de montrent que la très grande majorité des substances étudiées est accumulée et quantifiée chez *G. fossarum*, sur une période d'exposition relativement courte (1 semaine).

La majorité des substances (23 sur 28) a été quantifiée dans les gammares (Tableau 5). Certains isomères du DDT (à savoir le 4,4'-DDE + dieldrine, 4,4'-DDT et 2,4'-DDT), des congénères de BDE (47 et 153), le naphthalène, et tous les congénères de PCB ont été quantifiés dans l'ensemble des échantillons. Le lindane, l'HCB et l'anthracène ont été quantifiés dans moins de la moitié des échantillons, avec des concentrations inférieures aux LQ, même sur les sites impactés. Enfin, 5 substances n'ont jamais été détectées : l'heptachlore et l'heptachlore époxyde, le 2,4'-DDD et les congénères de BDE n° 119 et 153.

Tableau 4. Concentrations métalliques (en $\mu\text{g.g}^{-1}$ de poids sec) dans les gammares engagés après 7 jours d'exposition ; et corrélation des concentrations mesurées avec la température moyenne et la dureté mesurées aux niveaux des sites d'étude.

Métaux	Concentration ($\mu\text{g.g}^{-1}$ ps)						R ²	
	Med	Min	Max	Max/Min	Freq	LQ	Température	Dureté
Ni	0.48	0.27	1.29	4.8	85%	0.19	0.04	0.02
Cd	0.22	0.13	1.31	10.4	100%	0.04	0.003	0.34
Pb	0.28	0.14	1.39	9.9	93%	0.07	0.02	0.02
Hg	0.05	0.04	0.11	2.7	100%	0.01	0.06	0.003
Zn	69.72	49.49	81.88	1.6	100%	0.74	0.003	0.06
Cu	72.1	50.7	85.3	1.7	100%	0.20	0.009	0.02
Cr	0.48	0.20	1.06	5.3	100%	0.20	0.05	0.04
As	1.62	0.95	2.72	2.9	100%	0.20	0.05	0.01

Tableau 5. Concentrations en substances organiques (en ng.g^{-1} de poids sec) mesurées chez *Gammarus fossarum* après 7 jours d'encagement et corrélation (R²) avec la température moyenne mesurée au niveau des sites d'étude.

Substances organiques	Concentration (ng.g^{-1} ps)						R ²
	Med	Min	Max	Max/Min	Freq	LQ	Temp
Hexachlorobenzène	0.5	0.4	10.0	27.5	41%	0.3	0.02
Lindane	0.3	0.1	7.8	78.0	37%	0.3	0.4
Heptachlore	< LQ	< LQ	< LQ	-	-	0.3	nd
Heptachlore époxyde	< LQ	< LQ	< LQ	-	-	0.3	nd
2, 4' DDE	1.0	0.3	10.6	35.3	44%	0.3	0.02
4, 4' DDE+Dieldrine	3.4	1.9	62.9	33.1	100%	0.3	0.04
2, 4' DDD	< LQ	< LQ	< LQ	-	-	0.3	nd
4, 4' DDD	2.9	1.4	44.6	31.8	100%	0.3	0.05
2, 4' DDT	1.3	0.6	59.2	98.7	100%	0.3	0.02
4, 4' DDT	1.7	1.0	48.4	48.4	52%	0.3	1.0 10 ⁻³
Naphthalène	19.9	8.5	36.8	4.3	100%	0.3	0.06
Anthracène	0.6	0.3	9.1	91.0	41%	0.3	0.25
Fluoranthène	2.1	0.7	33.7	48.1	96%	0.3	0.23
Benzo(b,k,i)fluoranthène	1.8	0.4	19.4	48.5	96%	0.3	0.11
Benzo(a)pyrène	1.0	0.3	3.3	11.0	63%	0.3	0.19
Indeno(1,2,3-cd)pyrène	0.9	0.4	4.8	12.0	59%	0.3	0.06
Benzo(g,h,i)pérylène	0.9	0.3	3.8	12.7	63%	0.3	0.14
CB 50+28	1.8	0.3	13.2	44.0	100%	0.3	0.03
CB 52	3.9	1.9	33.8	17.8	100%	0.3	0.03
CB 101	3.9	1.9	24.5	12.9	100%	0.3	0.09
CB 118	3.6	1.0	20.7	20.7	100%	0.3	0.01
CB 138	6.5	3.3	45.5	13.8	100%	0.3	0.16
CB 153	8.0	4.1	50.8	12.4	100%	0.3	0.21
CB 180	2.3	1.3	16.6	12.8	100%	0.3	0.15
BDE 47	2.4	0.9	5.0	5.5	100%	0.3	0.19
BDE 119	< LQ	< LQ	< LQ	-	-	0.3	nd
BDE 99	1.2	0.5	3.2	6.4	100%	0.3	0.13
BDE 153	< LQ	< LQ	< LQ	-	-	0.3	nd

Med, Min et Max sont respectivement la médiane, le minimum, et le maximum des concentrations mesurées sur l'ensemble des sites d'étude (n=27). (min pour les valeurs \geq LQ).

LQ : Limite de quantification.

Freq : fréquence de quantification (pourcentage de valeurs mesurées \geq LQ) pour chacune des substances sur les 27 sites d'étude.

R² : coefficient de détermination.

Les ratios Max / Min, quant à eux, varient de manière importante entre les substances organiques : de 4,3 pour le naphthalène jusqu'à 99 pour le 2,4'-DDT (Tableau 5). Sur les 23 substances quantifiées, 20 ont un ratio Max / Min supérieur à 10, ce qui indique que le gammare est un bon accumulateur pour ces substances.

Concernant les substances organiques étudiées ici, et pour les eaux continentales, aucune donnée de biosurveillance active n'a été retrouvée dans la littérature scientifique. Seule une étude rapportant des données de biosurveillance passive a été retrouvée (Blais *et al.*, 2003). Dans cette étude (Blais *et al.*, 2003), l'heptachlore a été mesuré dans *Gammarus lacustris*, à une concentration d'environ 0,1 ng.g⁻¹ en poids frais (environ 0,5 ng.g⁻¹ en poids sec, en supposant un taux d'humidité de 80%). Ces résultats suggèrent que - même si les taux d'absorption peuvent différer entre les deux espèces de gammare - l'absence de quantification de cette substance dans notre étude n'est pas liée à une faible accumulation chez *G. fossarum*, mais plutôt à l'absence de contamination des sites d'étude par l'heptachlore.

4.3. Robustesse de la méthodologie, influence des facteurs biotiques et abiotiques

4.3.1. Influence des facteurs biotiques

- **Influence de la taille/masse**

Plusieurs facteurs biotiques, tels que le taux de croissance ou le cycle de reproduction peuvent influencer sur les niveaux de contamination dans le biote. Les effets confondants du facteur taille/masse notamment, sont rapportés dans de nombreux travaux (Andral *et al.*, 2004 ; Boyden, 1974 ; Conti *et al.*, 2008 ; Geffard *et al.*, 2007 ; Mubiana *et al.*, 2006). Le protocole d'exposition des gammares (utilisation d'organismes de taille et de masse similaires et supplémentation en nourriture) permet d'éviter toute influence de ces facteurs : seules de très faibles variations de masse (poids moyen des organismes de 5.8 mg de poids sec avec une déviation standard de 0,7 mg) ont été observées chez les gammares en fin d'exposition, et aucune relation entre ces variations et les concentrations accumulées n'a par conséquent été observée.

- **Cycle de reproduction**

Dans le cas des crustacés comme les gammares, si la durée du cycle est fonction de la température, ces organismes se reproduisent toute l'année. Comme pour les autres espèces, le cycle de reproduction chez le gammare peut induire des variations de masse et de composition biochimique (notamment en lipides) dans les organismes, ce qui peut moduler les teneurs de contaminants accumulés et donc influencer sur l'interprétation des résultats (Andral *et al.*, 2004 ; Kwan *et al.*, 2003 ; Bruner *et al.*, 1994 ; Phillips, 1986). Cependant, chez cette espèce, il est possible de sélectionner des organismes de même sexe et au même stade de reproduction. Le choix s'est donc porté sur des mâles afin de supprimer l'effet du cycle reproducteur.

4.3.2. Influence des facteurs abiotiques

- **Température**

Aucune influence de la température sur les niveaux de contamination mesurés chez *G. fossarum* n'a été observée dans les conditions de cette étude, à 7 jours d'exposition et compte-tenu de la gamme de températures observée (Tableau 4 pour les métaux et 5 pour les organiques). La gamme de tolérance de température pour *G. fossarum* est comprise entre 0°C et 28°C, avec une température optimale de 12°C (Wijnhoven *et al.* 2003). Notre étude ayant été menée au début de l'automne avec une température moyenne sur l'ensemble des sites de 13°C (Annexe C), les gammares n'ont pas été exposés à des températures extrêmes.

Par ailleurs, l'influence de la température sur la bioaccumulation des contaminants, communément rapportée par les travaux scientifiques, en particulier pour les bivalves, (Minier *et al.*, 2006 ; Gossiaux *et al.*, 1996 ; Fisher *et al.*, 1993), pourrait être limitée sur le terrain. S'il reste difficile de conclure, il apparaît que sur le terrain et au laboratoire, quand d'autres paramètres sont pris en considération – teneur en matière organique par exemple –, l'effet de la température reste limité par rapport à ces autres facteurs (Blais *et al.*, 2003 ; Pellet *et al.*, 2009).

- **Dureté**

Parmi les facteurs abiotiques, l'impact de la dureté (Ca^{2+} et Mg^{2+}) sur la biodisponibilité et la toxicité des métaux est connu et bien documenté (Heijerick *et al.*, 2003 ; Lebrun *et al.*, 2011 ; Peters *et al.*, 2011 ; Wright et Frain, 1981). Ces cations divalents ont un effet protecteur sur les organismes, car ils agissent comme des concurrents des métaux vers les transporteurs d'ions.

Toutefois, l'impact de la dureté (Ca^{2+} et Mg^{2+}) sur la physiologie des organismes, en particulier sur la densité des sites d'action des transporteurs a été peu étudiée, mais elle semble négligeable. Ainsi, dans notre travail, aucune relation entre la dureté et les concentrations métalliques mesurées dans les organismes exposés n'a été observée (Tableau 4).

Par ailleurs, Pellet *et al.* (2009), ont montré que la diminution de l'influx de Cd chez *Gammarus pulex* (exposé à des concentrations croissantes), s'explique par une diminution de la biodisponibilité des polluants résultant de la compétition entre le calcium et les ions métalliques. De la même manière, Ma *et al.*, (1999) ont montré que l'absorption du Cu chez *Ceriodaphnia dubia* n'est pas modifiée que les organismes soient cultivés dans une eau à faible ou à forte concentration en Ca^{2+} .

5. Détermination de valeurs seuil de contamination

Dans la première partie de ce travail, nous avons pu proposer une méthodologie de biosurveillance permettant le contrôle des facteurs biotiques connus pour être confondants dans l'interprétation des valeurs de contamination. De plus nous n'avons pas observé d'influence directe des facteurs abiotiques sur les valeurs de contamination. Ces résultats soutiennent la robustesse et la fiabilité de l'approche proposée et des résultats obtenus. Il est donc possible de définir sur cette base un référentiel fiable sur la base duquel il serait possible d'établir un classement des sites en termes de contamination biodisponible.

5.1. Définition

Par **valeur seuil de contamination biodisponible**, on entend toute valeur de concentration au-dessus de laquelle une concentration mesurée chez les organismes exposés peut être interprétée comme une contamination d'origine anthropique ; et en dessous de laquelle une concentration mesurée ne reflète qu'une valeur de fond, et donc une absence de contamination du milieu. Une valeur de contamination dans les gammars supérieure à la valeur seuil établie signe donc un apport de contamination biodisponible pour les gammars au niveau du site étudié.

En référence aux outils statistiques définis par la Commission OSPAR pour établir si les concentrations mesurées, dans les sédiments ou le biote, peuvent être considérées comme proches des concentrations de fond (ICES 2004), ces valeurs seuils ont été nommées **BBAC** pour « Bioavailable Background Assessment Concentration ».

Remarque importante : Les BBAC définies ici ne sont pas à considérer comme des NQE, car elles n'ont pas le même objectif, ni le même mode de construction (bioaccumulation pour les premières et valeurs de toxicité pour les secondes).

5.2. Détermination des BBAC

5.2.1. Approche statistique

La première approche, statistique, est basée sur l'hypothèse que les niveaux de contamination dans les organismes sont distribués selon une loi normale uniquement sur des sites dépourvus de toute pression anthropique.

Pour calculer les BBAC, les sites ont été classés par niveaux de concentration croissante dans les organismes. Puis, pour chaque substance, nous avons testé si l'ensemble des données suivait une distribution gaussienne, en utilisant le test de normalité de Shapiro. Dans le cas contraire, le site le plus contaminé a été retiré du jeu de données, et la normalité testée à nouveau. Ce processus itératif (suppression du site le plus contaminé puis test de normalité) a été mené jusqu'à ce qu'à obtention d'un jeu de données distribuées normalement.

La BBAC pour chaque contaminant a ensuite été déterminée comme le 95^{ème} percentile (risque de faux négatif à 5%) de la distribution gaussienne obtenue (Figure 8). Cette procédure a été réalisée en utilisant le programme de calcul statistique R (R Development Core Team, 2007).

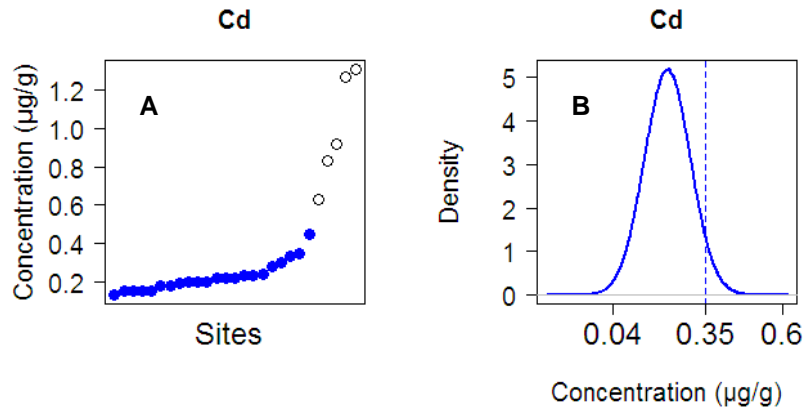


Figure 8. Exemple de BBAC déterminée pour le cadmium, selon la méthode statistique. Sur le schéma de gauche (A) sont présentées les concentrations mesurées pour chaque site, triées par ordre croissant. Les points bleus correspondent au plus grand ensemble de données qui suit une distribution Gaussienne, représentée sur le schéma de droite (B). La valeur seuil est calculée comme le 95^{ème} percentile de cette distribution (ligne pointillée, figure de droite).

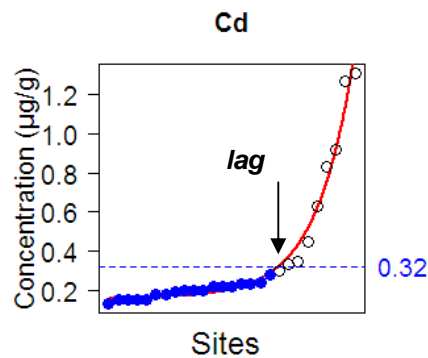


Figure 9. Exemple de BBAC déterminée pour le cadmium, selon l'approche cinétique (modèle de Baranyi).

Sur la figure, les concentrations mesurées pour chaque site sont triées par ordre croissant. La courbe rouge décrit l'ajustement du modèle de Baranyi. Les points bleus correspondent à la phase de latence de la cinétique donc ici au « fond chimique ». Le lg , qui est le point de rupture entre la phase de latence et la phase exponentielle, donne la valeur de BBAC.

$$\log_{10}(C(t)) = \log_{10}(C_{\max}) + \log_{10} \left(\frac{-1 + \exp(\mu * t) + \exp(\mu * lag)}{-1 + \exp(\mu * t) + \exp(\mu * lag) * 10^{(C_{\max} - C_0)}} \right)$$

Avec :

- C(t)** : concentration mesurée au site t ;
- C_{max}** : concentration maximale estimée ;
- μ** : taux d'accumulation estimé ;
- lag** : site à partir duquel l'accumulation des contaminants dans les organismes entre dans la phase exponentielle ;
- C₀** : concentration minimale estimée.

Équation 1. Modèle cinétique de croissance bactérienne de Baranyi.

5.2.2. Modèle cinétique

La deuxième méthode est basée sur l'observation que la distribution des niveaux de contamination, triés par valeurs croissantes, suit un modèle exponentiel comparable aux modèles de croissance bactérienne, avec une phase de "latence" et une phase de croissance exponentielle.

L'intérêt de ce genre de modèle est qu'il permet de déterminer un paramètre correspondant au « point de rupture » entre les deux phases, appelé ici "lag" (Figure 1). Par analogie, la concentration déterminée au point de rupture est la concentration seuil qui permet de séparer le niveau de contamination de fond (période de latence dans l'accumulation) de la phase d'accumulation significative (phase exponentielle).

Nous avons choisi d'ajuster le modèle de Baranyi aux données de contamination (triées par valeurs croissantes) selon l'Équation 1 (Baranyi *et al.*, 1993). La BBAC est donc déterminée par la concentration au "lag" estimé. Les paramètres du modèle de Baranyi (C_{max} , lag, μ et C_0) ont été estimés par maximum de vraisemblance, en utilisant le package « *nlstools* » du logiciel statistique R.

Lorsque les données n'étaient pas assez informatives pour permettre l'ajustement du modèle (notamment lorsque peu de valeurs de concentrations élevées étaient disponibles pour un contaminant), le C_{max} a été fixé à 3 fois la concentration maximale mesurée sur l'ensemble des 27 sites.

5.3. Résultats

En utilisant les deux approches décrites précédemment, il a été possible de déterminer des valeurs de BBAC pour la majorité des substances étudiées et pour lesquelles les concentrations mesurées étaient supérieures aux LQ. Les résultats sont présentés dans le Tableau 6. Les BBAC ont pu être déterminées y compris pour les composés pour lesquels seul un nombre restreint de valeurs étaient supérieures à la LQ (par exemple pour le lindane, l'HCB et l'anthracène ; BBAC calculées respectivement à partir de 11, 9 et 11 concentrations mesurées dans les gammars). L'approche statistique a produit une valeur de BBAC pour tous les substances présentant des concentrations supérieures à la LQ, soit 23 substances, tandis que l'approche cinétique a produit des BBAC pour 6 substances de moins : 4 métaux (Zn, Cu, Cr et As), et 2 substances organiques (naphtalène et BDE 47).

5.4. Discussion

5.4.1. Validité des valeurs de BBAC calculées

Pour une même substance, les BBAC calculées à partir des 2 approches sont très proches : l'intervalle maximal Delta (Tableau 6) observé entre deux valeurs est de $0,1 \mu\text{g.g}^{-1}$ pour les métaux (observé pour le Pb) et de $2,6 \text{ng.g}^{-1}$ pour les substances organiques (observé pour le PCB 138). Comme il s'agit de la première étude portant sur la définition de valeurs seuils de contamination biodisponible (BBAC) basées sur une approche de biosurveillance active, il est à ce stade seulement possible de proposer des critères préliminaires pour juger de la validité des valeurs calculées.

Dans ce travail, les BBAC ont été considérés comme valides pour une substance donnée lorsque : 1) une valeur de BBAC pouvait être calculée à l'aide des deux approches et 2) les valeurs données par les deux approches étaient proches l'une de l'autre. Pour vérifier la seconde affirmation, nous avons calculé un « ratio de validité » empirique défini comme la différence entre les deux valeurs par rapport la concentration maximale mesurée dans gammars, et calculé selon l'équation 2. (En se rapportant à la C_{max} , on se place dans de des conditions de validation moins favorables, car à ce stade il n'est pas possible de dire si la C_{max} a été atteinte dans les organismes).

Tableau 6. BBAC déterminées pour les substances sélectionnées dans cette étude. Les valeurs sont exprimées en $\mu\text{g.g}^{-1}$ de poids sec (ps) pour les métaux, et en ng.g^{-1} ps pour les substances organiques.

Substances mesurées		Valeurs de BBAC		Validité des BBAC		
		Approche statistique	Modèle cinétique	Delta	Ratio de validité	Validité
Métaux ($\mu\text{g/g ps}$)	Ni	0.7	0.7	0.0	0.00	Oui
	Cd	0.3	0.3	0.0	0.00	Oui
	Pb	0.4	0.3	-0.1	0.07	Oui
	Hg	0.06	0.09	0.03	0.27	Oui
	Zn	84.7	nd	nd	nd	Non
	Cu	73.9	nd	nd	nd	Non
	Cr	0.9	nd	nd	nd	Non
	As	2.5	nd	nd	nd	Non
Pesticides (ng/g ps)	Hexachlorobenzène	0.6	1	0.4	0.04	Oui
	Lindane	0.4	0.7	0.3	0.04	Oui
DDTs (ng/g ps)	2,4' DDE	1.9	1.6	-0.3	0.03	Oui
	4, 4' DDE + Dieldrine	4.8	6.0	1.2	0.02	Oui
	4, 4' DDD	3.9	5.0	1.1	0.02	Oui
	2, 4' DDT	1.6	3.1	1.5	0.03	Oui
	4, 4' DDT	2.8	3.2	0.4	0.01	Oui
HAP (ng/g ps)	Naphthalène	32.7	nd	nd	nd	Non
	Anthracène	1.5	1.3	-0.2	0.02	Oui
	Fluoranthène	3.5	3.3	-0.2	0.01	Oui
	Benzo (b,k,j) fluoranthène	3.8	3.1	-0.7	0.04	Oui
	Benzo(a)pyrène	1.3	0.9	-0.4	0.12	Oui
	Indeno (1,2,3-cd) pyrène	1.7	1.6	-0.1	0.02	Oui
	Benzo (g,h,i) pérylène	1.3	1.1	-0.2	0.05	Oui
PCB (ng/g ps)	50 + 28	3.5	2.9	-0.6	0.05	Oui
	52	4.9	7.9	3.0	0.09	Oui
	101	5.8	6.6	0.8	0.03	Oui
	118	5.5	4.3	-1.2	0.06	Oui
	138	8.3	10.9	2.6	0.06	Oui
	153	11.5	13.3	1.8	0.04	Oui
	180	3.3	3.8	0.5	0.03	Oui
PBDE (ng/g ps)	47	4.3	nd	nd	nd	Non
	99	2.1	1.1	-1.0	0.31	Oui

nd : non déterminé

Delta : différence entre les deux valeurs de BBAC (exprimée en $\mu\text{g.g}^{-1}$ ps pour les métaux et en ng.g^{-1} ps pour les substances organiques).

Différence relative exprimée en %.

Induction, exprimée (en %) : rapport de la concentration maximale mesurée sur la moyenne des BBAC.

$$\text{Ratio de validité} = \left| \frac{BBAC_{stat} - BBAC_{fit}}{C_{max}} \right| \times 100$$

Avec :

BBAC stat : valeur seuil déterminée selon l'approche statistique

BBAC fit : valeur seuil déterminée selon le modèle cinétique

Cmax : concentration maximale mesurée dans les organismes

Équation 2. Calcul du ratio de validité (%) entre deux valeurs de BBAC pour une même substance.

Les résultats sont présentés dans le Tableau 6. Pour les 25 contaminants pour lesquels les deux méthodes ont donné une valeur de BBAC, les valeurs des ratio de validité sont inférieures à 0,1. Ces résultats préliminaires suggèrent la fiabilité des BBAC calculées ici ainsi que la pertinence des méthodologies appliquées pour les déterminer ; bien qu'il reste à développer des indicateurs plus robustes de cette fiabilité.

Les ratio sont plus élevés (0,3) pour le Hg et le BDE 99. Ce résultat est lié au manque de valeurs de contamination hautes pour ces substances (Annexe D). Il y a donc une réserve quant à la validité de ces BBAC.

5.4.2. Discussion sur les valeurs de BBAC non valides

Pour 6 substances (Cu, As, Cr, Zn, naphtalène et BDE 47), les BBAC ne sont pas considérées comme valides car seule l'approche statistique a permis d'en déterminer une valeur.

La valeur de BBAC du Cu, obtenue sur la seule base de l'approche statistique est à considérer comme non valide. Comme il a été discuté dans le paragraphe 4.1.3., les gammars sont de mauvais indicateurs de ce métal car ils sont capables de le réguler fortement. Ainsi, la distribution des concentrations mesurées en Cu montre un profil spécifique par rapport aux autres contaminants : elle n'est pas Gaussienne et ne présente pas non plus de phase d'accumulation significative (Figure 13, Annexe D).

Pour les 5 autres contaminants (As, Cr, Zn, naphtalène et BDE 47), le fait que seule l'approche statistique a fourni des valeurs est supposé être lié à une absence de contamination biodisponible sur l'ensemble des sites étudiés pour ces substances. En effet, si l'on admet que les niveaux de contamination dans les organismes sont normalement distribués seulement sur des sites dépourvus de toute pression anthropique (hypothèse de base de l'approche statistique), ces résultats suggèrent que les concentrations mesurées dans les 27 sites d'étude ne sont représentatives que du « fond » environnemental.

Une telle affirmation peut-être vérifiée dans le cas du Zn. Les résultats de campagnes de terrain antérieures effectuées sur des sites miniers et dans les mêmes conditions expérimentales que celles employées ici, rapportent des niveaux de contaminations plus élevés dans les gammars échantillonnés : jusqu'à 237 µg.g⁻¹ pour le Zn (Lacaze *et al.*, 2011b ; Dedourge Geffard *et al.*, 2009). En tenant compte ces données supplémentaires pour le calcul des BBAC, des valeurs ont pu être obtenues avec les deux approches (Figure 10).

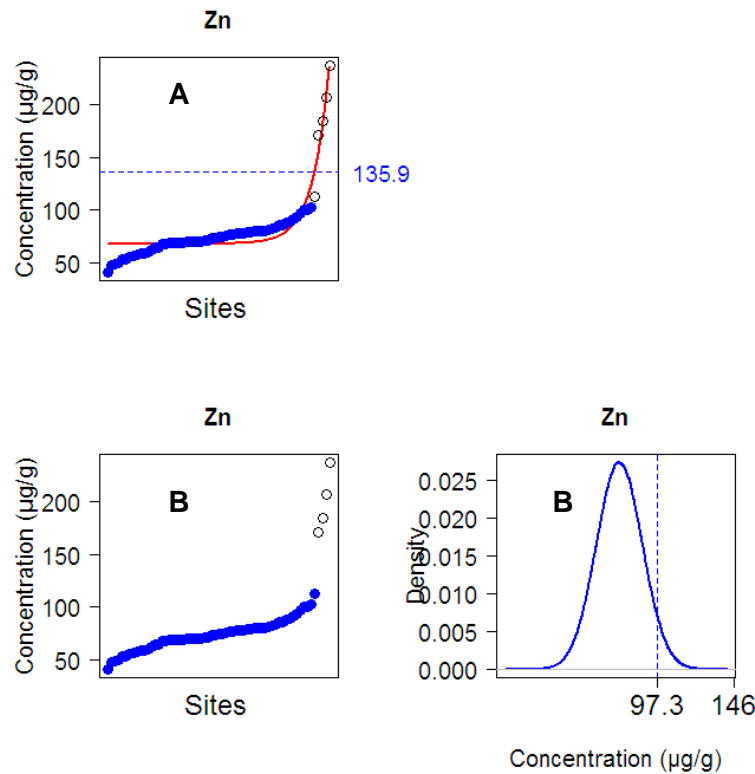


Figure 10. BBAC calculées pour le Zn, après inclusion de données additionnelles provenant d'une campagne de terrain antérieure (Lacaze *et al.*, 2011b).

La figure A donne la valeur de BBAC calculée selon l'approche cinétique et les figures B, celle déterminée selon l'approche statistique.

Dans l'ensemble, les résultats de cette étude permettent de conclure que :

- les deux méthodes proposées (approche statistique et ajustement du modèle cinétique) sont pertinentes pour la détermination de valeurs seuils de contamination biodisponible (BBAC) chez des individus de *G. fossarum* engagés.
- les deux méthodologies mises en œuvre ici nécessitent, pour construire des BBAC fiables, de disposer de niveaux de concentration chez le gammare provenant à la fois à de sites de référence (c'est à dire les concentrations représentatives du « fond ») et de sites contaminés (c'est à dire des valeurs de concentrations hautes).
- lorsque l'ensemble du jeu de données suit une loi normale, les valeurs de BBAC déterminées par l'approche statistique ne doivent pas être considérées comme valides.

5.5. Etude de cas, application des BBAC aux sites d'étude

Afin d'évaluer de façon préliminaire la pertinence des BBAC proposées ici, nous avons croisé la classification des sites établie par les experts de l'Agence RM&C et de la DIREN Rhône-Alpes (Cf. Chapitre 2) avec une classification basée sur les valeurs de BBAC obtenues avec le modèle cinétique. Les résultats sont présentés dans le Tableau 7. Globalement, on observe une distinction claire entre les sites *a priori* non impactés (sites 1 à 12) et les sites impactés (sites 13 à 27).

Tableau 7. Classement des sites d'étude sur la base des valeurs de BBAC définies selon l'approche cinétique.

Substances mesurées	Sites d'étude																										
	Sites <i>a priori</i> non impactés												Sites <i>a priori</i> impactés														
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27
Ni	0.53	1.28	0.43	0.60	0.68	0.33	0.26	<LQ	<LQ	0.5	0.35	0.45	0.48	1.27	0.37	0.37	0.34	0.59	0.88	0.45	<LQ	<LQ	1.01	0.69	0.58	0.40	0.36
Cd	0.83	1.31	1.27	0.18	0.15	0.15	0.17	0.23	0.23	0.22	0.63	0.20	0.45	0.33	0.21	0.19	0.12	0.15	0.28	0.24	0.3	0.91	0.21	0.14	0.20	0.20	0.35
Pb	<LQ	0.17	0.31	0.22	0.16	0.14	0.14	0.43	0.19	0.27	0.46	0.85	<LQ	0.4	0.27	0.20	0.24	0.17	0.28	1.39	0.82	0.89	0.95	0.29	0.46	0.18	0.92
Hg	0.050	0.046	0.053	0.040	0.040	0.044	0.044	0.049	0.058	0.047	0.049	0.040	0.060	0.051	0.045	0.049	0.040	0.045	0.110	0.050	0.051	0.048	0.050	0.050	0.050	0.050	0.047
Hexachlorobenzene	0.4	0.3	0.3	0.3	0.4	0.5	0.2	0.2	0.3	0.4	0.3	0.9	0.2	0.1	0.2	0.2	0.3	0.2	40.1	0.3	0.1	0.2	0.2	0.6	0.2	0.6	0.5
Lindane	0.3	0.1	0.2	0.1	0.1	<LQ	<LQ	<LQ	0.4	<LQ	0.1	0.1	0.3	0.4	0.4	0.1	0.4	0.1	7.8	0.4	<LQ	0.4	1.4	<LQ	0.6	0.1	0.2
2, 4' DDE	0.1	0.2	<LQ	0.1	0.1	0.1	<LQ	<LQ	0.2	0.0	0.2	1.7	0.3	1.1	1.5	0.1	0.6	0.3	10.6	0.1	0.1	0.4	2.1	0.9	1.0	0.1	0.7
4, 4' DDE+Dieldrine	2.4	2.9	2.6	2.5	3.2	2.3	2.4	1.9	2.3	2.3	3.9	3.4	4.2	4.2	3.3	3.1	3.6	3.5	37.0	3.9	3.9	6.9	5.5	5.1	3.4	10.4	62.9
4, 4' DDD	2.0	1.9	1.9	1.9	1.9	2.0	2.3	1.6	2.4	2.1	3.6	3.7	1.4	3.5	2.3	3.0	1.8	3.3	44.6	3.4	2.9	4.3	6.3	5.2	3.3	5.9	24.3
2, 4' DDT	1.0	1.0	1.0	1.0	1.1	0.8	0.9	0.6	0.8	0.7	0.9	1.3	2.2	1.3	3.1	2.9	2.3	2.6	59.2	2.3	2.3	2.4	2.3	1.9	1.5	1.2	2.8
4, 4' DDT	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	1.2	1.3	1.7	1.9	1.7	1.7	48.4	2.8	2.3	2.1	2.9	1.4	1.0	<LQ	12.5
Anthracene	0.3	0.2	0.7	0.2	0.4	0.2	0.3	0.2	0.2	0.3	0.2	1.7	0.1	0.2	0.5	1.0	0.2	0.3	0.1	0.9	0.2	0.7	3.7	9.1	0.4	0.3	1.2
Fluoranthene	0.9	0.7	1.4	1.7	1.6	1.0	0.8	1.2	0.2	1.0	1.7	7.3	0.7	2.0	3.4	2.3	3.4	2.9	1.5	6.5	2.3	4.8	33.7	24.2	4.3	2.3	9.8
Benzo(b,k,j)fluoranthene	0.4	0.6	1.0	1.2	1.7	<LQ	0.6	1.4	0.6	1.6	1.5	5.6	0.8	1.7	3.2	2.1	2.8	2.0	1.0	4.7	3.2	3.7	19.4	7.8	3.1	1.9	8.7
Benzo(a)pyrene	<LQ	<LQ	<LQ	0.5	0.2	<LQ	<LQ	0.5	<LQ	<LQ	0.3	0.6	0.1	1.1	1.0	0.9	1.1	0.7	0.2	1.2	1.1	1.2	3.0	3.3	0.3	0.6	2.8
Indeno(1,2,3-cd)pyrene	<LQ	<LQ	<LQ	0.5	0.4	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ	1.4	<LQ	0.5	0.9	0.9	1.0	0.7	0.2	0.9	1.3	1.1	4.8	1.7	0.7	0.6	1.8
Benzo(g,h,i)perylene	<LQ	<LQ	<LQ	0.3	0.4	<LQ	<LQ	0.6	<LQ	<LQ	<LQ	1.6	<LQ	0.5	0.9	0.6	0.7	0.6	0.1	0.9	1.0	1.1	3.8	2.2	0.9	0.9	2.1
PCB 50+28	2.0	1.6	1.6	1.5	3.8	1.8	0.6	0.3	1.0	1.6	0.6	5.9	1.2	2.2	2.1	1.1	2.9	1.8	13.2	1.2	0.7	1.5	4.7	3.2	5.3	2.6	2.3
PCB 52	3.9	2.6	3.5	3.5	4.2	2.7	2.5	2.7	2.7	3.9	2.4	8.6	4.1	7.7	9.8	2.2	4.3	3.8	33.8	3.2	1.9	2.7	8.3	4.6	9.4	3.9	5.6
PCB 101	3.9	4.7	3.6	3.8	3.9	2.3	2.9	1.9	2.6	3.6	3.3	9.3	3.7	9.8	13.5	2.7	4.0	3.7	24.5	5.0	3.6	7.3	14.9	7.6	8.7	4.8	4.8
PCB 118	2.9	3.4	2.7	3.5	2.7	1.4	1.2	nd	1.0	2.7	2.8	13.5	3.7	11.0	16.3	3.9	4.0	3.8	20.7	1.8	2.0	5.7	8.7	3.6	7.1	2.9	4.0
PCB 153	6.8	8.4	8.2	8.9	8.0	4.6	5.4	4.1	4.9	6.9	7.5	10.6	7.6	16.7	16.5	6.5	7.4	6.8	50.8	12.1	5.7	30.8	36.6	16.7	13.7	16.7	7.6
PCB 138	5.3	6.1	6.6	7.4	6.6	3.4	4.1	3.3	3.4	4.9	5.8	10.6	6.0	14.0	16.6	5.3	6.1	5.8	45.5	9.9	5.1	23.5	31.8	12.9	12.0	10.8	6.5
PCB 180	1.6	1.6	2.3	2.6	2.5	2.0	1.9	1.7	2.0	2.2	2.8	2.4	1.6	3.8	4.1	1.8	1.4	1.3	16.6	3.0	1.4	9.1	14.2	4.9	3.8	3.5	2.1
PBDE 99	1.3	1.9	1.0	1.1	1.8	0.9	1.0	0.5	1.0	0.7	1.7	1.4	0.8	1.4	1.4	0.6	0.6	0.9	1.5	1.3	0.5	0.6	3.2	1.7	2.7	1.2	2.2

Les cases en rouge signalent des concentrations mesurées dans les gammars strictement supérieures aux BBAC (les valeurs sont données en $\mu\text{g.g}^{-1}$ ps pour les métaux et en ng.g^{-1} ps pour les organiques). Pour la classification détaillée des sites, se reporter au paragraphe 2.2.

5.5.1. Discussion sur les métaux

Pour les métaux, la classification préliminaire montre que seulement 10 sites parmi les 27 ne présentent pas de contamination métallique biodisponible (i.e. aucune valeur excédant les BBAC). La plupart des sites montrent une contamination en Cd et en Pb ; le site 18 présente un profil de contamination spécifique au Hg et au Ni.

Plusieurs différences peuvent être observées avec le classement des experts de l'AE RM&C. En effet, les sites 1 à 12 sont dépourvus de toute pression anthropique (paragraphe 2.2.). Ces différences pourraient être liées à :

- une source de contamination anthropique non pré-identifié par les experts ;
- des conditions élevées de biodisponibilité (teneur en carbone organique dissous [COD] et calcium faibles et pH élevé) sur ces sites ;
- la présence d'un fond géochimique sur les sites d'étude. Si les informations disponibles actuellement sont trop limitées pour pouvoir tirer une conclusion définitive, la base cartographique du programme d'étude des fonds géochimiques FOREGS indique que certains sites d'étude pourraient être situés sur des (ou proches de) zones présentant un fond géochimique pour le Zn et le Pb (http://www.gsf.fi/publ/foregsatlas/maps_table.php).

5.5.2. Discussion sur les substances organiques

Pour les contaminants organiques, le Tableau 7 montre que 15 sites (sites 1 à 11, 13, 16, 18 et 26) présentent moins de 5 substances dont les concentrations dépassent les BBAC. Pour ces 15 sites - à l'exception des sites 16, 18 et 26 - ces résultats sont en accord avec l'expertise de l'AE RM&C : ces sites ne présentent pas de contamination biodisponible (ou bien une contamination très modérée) pour les substances étudiées ici.

Au contraire, 7 autres sites (12, 14, 19, 22, 23, 24 et 27) présentent des concentrations mesurées dans les gammars supérieures aux valeurs seuils pour plusieurs substances organiques et affichent des profils distincts de contamination. Par exemple, les sites 12, 23, 24 et 27 montrent une contamination claire aux HAP et aux PCB, et le site 19 affiche une contamination spécifique en pesticides et en PCB.

Si en règle générale, on observe une claire distinction entre les sites impactés par une pression anthropique et les sites non impactés, on remarque également des différences entre la classification par les BBAC et celle des experts de l'agence de l'eau. Ainsi le site 12, affiché comme non contaminé présente une contamination aux HAP et aux PCB non pré-identifiée. Pour les sites 13, 16, et 18, on n'observe à l'inverse qu'une seule BBAC dépassée alors que ces sites sont classés comme impactés selon la classification de l'agence de l'eau. Il n'est à ce stade pas possible de conclure de manière définitive sur ces différences mais elles peuvent être liées à l'une des 3 possibilités suivantes :

- 1) les conclusions obtenues auprès d'experts ne prennent pas en compte les paramètres physico-chimiques des sites d'étude, alors qu'ils jouent un rôle clé rôle dans la biodisponibilité des polluants ;
- 2) les niveaux de contamination ont été déterminés dans les organismes encagés sur une durée d'exposition d'une semaine, et par conséquent n'intègrent pas la variabilité de la contamination qui peut exister dans les systèmes aquatiques sur une durée plus élevée ;
- 3) les sites peuvent être contaminés par d'autres substances organiques que celles étudiées ici.

6. Intérêt de la biosurveillance active sur *Gammarus fossarum* dans le cadre de la DCE

6.1. Suivi des tendances de la contamination

6.1.1. Suivi des tendances spatiales

Les résultats de ce rapport suggèrent que le gammare est un organisme pertinent pour la surveillance des substances prioritaires et candidates de la DCE pour les eaux continentales. Pour le suivi des tendances de la contamination, l'approche active proposée ici permet une totale liberté du choix des sites, et également un suivi robuste, reproductible et comparable dans le temps des tendances de la contamination car elle permet :

- 1) l'utilisation d'organismes homogènes en termes d'espèce, de taille et de sexe ;
- 2) un contrôle des facteurs biotiques ;
- 3) un temps d'exposition connu et identique pour tous les organismes échantillonnés ;
- 4) un protocole identique quel que soit le site d'étude.

La définition de « valeurs seuil de contamination biodisponible » (BBAC), rendue possible par l'utilisation d'une méthode permettant le contrôle des facteurs biotiques, permet une classification fine des sites d'études – réalisable à large échelle – en fonction des valeurs de contamination biodisponible mesurées, ainsi que l'identification des contaminants problématiques.

Afin de valider les valeurs seuil sur des hydrosystèmes présentant des caractéristiques différentes et soumis à d'autres pressions anthropiques, l'outil gammare va être déployé en 2012-2013 sur le plus grand nombre de sites possibles au niveau national. Un tel effort étant nécessaire afin d'établir si ces BBAC peuvent être appliquées à large échelle.

6.1.2. Suivi des tendances temporelles

L'encagement de gammare peut également être appliqué à différents intervalles de temps, afin de suivre l'évolution des niveaux de contamination et de vérifier la non-dégradation de l'état des masses d'eau dans le temps.

6.2. Vérification de la conformité aux NQE

Pour le respect des NQE, la directive fille NQE (CE, 2008) et le TGD-EQS (CE, 2011) offrent la possibilité de mesurer les concentrations en contaminants dans le biote ou dans l'eau pour évaluer la qualité chimique des masses d'eau.

D'une manière générale, la comparaison aux NQE implique que les niveaux de contaminants dans le biote aient atteint le "pseudo-équilibre", où l'absorption et la dépuración sont considérées comme identiques. A l'heure actuelle, il n'est pas possible de dire si 7 jours d'exposition dans les conditions proposées sont suffisants pour que cet état soit atteint chez *G. fossarum*. Dans cette optique, des travaux supplémentaires seront menés pour déterminer le temps optimal d'exposition. Il s'agira notamment, dans un premier temps, de réaliser des cinétiques d'accumulation sur nombre limité de substances afin de déterminer la durée d'exposition minimale pour atteindre un état de pseudo-équilibre.

Concernant la vérification de la conformité aux NQE_{eau}, un des prochains axes de travail sera d'évaluer la pertinence de modèles de transfert : équilibre de partage ou modèles biodynamiques adéquats (Lebrun *et al.*, 2011 ; Bouchoucha et Andral, 2010 ; Pellet *et al.*, 2009) pour revenir à la fraction métallique dissoute.

Pour la vérification de la conformité aux NQE biote, le protocole d'encagement étant calé sur le gammare, il ne sera pas possible de comparer directement les valeurs mesurées dans les gammares encagés aux NQE biote qui ont été déterminées pour le poisson (objectif de protection de la santé humaine). Il faudra donc évaluer la possibilité d'utiliser des modèles de transfert trophique pour revenir à ces valeurs de NQE biote.

Références

AE (1998). Les bryophytes aquatiques comme outil de surveillance de la contamination des eaux courantes par les micropolluants métalliques. Concept, méthodologie et interprétation des données. Étude inter-agences n° 55. 145 p.

Amyot, M., Pinel-Alloul, B., Campbell, P.G.C., Désy, J.C. (1996) Total metal burdens in the freshwater amphipod *Gammarus fasciatus*: Contribution of various body parts and influence of gut contents. *Freshwater Biology* 35(2), 363-373.

Andral, B., Stanisiere, J.Y., Sauzade, D., Damier, E., Thebault, H., Galgani, F., Boissery, P. (2004) Monitoring chemical contamination levels in the Mediterranean based on the use of mussel caging. *Marine Pollution Bulletin* 49(9-10), 704-712.

Baranyi, J., Roberts, T.A., McClure, P. (1993) A non-autonomous differential equation to model bacterial growth. *Food Microbiology* 10 (1) 43-59.

Benedicto, J., Andral, B., Martínez-Gómez, C., Guitart, C., Deudero, S., Cento, A., Scarpato, A., Caixach, J., Benbrahim, S., Chouba, L., Boulahdid, M. and Galgani, F. (2011) A large scale survey of trace metal levels in coastal waters of the Western Mediterranean basin using caged mussels. *Journal of Environmental Monitoring* 13(5), 1495-1505.

Bervoets, L., Voets, J., Covaci, A., Chu, S., Qadah, D., Smolders, R., Schepens, P. and Blust, R. (2005) Use of transplanted zebra mussels (*Dreissena polymorpha*) to assess the bioavailability of microcontaminants in flemish surface waters. *Environmental Science and Technology* 39(6), 1492-1505.

Besse, J.P., Geffard, O., Coquery, M. (2012). Relevance and applicability of active biomonitoring in continental waters under the Water Framework Directive. *TrAC - Trends in Analytical Chemistry* 36, 113-127.

Besse, J.-P., Coquery, M., Lopes, C., Chaumot, A., Budzinski, H., Labadie, P., Geffard, O. (2013). Caged *Gammarus fossarum* (Crustacea) as a robust tool for the characterization of bioavailable contamination levels in continental waters: Towards the determination of threshold values. *Water Research*. 47 (2) 650-660.

Besse, J.P., Geffard, O., Coquery, M. (2011). Développement d'une méthodologie pour l'amélioration du suivi chimique des eaux continentales - Etat de l'art sur les approches de biosurveillance et application dans le cadre de la DCE, Cemagref-Irstea, 100 p.

Blais, J.M., Wilhelm, F., Kidd, K.A., Muir, D.C.G., Donald, D.B. and Schindler, D.W. (2003) Concentrations of organochlorine pesticides and polychlorinated biphenyls in amphipods (*Gammarus lacustris*) along an elevation gradient in mountain lakes of western Canada. *Environmental Toxicology and Chemistry* 22(11), 2605-2613.

Borgå, K., Gulliksen, B., Gabrielsen, G.W. and Skaare, J.U. (2002) Size-related bioaccumulation and between-year variation of organochlorines in ice-associated amphipods from the Arctic Ocean. *Chemosphere* 46(9-10), 1383-1392.

Bouchouca, M., Andral, B. (2010) Analyse statistique des données du réseau RINBIO : détermination d'une réponse universelle de capteur. Convention AERM&C / Ifremer n° 2009-097. RST.DOP/LER-PAC/10-14.

Boyden, C.R. (1974) Trace element content and body size in molluscs. *Nature* 251(5473), 311-314.

Bruner, K.A., Fisher, S.W., Landrum, P.F. (1994) The role of the zebra mussel, *Dreissena polymorpha*, on contaminant cycling: I. The effect of body size and lipid content on the bioconcentration of PCBs and PAHs. *Journal of Great Lakes Research* 20(4), 725-734.

Cailleaud, K., Forget-Leray, J., Souissi, S., Hilde, D., LeMenach, K., Budzinski, H. (2007) Seasonal variations of hydrophobic organic contaminant concentrations in the water-column of the Seine Estuary and their transfer to a planktonic species *Eurytemora affinis* (Calanöida, copepoda). Part 1: PCBs and PAHs. *Chemosphere* 70, 270-280.

C.E. (2008). Directive 2008/105/CE du parlement Européen et du conseil du 16 décembre 2008 établissant des normes de qualité environnementale dans le domaine de l'eau. *Journal officiel de l'Union Européenne* L348/85.

C.E. (2010). CMA. Guidance on Surface Water Chemical Monitoring under the Water Framework Directive. Guidance Document no 25. Technical Report 210.3991. Common Implementation Strategy for the Water Framework Directive, EC, Brussels, Belgium. 82p.

C.E. (2011) TGD-EQS - Common implementation strategy for the Water Framework Directive (2000/60/EC). Technical guidance for deriving environmental quality standards. Guidance document N°27. European Commission.

C.E. (2012). Proposal for a revised directive of the European Parliament and of the Council on Priority Substances in the field of water quality. Brussels, Belgium. 6p.

Conti, M.E., Iacobucci, M., Cecchetti, G. and Alimonti, A. (2008) Influence of weight on the content of trace metals in tissues of *Mytilus galloprovincialis* (Lamarck, 1819): A forecast model. *Environmental Monitoring and Assessment* 141(1-3), 27-34.

Coulaud, R., Geffard, O., Xuereb, B., Lacaze, E., Quéau, H., Garric, J., Charles, S., Chaumot, A. (2011). In situ feeding assay with *G. fossarum*: Modelling the influence of confounding factors to improve water quality biomonitoring. *Water Research* 45, 6417-6429.

Dedourge-Geffard, O., Palais, F., Biagiante-Risbourg, S., Geffard, O., Geffard, A. (2009) Effects of metals on feeding rate and digestive enzymes in *Gammarus fossarum* : an in situ experiment. *Chemosphere* 11, 1569-1576.

Fisher, S.W., Gossiaux, D.C., Bruner, K.A., Landrum, P.F. (1993) Zebra mussels: biology, Impacts and control, pp. 465-490, Lewis, Boca Raton, FL, USA.

Geffard, A., Quéau, H., Dedourge, O., Biagiante-Risbourg, S., Geffard, O. (2007) Influence of biotic and abiotic factors on metallothionein level in *Gammarus pulex*. *Comparative Biochemistry and Physiology - C Toxicology and Pharmacology* 145(4), 632-640.

Goldberg, E.D. (1975) The mussel watch. A first step in global marine monitoring. *Marine Pollution Bulletin* 6(7), 111.

Gossiaux, D.C., Landrum, P.F. and Fisher, S.W. (1996) Effect of temperature on the accumulation kinetics of PAHs and PCBs in the zebra mussel, *Dreissena polymorpha*. *Journal of Great Lakes Research* 22(2), 379-388.

Haukås, M., Berger, U., Hop, H., Gulliksen, B. and Gabrielsen, G.W. (2007) Bioaccumulation of per- and polyfluorinated alkyl substances (PFAS) in selected species from the Barents Sea food web. *Environmental Pollution* 148(1), 360-371.

Heijerick, D.G., Janssen, C.R., De Coen, W.M. (2003). The combined effects of hardness, pH, and dissolved organic carbon on the chronic toxicity of Zn to *D. magna*: Development of a surface responses model. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 44, 210-217.

ICES (2004). OSPAR/ICES Workshop on the evaluation and update of background reference concentrations (B/RCS) and ecotoxicological assessment criteria (EACs) and how these assessment tools should be used in assessing contaminants in water, sediment and biota. 9 – 13 February, La Hague. Final report. Available at www.ospar.org.

Khan, F.R., Irving, J.R., Bury, N.R., Hogstrand, C. (2011) Differential tolerance of two *Gammarus pulex* populations transplanted from different metallogenic regions to a polymetal gradient. *Aquatic Toxicology* 102(1-2), 95-103.

Kwan, K.H.M., Chan, H.M., de Lafontaine, Y. (2003) Metal contamination in zebra mussels (*Dreissena polymorpha*) along the St. Lawrence River. *Environmental Monitoring and Assessment* 88(1-3), 193-219.

Lacaze, E., Geffard, O., Goyet, D., Bony, S., Devaux, A. (2011a). Linking genotoxic responses in *Gammarus fossarum* germ cells with reproduction impairment, using the Comet assay. *Environmental Research* 111 (5) , 626-634.

Lacaze, E., Devaux, A., Mons, R., Bony S., Garric, J., Geffard, A., Geffard, O. (2011b) DNA damage in caged *Gammarus fossarum* amphipods: A tool for freshwater genotoxicity assessment. *Environmental Pollution* 159 (6),1682-1691.

Lebrun, J.D., Perret, M., Uher, E., Tusseau-Vuillemin, MH., Gourlay-Francé, C. (2011) Waterborne nickel bioaccumulation in *Gammarus pulex* : Comparison of mechanistic models and influence of water cationic composition. *Aquatic Toxicology* 104, 161-167.

Lopes, C., Garric, J., Coquery, M., Ferrari, B., Chaumot, A., Geffard, O. (2012). Développement d'une batterie multi-spécifique pour l'évaluation écotoxicologique de la qualité chimique du milieu. Rapport final, Onema action 22- Irstea.

Ma, H., Kim, S.D., Cha, D.K., Allen, H.E. (1999). Effect of kinetics of complexation by humic acid on toxicity of copper to *Ceriodaphnia dubia*. *Environmental Toxicology and Chemistry* 18 (5), 828-837.

Macneil, C., Dick, J.T.A., Elwood, R.W. (1997). The trophic ecology of freshwater *Gammarus* spp. (Crustacea: Amphipoda): Problems and perspectives concerning the functional feeding group concept. *Biological Reviews of the Cambridge Philosophical Society* 72 (3), 349-364.

Mersch, J., Wagner, P. and Pihan, J.C. (1996) Copper in indigenous and transplanted zebra mussels in relation to changing water concentrations and body weight. *Environmental Toxicology and Chemistry* 15(6), 886-893.

Minier, C., Abarnou, A., Jaouen-Madoulet, A., Le Guellec, A.M., Tutundjian, R., Bocquené, G., Leboulenger, F. (2006) A pollution-monitoring pilot study involving contaminant and biomarker measurements in the Seine Estuary, France, using zebra mussels (*Dreissena polymorpha*). *Environmental Toxicology and Chemistry* 25(1), 112-119.

Mubiana, V.K., Vercauteren, K. and Blust, R. (2006) The influence of body size, condition index and tidal exposure on the variability in metal bioaccumulation in *Mytilus edulis*. *Environmental Pollution* 144(1), 272-279.

Pellet, B., Geffard, O., Lacour, C., Kermaal, T., Gourlay-Francé, C., Tusseau-Vuillemin, M.H. (2009) A model predicting waterborne cadmium bioaccumulation in *gammarus pulex*: the effects of dissolved organic ligands, calcium, and temperature. *Environmental Toxicology and Chemistry* 28(11), 2434-2442.

Peters, A., Lofts, S., Merrington, G., Brown, B., Stubblefield, W., Harlow, K. (2011) Development of biotic ligand models for chronic manganese toxicity to fish, invertebrates, and algae. *Environmental Toxicology and Chemistry* 30(11), 2407-2415.

Phillips, D.J.H. (1986) Quantitative aquatic biological indicators: their use to monitor trace metal and organochlorine pollution. Elsevier Applied Science, London.

Rainbow, P.S. (2002) Trace metal concentrations in aquatic invertebrates: Why and so what? *Environmental Pollution* 120(3), 497-507.

Rainbow, P.S. (1995) Biomonitoring of heavy metal availability in the marine environment. *Marine Pollution Bulletin* 31(4-12), 183-192.

Schaller, J., Dharamshi, J., Dudel, E.G. (2011) Enhanced metal and metalloid concentrations in the gut system comparing to remaining tissues of *Gammarus pulex* L. *Chemosphere* 83 (4), 627-631.

Sudaryanto, A., Takahashi, S., Monirith, I., Ismail, A., Muchtar, M., Zheng, J., Richardson, B.J., Subramanian, A., Prudente, M., Hue, N.D. and Tanabe, S. (2002) Asia-Pacific mussel watch: Monitoring of butyltin contamination in coastal waters of Asian developing countries. *Environmental Toxicology and Chemistry* 21(10), 2119-2130.

Taylor, H.H., Anstiss, J.M. (1999) Copper and haemocyanin dynamics in aquatic invertebrates. *Marine and Freshwater Research* 50 (8), 907-931.

Thompson, S., Budzinski, H. (2000) Determination of polychlorinated biphenyls and chlorinated pesticides in environmental biological samples using focused microwave-assisted extraction. *International Journal of Environmental Analytical Chemistry* 76 (1), pp. 49-60.

Welton, J.S. (1979) Life-history and production of the amphipod *Gammarus pulex* in a Dorset chalk stream. *Freshwater Biology* 9, 12.

Wijnhoven, S., Van Riel, M.C., Van Der Velde, G. (2003). Exotic and indigenous freshwater gammarid species: Physiological tolerance to water temperature in relation to ionic content of the water. *Aquatic Ecology* 37 (2), 151-158.

Wright, D.A. and Frain, J.W. (1981) The effects of calcium on cadmium toxicity in the freshwater amphipod, *Gammarus pulex* (L.). *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 10, 321-328.

Xuereb, B., Chaumot, A., Mons, R., Garric, J., Geffard, O. (2009). Acetylcholinesterase activity in *Gammarus fossarum* (Crustacea Amphipoda). Intrinsic variability, reference levels, and a reliable tool for field surveys. *Aquatic Toxicology* 93 (4), 225-233.

Annexes

ANNEXE A

Tableau 7. Information détaillée (Localisation, coordonnées GPS et caractéristiques physico-chimiques) sur les sites "non impactés" sélectionnés dans cette étude.

Information sur les sites				Caractéristiques physico-chimiques				
Site (rivière / agglomération)	Coordonnées GPS		Code	Température (°C)	Oxygène dissous (%)	pH	Conductivité ($\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$)	Dureté ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de CaCO_3)
	E	N						
Doux <i>Labatie d'Andaure</i>	04°29 ' 41.5"	45°01 ' 23.6"	1	11.2 (min) 16.1 (Max)	98 100	7.1 7.2	64 65	14.2 15.3
Cance <i>Saint Julien Vocance</i>	04°30 ' 11.9"	45°10 ' 39.5"	2	9.8 15.2	100 100	7.0 6.6	78 81	16.1 17.2
Gier <i>La Valla en Gier</i>	04°30 ' 36.4"	45°26 ' 36.3"	3	9.9 14.2	100 100	7.2 6.5	72 72	16.5 16.9
Ain <i>Saint Maurice de Gourdans</i>	05°11 ' 20.0"	45°48 ' 27.5"	4	12.2 16.1	99 100	8.0 8.3	394 382	173.4 164.9
Albarine <i>Chaley</i>	05°32 ' 31.8"	45°57 ' 22.8"	5	9.7 12.5	100 100	8.2 8.3	440 430	208.3 206.2
Mandorne <i>Oncieux</i>	05°28 ' 23.7"	45°58 ' 36.1"	6	8.7 13.0	100 99	8.2 8.3	380 373	157.6 157.5
Vareze <i>Cours et Buis</i>	04°58 ' 52.0"	45°26 ' 15.3"	7	10.4 15.3	100 100	7.9 7.9	411 416	180.9 168.1
Galaveyson <i>Saint Clair sur Galaure</i>	05°07 ' 50.3"	45°15 ' 26.5"	8	10.2 14.7	100 100	7.8 7.5	292 310	163.7 173.1
Drevenne <i>Rovon</i>	05°27 ' 55.5"	45°12 ' 11.6"	9	10.6 14.7	100 100	8.2 8.3	323 323	175.1 176.6
Guiers Mort <i>Saint Laurent du Pont</i>	05°45 ' 17.4"	45°21 ' 42.2"	10	8.6 10.7	100 100	8.4 8.5	300 302	172.3 175.7
Ardières <i>Les Ardillats</i>	04°31 ' 15.9"	46°11 ' 11.8"	11	8.9 14.5	100 100	7.9 8.2	135 126	43.7 39.7
Ergues <i>Poule les Echarmeaux</i>	04°26 ' 45.5"	46°08 ' 21.2"	12	8.0 14.7	100 100	7.7 7.8	150 140	55.0 48.6

Pour les caractéristiques physico-chimiques, 2 valeurs sont données par site. A l'exception de la température, ces 2 valeurs correspondent à des mesures faites au début et au terme de l'expérimentation (à 0 et 7 jours). Concernant la température, pour laquelle des mesures ont été faites tout au long de l'expérimentation (toutes les heures sur les 7 jours), seules les valeurs minimale et maximale relevées sont indiquées ici.

Tableau 8. Information détaillée (Localisation, coordonnées GPS, type et intensité de pression, et caractéristiques physico-chimiques) sur les sites "impactés" sélectionnés dans cette étude.

Information sur les sites			Type de pression				Caractéristiques physico-chimiques				
Site (rivière / agglomération)	Coordonnées GPS	Code	Pression	Métaux	Pesticides	Autres contaminants organiques	Température (°C)	Oxygène dissous (%)	pH	Conductivité ($\mu\text{S.cm}^{-1}$)	Dureté (mg.L^{-1} CaCO_3)
Doux Saint Jean de Muzols	04°49' 39.5" E 45°04' 40.2" N	13	Industriel Agricole, Urbain				15.3 (min) 19.5 (Max)	100 100	7.2 7.1	123 127	34.9 38.9
Cance Sarras	04°47' 47.6" E 45°11' 30.9" N	14	Industriel Urbain				12.0 17.6	100 100	7.7 7.6	613 647	118.7 126.5
Albarine Saint Rambert	05°26' 01.8" E 45°56' 32.1" N	15	Industriel 1 Urbain 2				10.3 15.1	100 100	8.0 8.5	386 358	161.4 161
Veyle Lent	05°11' 48.4" E 46°06' 58.7" N	16	Agricole 3				11.1 14.1	100 98	8.0 7.8	473 476	231.1 244.4
Veyle Servas	05°10' 31.3" E 46°07' 37.9" N	17	Agricole 3				11.0 16.4	100 86	8.3 7.9	447 464	228.7 227.9
Ange Brion	05°33' 05.3" E 46°10' 12.3" N	18	Industriel 3 Urbain 2				9.8 15.8	100 89	8.3 7.9	602 653	200.4 289.6
Drac Fontaine	05°42' 04.3" E 45°11' 36.6" N	19	Industriel 3				13.1 16.9	100 100	7.9 7.9	317 398	130.5 164.6
Turdine Arbresle	04°36' 09.1" E 45°50' 15.5" N	20	Industriel 3 Urbain				10.0 17.0	100 100	8.4 8.2	868 840	174.1 165.6
Azergues Legny	04°34' 21.4" E 45°54' 24.6" N	21					11.5 15.4	100 100	8.1 8.1	307 293	133.2 133.2
Azergues Lucenay	04°43' 33.1" E 45°54' 41.5" N	22	Agricole 3 Industriel 2				13.3 18.2	100 100	8.1 8.1	664 710	256.2 268.5
Gier Givors	04°45' 42.3" E 45°35' 15.4" N	23	Urbain				11.8 19.2	100 100	7.2 7.6	574 377	204.0 143.5
Rhône Givors	04°47' 03.4" E 45°35' 36.4" N	24	Urbain Industriel				18.0 19.8	100 100	7.7 7.6	434 428	188.6 190.0
Bourbre Pont de Cheruy	05°10' 29.9" E 45°04' 00.3" N	25	Urbain 2 Industriel 2				n.a. n.a.	100 100	7.7 7.4	720 570	230.4 260.6
Saône Ile Barbe	04°49' 57.3" E 45°47' 49.4" N	26	Urbain Industriel				18.5 19.8	100 100	7.9 7.7	702 731	110.2 235.4
Ardières Saint Jean d'Ardières	04°44' 00.9" E 46°07' 18.4" N	27	Agricole 3 Industriel 2				12.7 15.6	100 100	8.2 8.9	295 270	n.a. 106.1

n.a. : non disponible

¹ : Les chiffres indiquent l'intensité d'impact de la pression : 3 = fort ; 2 = moyen ; 1 = faible.

² : Les cellules colorées indiquent le niveau d'impact sur le milieu : rouge =fort ; orange=intermédiaire ; jaune=moyen.

<http://www.rhone-mediterranee.eaufrance.fr/gestion/dce/documents-locaux.php>

Pour les caractéristiques physico-chimiques, 2 valeurs sont données par site. A l'exception de la température, ces 2 valeurs correspondent à des mesures faites au début et au terme de l'expérimentation (à 0 et 7 jours). Concernant la température, pour laquelle des mesures ont été faites tout au long de l'expérimentation (toutes les heures sur les 7 jours), seules les valeurs minimale et maximale relevées sont indiquées ici.

ANNEXE B.

Tableau 9. Relevé des températures mesurées sur les sites d'étude pour les 7 jours d'exposition. Les sites sont classés par température moyenne décroissante.

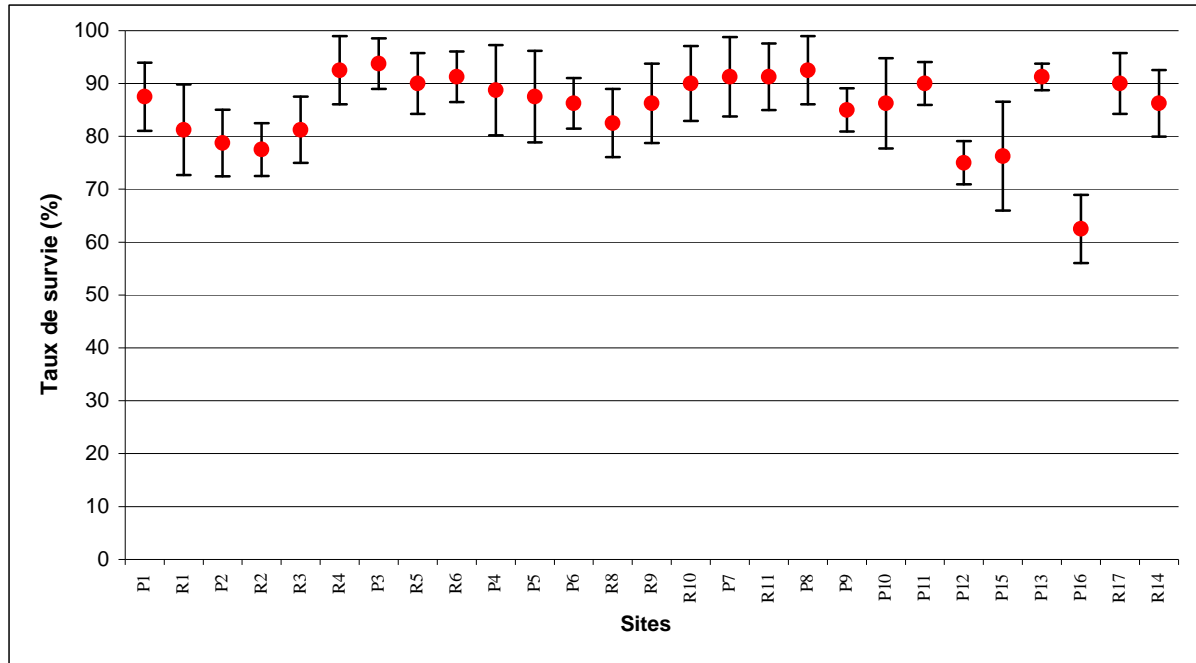
Site	Moyenne	Médiane	Minimum	Maximum	Δ (Max - Min)
Rhône à Givors	19.07	19.20	18.03	19.85	1.81
Saône à l'Île Barbe	18.83	18.76	18.49	19.82	1.33
Doux à Saint-Jean	17.09	17.05	15.33	19.51	4.17
Gier à Givors	16.14	16.75	11.76	19.18	7.42
Azergues à Lucenay	15.79	15.81	13.37	18.17	4.79
Drac à Fontaine	15.08	15.45	13.10	16.90	3.80
Cance à Sarras	14.80	14.87	11.98	17.63	5.65
Ardières à Saint-Jean	14.29	14.3	12.67	15.63	2.96
Ain à Saint-Maurice	14.02	14.03	12.16	16.06	3.91
Doux à Labatie	13.83	14.00	11.22	16.11	4.89
Veyle à Servas	13.83	13.88	11.05	16.44	5.38
Turdine à l'Arbresle	13.56	13.56	10.02	17.05	7.03
Azergues à Legny	13.24	12.90	11.53	15.41	3.88
Vareze à Cours et Buis	12.86	12.71	10.44	15.31	4.86
Drevenne à Rovon	12.85	12.78	10.64	14.66	4.02
Ange à Brion	12.72	12.85	9.84	15.77	5.93
Albarine à Saint-Rambert	12.71	12.73	10.36	15.11	4.75
Veyle à Lent	12.62	12.73	11.12	14.11	2.99
Galaveyson à Clair	12.48	12.38	10.25	14.74	4.49
Cance à Saint-Julien	12.39	12.48	9.83	15.25	5.41
Gier à la Valla	12.07	12.18	9.92	14.25	4.33
Ardières aux Ardillats	11.82	12.01	8.97	14.47	5.49
Ergues les Echarneaux	11.56	11.56	8.02	14.71	6.69
Albarine à Chaley	10.88	10.98	9.66	12.48	2.82
Mandorne à Oncieu	10.85	10.95	8.72	13.03	4.31
Guiers mort à Saint Laurent	9.67	9.65	8.59	10.7	2.11
Bourbre à Pont de Chérucy	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.

Rappel, les températures ont été mesurées toutes les heures pendant l'ensemble des 7 jours d'exposition.

n.d.: non disponible

ANNEXE C.

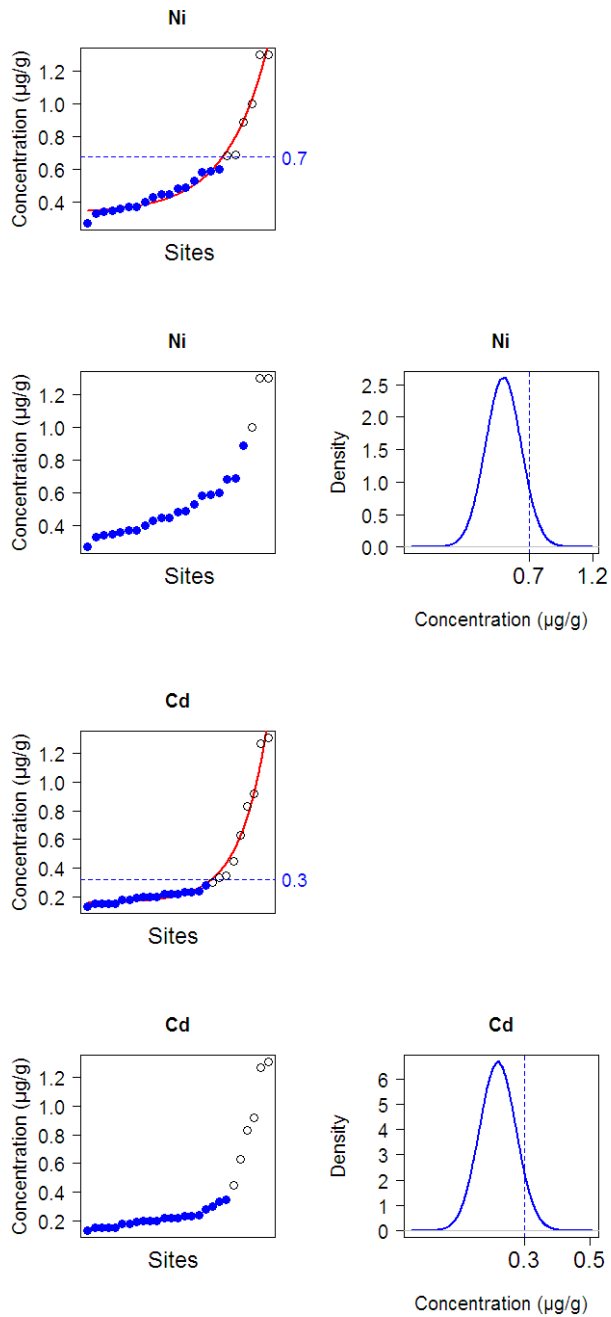
Figure 11. Taux de survie des gammares après 7 jours d'exposition sur l'ensemble des sites (n=27).

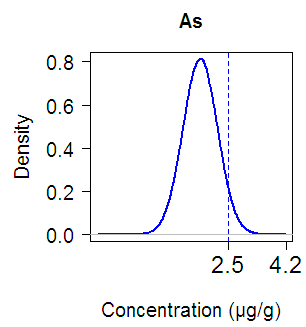
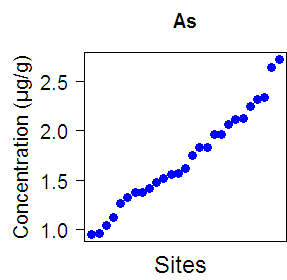
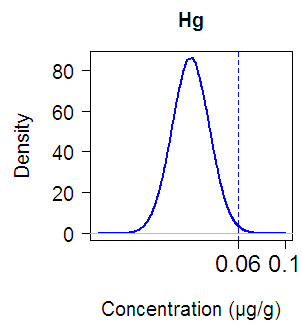
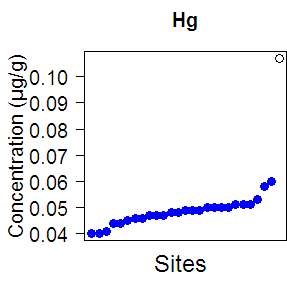
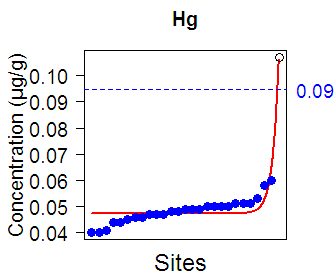
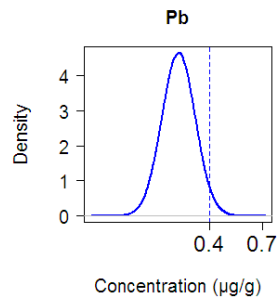
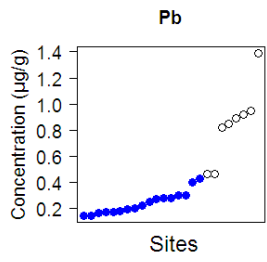
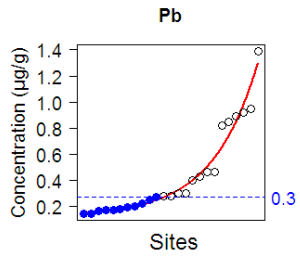


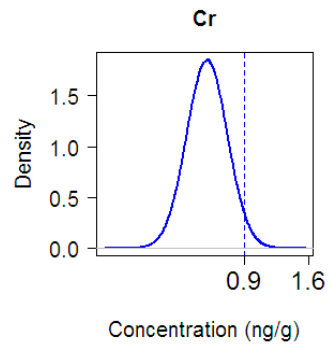
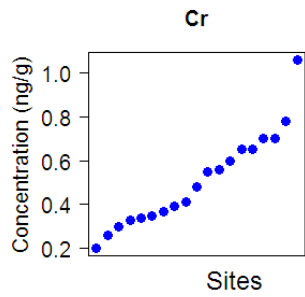
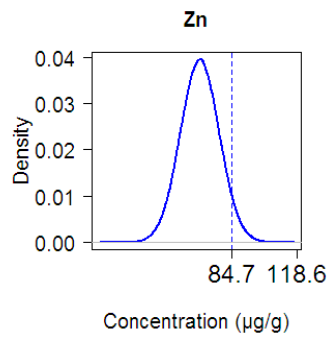
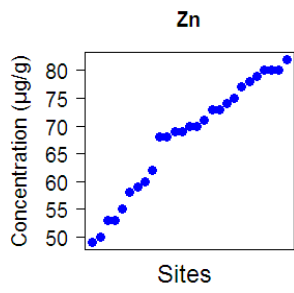
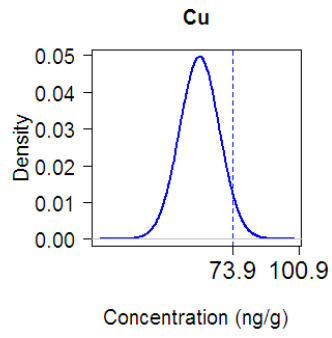
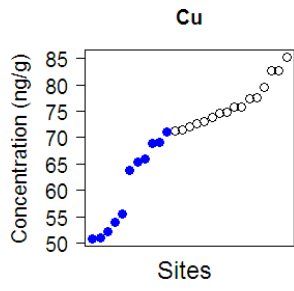
ANNEXE D.

Figure 12. Valeurs seuils déterminées pour les métaux et les substances organiques prioritaires sélectionnées dans cette étude. Les valeurs seuil sont données en $\mu\text{g/g}$ (poids sec) pour les métaux et en ng/g (poids sec) pour les substances organiques.

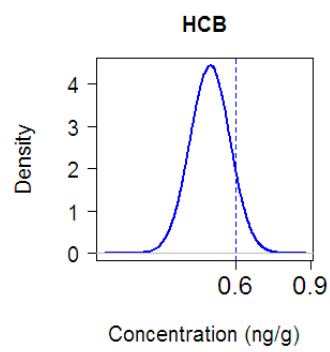
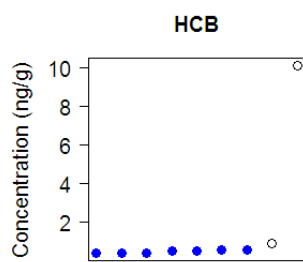
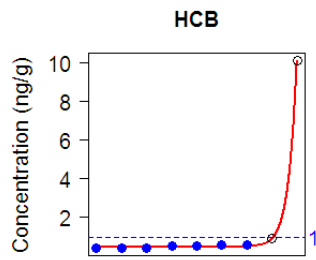
I. Métaux



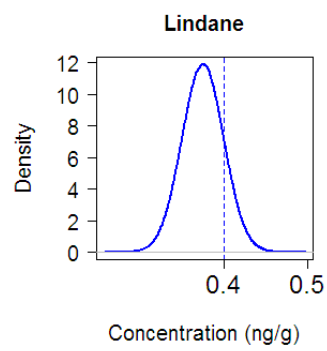
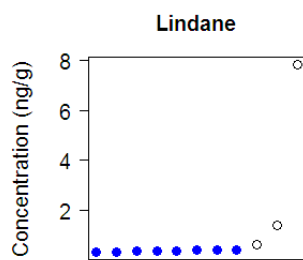
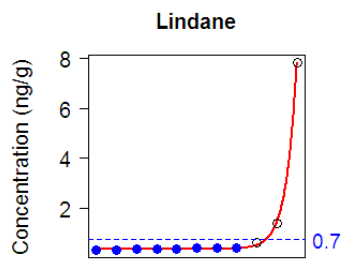


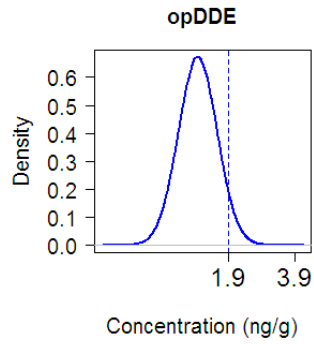
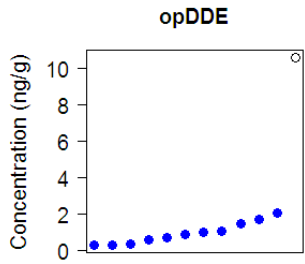
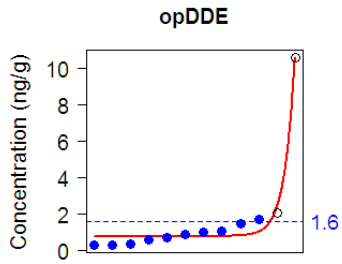


II. Pesticides organochlorés

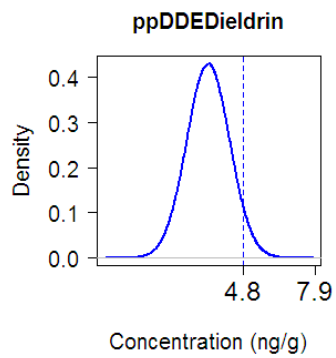
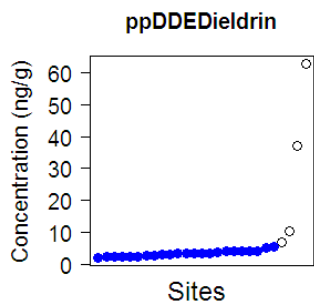
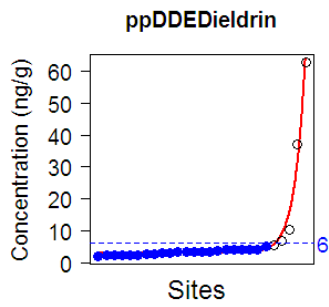


HCB : hexachlorobenzène

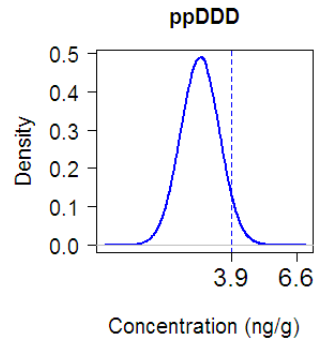
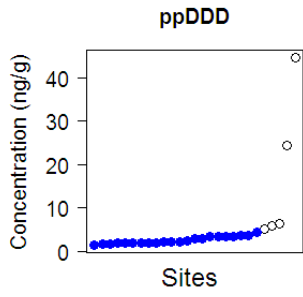
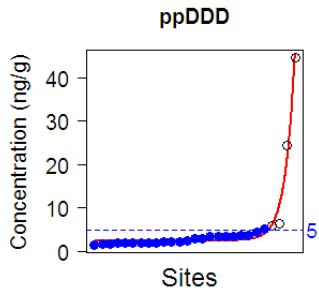




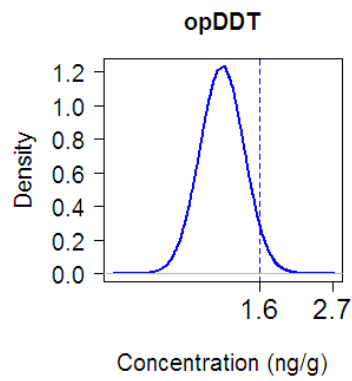
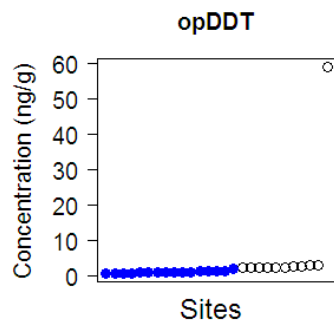
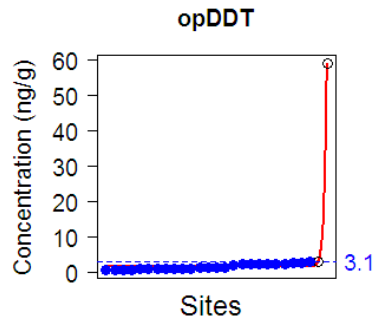
opDDE: 2,4'-DDE



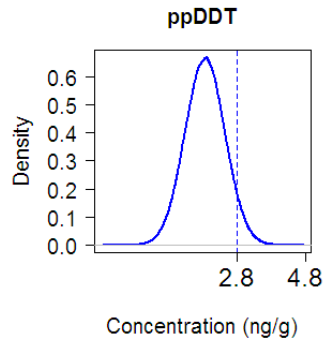
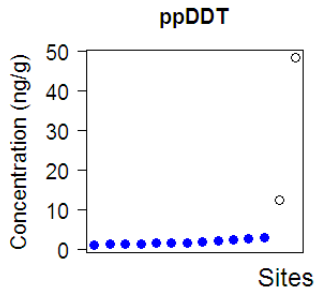
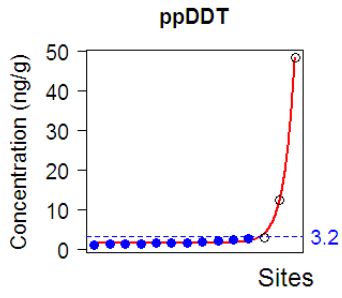
ppDDEdieldrin: 4,4'-DDE + dieldrine



ppDDD: 4,4'-DDD

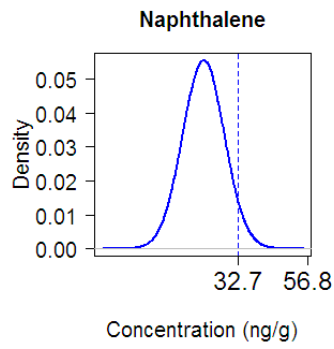
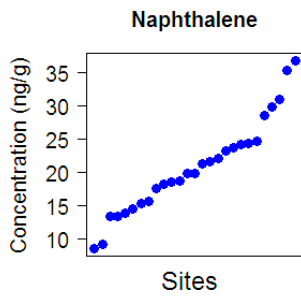


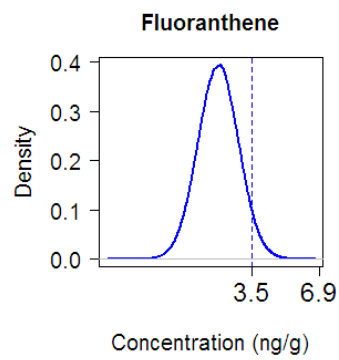
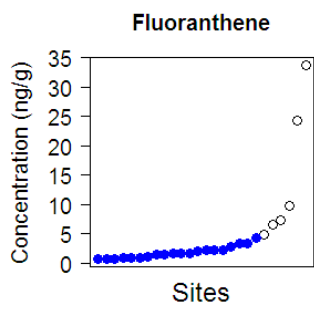
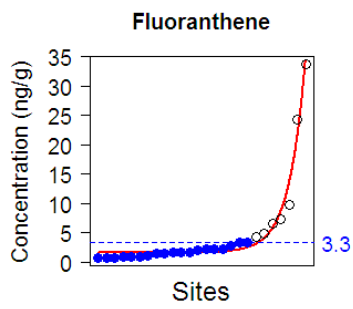
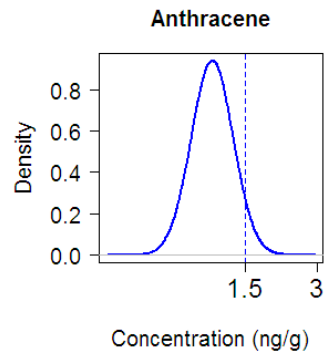
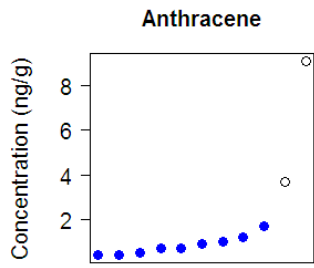
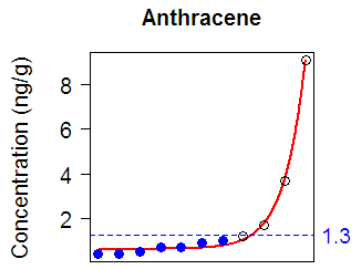
opDDT: 2,4'-DDT

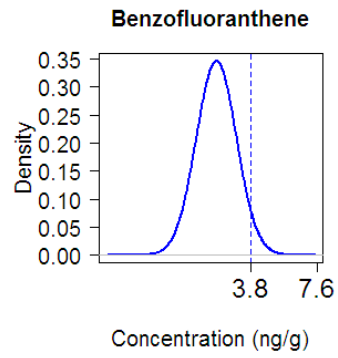
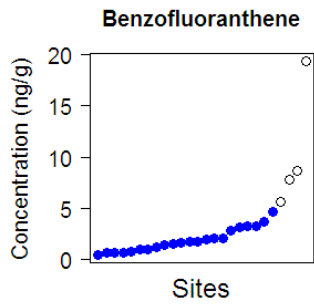
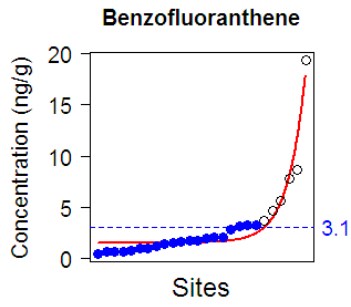


ppDDT: 4,4'-DDT

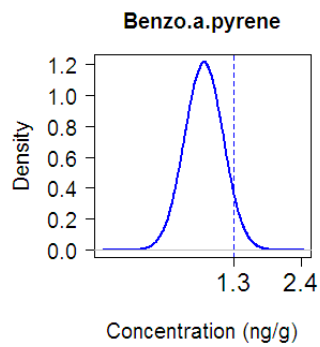
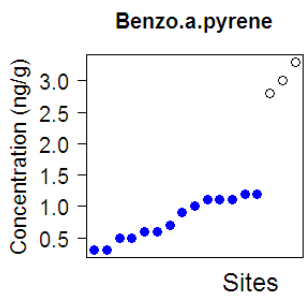
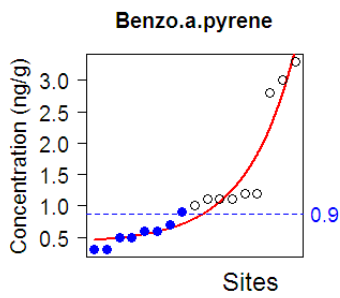
III. HAP

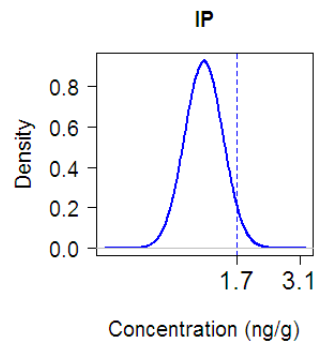
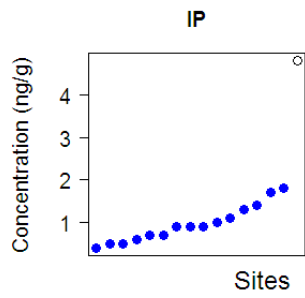
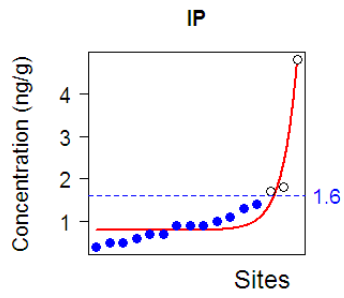




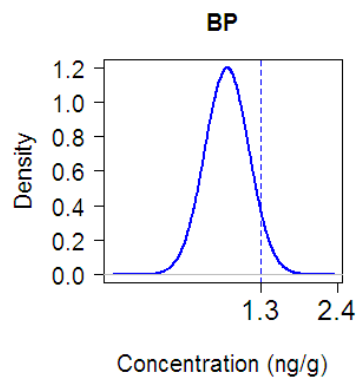
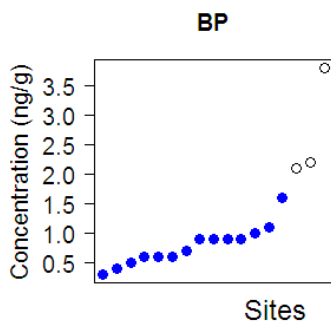
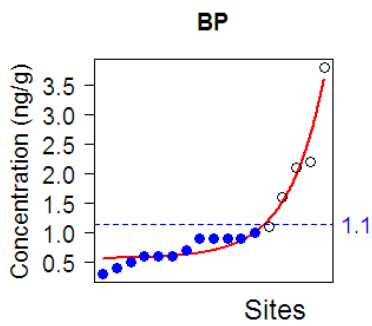


Benzofluoranthene: benzo(b,k,j)fluoranthene



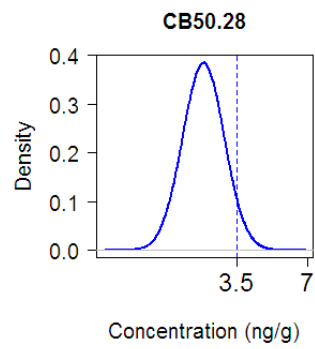
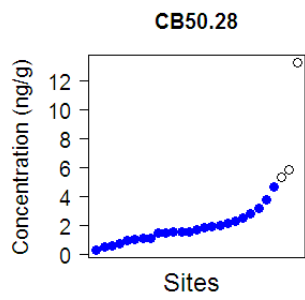
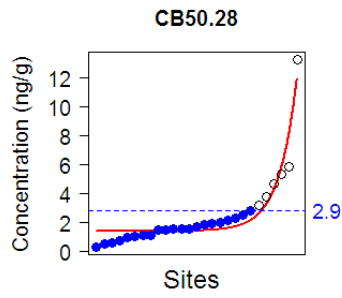


IP: indeno(1,2,3-cd)pyrene

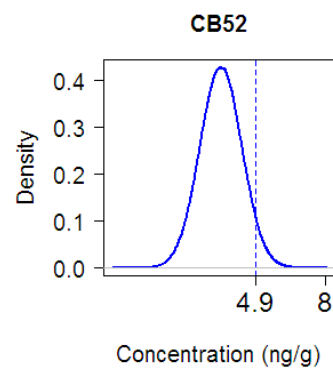
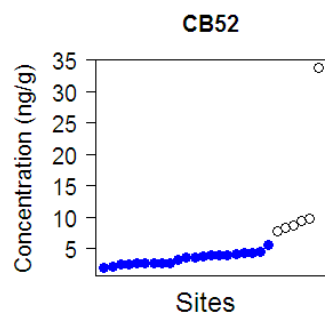
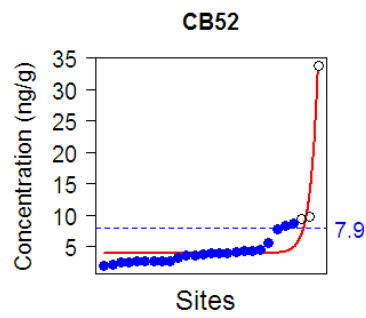


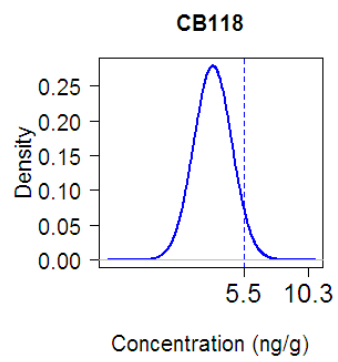
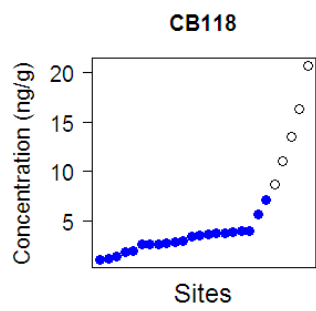
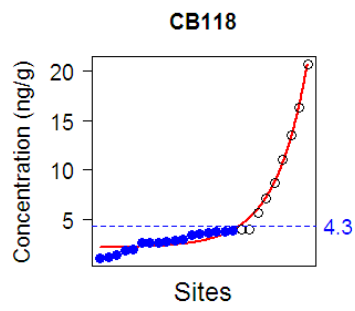
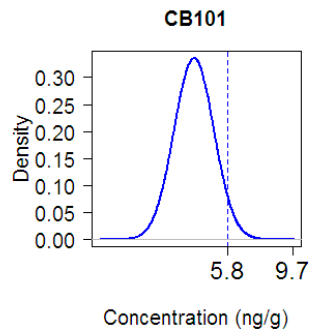
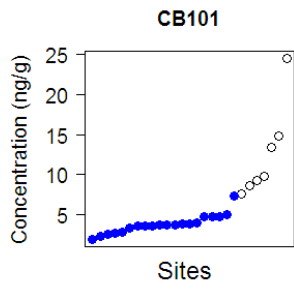
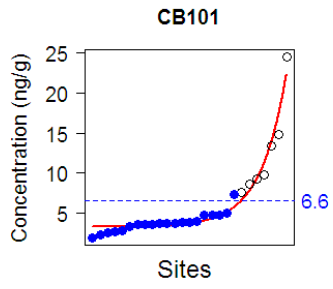
BP: benzo(g,h,i)perylene

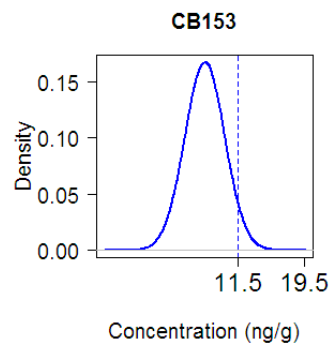
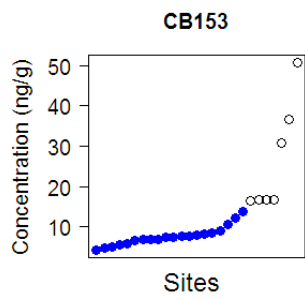
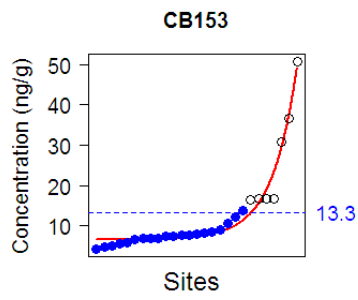
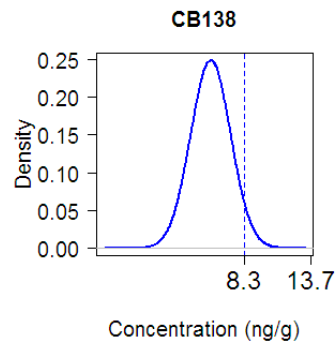
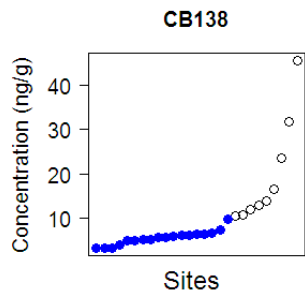
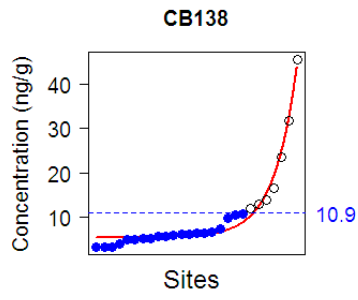
IV. Congénères de PCB (PCB indicateurs)

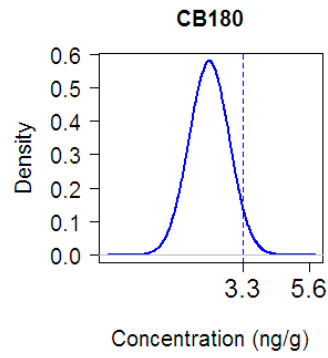
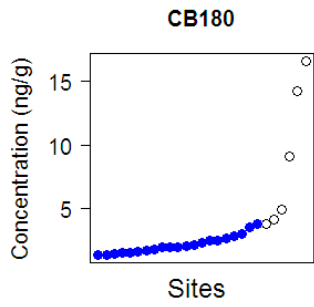
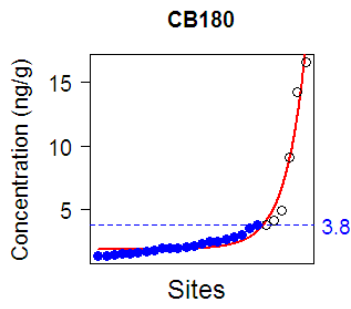


CB 50.28: CB 50 +CB 28

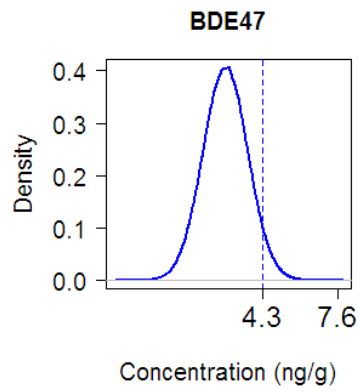
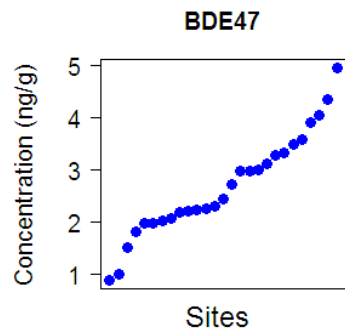








V. Congénères de PBDE



Onema
Hall C – Le Nadar
5 square Félix Nadar
94300 Vincennes
01 45 14 36 00
www.onema.fr

Irstea
Parc de Tourvoie
BP 44,
92163 Antony cedex
01 40 96 61 21
www.irstea.fr