



**HAL**  
open science

# L'approche PICT pour évaluer l'impact écotoxicologique des contaminants métalliques dans les sédiments: Guide méthodologique, application et perspectives opérationnelles

C. Bonnineau, A. Charton, B. Volat, Aymeric Dabrin, E. Lyautey, Stéphane Pesce

## ► To cite this version:

C. Bonnineau, A. Charton, B. Volat, Aymeric Dabrin, E. Lyautey, et al.. L'approche PICT pour évaluer l'impact écotoxicologique des contaminants métalliques dans les sédiments: Guide méthodologique, application et perspectives opérationnelles. [Rapport de recherche] irstea. 2019, pp.50. hal-02609268

**HAL Id: hal-02609268**

**<https://hal.inrae.fr/hal-02609268v1>**

Submitted on 23 Jun 2023

**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.



Programme 2016/2018 – Thème Risques liés à contamination chimique - Action n° 46 : Validation et application d'approches PICT pour évaluer l'impact écotoxicologique des contaminants dans le sédiment



# **L'approche PICT pour évaluer l'impact écotoxicologique des contaminants métalliques dans les sédiments**

**Guide méthodologique, application et  
perspectives opérationnelles**

**Rapport final**

**Chloé BONNINEAU (Irstea)  
Anaïs CHARTON (Irstea)  
Bernadette VOLAT (Irstea)  
Aymeric DABRIN (Irstea)  
Emilie LYAUTEY (USMB)  
Stéphane PESCE (Irstea)**

**Février 2019**



- **AUTEURS**

**Chloé BONNINEAU**, Chargée de Recherche (Irstea), [chloe.bonnineau@irstea.fr](mailto:chloe.bonnineau@irstea.fr)

**Anaïs CHARTON**, Ingénieur d'Etude (Irstea), [anais.charton@irstea.fr](mailto:anais.charton@irstea.fr)

**Bernadette VOLAT**, Ingénieur d'Etude (Irstea), [bernadette.volat@irstea.fr](mailto:bernadette.volat@irstea.fr)

**Aymeric DABRIN**, Chargé de Recherche (Irstea), [aymeric.dabrin@irstea.fr](mailto:aymeric.dabrin@irstea.fr)

**Emilie LYAUTEY**, Maître de Conférence (USMB), [emilie.lyautey@univ-smb.fr](mailto:emilie.lyautey@univ-smb.fr)

**Stéphane PESCE**, Directeur de Recherche (Irstea), [stephane.pesce@irstea.fr](mailto:stephane.pesce@irstea.fr)

- **CORRESPONDANTS**

**Olivier PERCEVAL**, Chargé de mission écotoxicologie (AFB), [olivier.perceval@afbiodiversite.fr](mailto:olivier.perceval@afbiodiversite.fr)

- **AUTRES CONTRIBUTEURS**

**Bernard MOTTE**, Assistant Ingénieur (Irstea), [bernard.motte@irstea.fr](mailto:bernard.motte@irstea.fr)

**Christophe ROSY**, Technicien de recherche (Irstea), [christophe.rosy@irstea.fr](mailto:christophe.rosy@irstea.fr)

**Matthieu MASSON**, Ingénieur de Recherche (Irstea), [matthieu.masson@irstea.fr](mailto:matthieu.masson@irstea.fr)

**Ayanleh MAHAMOUD AHMED**, Doctorant (USMB/Irstea), [ayanleh.mahamoud-ahmed@univ-smb.fr](mailto:ayanleh.mahamoud-ahmed@univ-smb.fr)

**Droits d'usage** : accès libre

**Niveau géographique** : national

**Couverture géographique** : globale (milieux aquatiques lotiques et lenticues)

**Niveau de lecture** : professionnels et experts



- **RESUME**

Le développement d'outils permettant d'établir *in situ* des liens entre la présence de contaminants et la réponse des communautés aquatiques exposées représente un enjeu important en vue d'appréhender plus finement l'impact de ces substances sur la qualité écologique des milieux aquatiques récepteurs. Cela est particulièrement vrai au niveau du compartiment sédimentaire qui reste peu pris en compte dans l'évaluation de la qualité écologique et écotoxicologique des milieux aquatiques.

L'exposition chronique des communautés aquatiques aux contaminants peut se traduire par la sélection d'espèces tolérantes et par des phénomènes d'adaptation génétique ou physiologique. Au sein des communautés microbiennes, ces processus peuvent engendrer l'acquisition et le développement de capacités de tolérance, conformément au concept PICT (« Pollution Induced Community Tolerance »). L'étude de ces capacités adaptatives, généralement assez spécifiques d'un composé ou d'une famille de composés, peut permettre d'établir des liens entre exposition et effets biologiques sur les communautés microbiennes. Appliquée aux sédiments, l'approche PICT pourrait ainsi renseigner sur l'impact écotoxicologique des contaminants sur les communautés microbiennes associées à ce compartiment et sur ses conséquences sur la qualité écologique des milieux aquatiques.

Dans ce contexte, nous avons développé une approche PICT pour évaluer l'impact de contaminants métalliques sur les communautés microbiennes sédimentaires. Le couplage entre, d'une part, des campagnes d'échantillonnage en milieu lotique et lacustre et, d'autre part, des développements méthodologiques en laboratoire, nous a ainsi permis de proposer une méthodologie robuste, détaillée dans le présent rapport. Celle-ci tient compte de toutes les étapes, depuis l'échantillonnage jusqu'à l'analyse des courbes dose-réponse permettant de déterminer les niveaux de tolérance. Développée en prenant comme modèle le cuivre, cette méthodologie est applicable à d'autres types de composés métalliques.

La mise en œuvre de cette méthode dans différents écosystèmes (lac Léman, rivières en région Auvergne-Rhône-Alpes) a permis de démontrer son fort potentiel opérationnel pour répondre au besoin de marqueurs biologiques d'exposition dans le compartiment sédimentaire afin de compléter les méthodes de bioindication existantes, peu adaptées à la problématique des contaminants toxiques. A ce stade, elle est par exemple directement applicable pour suivre l'évolution temporelle de la qualité écotoxicologique d'une station donnée, dans un contexte de dégradation ou au contraire d'amélioration de la qualité chimique en lien avec la contamination métallique (par ex. pour évaluer l'efficacité de mesures visant à réduire localement l'impact de ce type de contamination).

En complément, notre travail fait ressortir deux perspectives principales d'amélioration de cette approche pour renforcer son caractère opérationnel. Sur la base de la méthode développée, la première concerne la définition de valeurs-seuils d'exposition à partir des niveaux de tolérance mesurés, afin de s'affranchir du besoin de mettre en œuvre une démarche de comparaison relative, basée sur la comparaison de la tolérance d'une communauté microbienne exposée avec celle d'une communauté « de référence ». La deuxième concerne l'élaboration d'une méthode permettant de s'affranchir de « l'effet matrice » en passant par une étape de détachement des communautés microbiennes du sédiment avant la réalisation des tests de toxicité visant à mesurer les niveaux de tolérance. Une telle méthode offrirait également la possibilité de miniaturiser les protocoles et de les automatiser, ce qui pourrait grandement faciliter son transfert opérationnel. Nous avons travaillé sur ce point en proposant une première méthode de détachement microbienne très prometteuse. Des recherches supplémentaires sont néanmoins nécessaires pour vérifier que cette méthode est applicable à tout type de sédiment et qu'elle ne fausse pas les conclusions fournies par les résultats des approches PICT.

- **MOTS CLES (THEMATIQUE ET GEOGRAPHIQUE)**

Activités enzymatiques, Approche PICT, Bioindication, Communautés microbiennes, Contaminants métalliques, Cuivre, Marqueurs biologiques d'exposition, Milieux lacustres, Milieux lotiques, Potentiel opérationnel, Sédiments, Tolérance.



- **TITLE**

**PICT approach to assess the ecotoxicological impact of metals contaminants in sediments:  
*Methodological guide, application and operational perspectives***

- **ABSTRACT**

The development of tools to better understand the impact of contaminants on the ecological quality of receiving aquatic environments is a key challenge and would help to in situ characterize the links between the presence of contaminants and the response of exposed aquatic communities. The benthic compartment is particularly poorly considered when focusing on the assessment of the ecological and ecotoxicological quality of aquatic environments.

The chronic exposure of aquatic communities to contaminants can result in the selection of tolerant species but also in genetic or physiological adaptation. Within microbial communities, these adaptation processes can cause the acquisition and development of tolerance abilities, according to the PICT (Pollution Induced Community Tolerance) concept. The characterization of these adaptive capacities, generally specific to a compound or a family of compounds, can allow to evaluate the links between exposure and the following biological effects on microbial communities in the aquatic environment. PICT approach in sediments could provide useful information on the ecotoxicological impact of contaminants on benthic microbial communities and their consequences on the ecological quality of aquatic environments. In this framework, we have developed and validated a PICT approach to assess the impact of metallic contaminants on sediment microbial communities. Based both on sampling campaigns in lotic and lacustrine environments and on methodological developments in the laboratory, our approach has allowed to develop and propose a robust methodology, fully detailed in this report. All stages, from sampling to the analysis of dose-response curves to determine tolerance levels are presented here. This methodology has been developed using copper as a model and is applicable to other types of metal compounds.

The implementation of this method to different ecosystems (Lake Geneva and several rivers in the Auvergne-Rhône-Alpes region) has demonstrated its strong operational potential. It allows to complement existing bioindication methods (which are poorly adapted to toxic contaminant) and fulfills the need of biological exposure markers in the benthic compartment. It is, for instance, directly applicable to monitor the temporal evolution of the ecotoxicological quality of a given sampling site, in a context of degradation or improvement of the chemical quality in relation to metal contamination (e.g. to evaluate the efficiency of measures dedicated to locally reduce the impact of this type of contamination).

Our work also highlights two perspectives of improvement to strengthen the operational value of this approach. Based on the method developed, the first perspective is related to the definition of exposure threshold values, based on measured tolerance levels, to avoid the need to undertake a relative approach (based on the comparison of an exposed microbial community the tolerance with the tolerance of a "reference" community). The second perspective is about the development of an experimental strategy that would allow to overcome the sediment "matrix effect" by detaching microbial communities from the sediment before carrying out toxicity tests to measure tolerance levels. Such a method would also offer the possibility to miniaturize and automatize the protocols, which could greatly facilitate its operational transfer. The latter objective has been addressed by proposing a very promising first methodology for microbial detachment. Further research remains still needed to ensure that this method is suitable to all sediment types and does not impair the conclusions provided by the PICT approach.

- **KEY WORDS (THEMATIC AND GEOGRAPHICAL AREA)**

Enzymatic activities, PICT approach, Bioindication, Microbial communities, Trace metal contaminants, Copper, Exposure biological markers, Lake environments, Lotic environments, Operational potential, Sediments, Tolerance.



- **SYNTHÈSE POUR L'ACTION OPÉRATIONNELLE**

## 1. Contexte général et objectif de l'action

**Le compartiment sédimentaire représente une composante importante des écosystèmes aquatiques** car il est le support d'une large biodiversité et il contribue au fonctionnement écologique de ces milieux. Cependant, les sédiments sont également des puits naturels pour de nombreux contaminants, incluant certains éléments-traces métalliques, qui s'y déposent et s'y accumulent avec le temps. **Ce compartiment a longtemps été ignoré dans la directive cadre sur l'eau**. Deux amendements successifs (2008/105/CE et 2013/39/UE) ont toutefois permis sa prise en compte progressive dans les démarches de protection et de gestion des milieux aquatiques dans un contexte de contamination chimique. D'un point de vue opérationnel, cela se traduit notamment par le suivi chimique de substances prioritaires et par la mise en œuvre de démarches d'évaluation des risques, qui combinent des tests de toxicité sur des organismes modèles à une approche mécanistique basée sur la méthode du coefficient de partage à l'équilibre des contaminants entre la fraction dissoute et la fraction particulaire. Cependant, force est de constater qu'il existe encore à ce jour **un déficit de recommandations et de méthodes robustes pour évaluer *in situ* les impacts écotoxicologiques de la contamination des sédiments** sur les communautés biologiques associées à ce compartiment. **Cela empêche donc la prise en compte de ces impacts dans l'évaluation de la qualité écologique des milieux aquatiques.**

**Les communautés microbiennes**, et en particulier les communautés bactériennes, **représentent la majorité de la biomasse dans le compartiment sédimentaire**, où elles jouent un rôle fonctionnel majeur. Dans ce contexte, le développement d'outils permettant d'établir *in situ* des liens de causalité entre la présence de contaminants et la réponse des communautés microbiennes exposées représente un enjeu important en vue de proposer de nouveaux indicateurs d'impacts écotoxicologiques dans les sédiments.

L'exposition chronique des communautés microbiennes aux contaminants peut se traduire par la sélection d'espèces tolérantes mais également par des phénomènes d'adaptation génétique et/ou physiologique. Ces processus d'adaptation peuvent ainsi engendrer l'acquisition et le développement de capacités de tolérance, conformément au concept PICT (« Pollution Induced Community Tolerance »). L'étude de ces capacités adaptatives, généralement assez spécifiques d'un composé ou d'une famille de composés, s'avère donc très prometteuse pour établir, en milieu aquatique, des liens entre exposition et effets biologiques sur les communautés microbiennes. **L'approche PICT appliquée aux sédiments pourrait ainsi renseigner sur l'impact écotoxicologique des contaminants dans ce compartiment** et sur ses conséquences sur la qualité écologique des milieux aquatiques.

Dans ce contexte, et dans le cadre de la feuille de route 22.4 de l'AFB (Risques liés à la contamination chimique des milieux aquatiques<sup>1</sup>), cette action visait à **développer, appliquer et valider des approches PICT pour évaluer l'impact écotoxicologique d'un contaminant métallique modèle (le cuivre) sur les communautés microbiennes dans des sédiments de milieux lotiques et lacustres**. Ce travail a été porté par l'équipe Ecotoxicologie Microbienne Aquatique (EMA, UR RiverLy, Irstea Lyon-Villeurbanne), en collaboration avec le Laboratoire de chimie des milieux aquatiques (LAMA, UR RiverLy) et l'équipe de l'UMR CARTELL basée au Bourget-du-Lac (Université Savoie Mont-Blanc).

---

<sup>1</sup> Sous-thèmes « Enjeux émergents liés aux contaminants et solutions innovantes » (développement et application de bioessais innovants) et « Sédiments contaminés » (développement et validation d'outils et de méthodes d'évaluation des risques).

## 2. Description synthétique du protocole développé

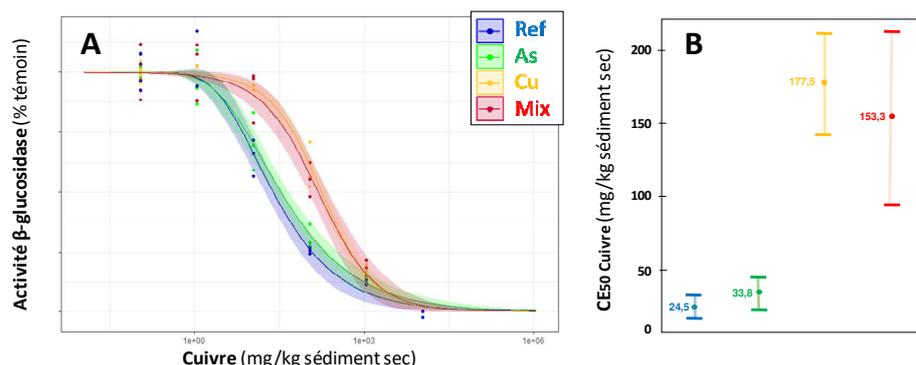
Le protocole développé est décrit en détail dans le présent rapport (Annexe 1). Ce guide méthodologique explicite notamment la stratégie mise en œuvre aux différentes étapes incluant :

- le prélèvement des échantillons de sédiments,
- la conservation et la préparation de ces échantillons,
- la réalisation des tests de toxicité à partir de la mesure de l'activité enzymatique microbienne  $\beta$ -Glucosidase, qui intervient dans le cycle du carbone en participant notamment à la dégradation de polymères naturels tels que les carbohydrates (i.e. glucides),
- la modélisation des courbes dose-réponse et la comparaison des niveaux de tolérance.

## 3. Preuve de concept

Le protocole développé a tout d'abord été testé dans le cadre d'une approche expérimentale. Celle-ci a été réalisée dans des canaux artificiels de laboratoire, à partir de sédiments contaminés avec des concentrations en cuivre (Cu) et/ou en arsenic (As) représentatives de niveaux de contamination élevés de rivières françaises (i.e. environ 55 mg Cu/kg sédiment sec et 30 mg As/kg sédiment sec).

Les courbes dose-réponse obtenues à partir de la mesure de l'activité  $\beta$ -Glucosidase en fonction du niveau d'exposition aiguë au Cu (Fig. S1A) ont clairement démontré que les communautés exposées chroniquement au Cu (seul ou en mélange avec l'As) pendant 4 semaines dans les canaux artificiels sont devenues plus tolérantes à ce métal que les communautés non exposées au préalable à celui-ci. Cela se traduit par une augmentation significative (d'un facteur 7 environ) des valeurs de  $CE_{50}$  (concentrations efficaces inhibant 50% de l'activité mesurée, exprimées ici en mg/kg sédiment sec) obtenues après modélisation des courbes dose-réponse (Fig. S1B).



**Figure S1 :** (A) Courbes dose-réponse obtenues avec l'activité  $\beta$ -glucosidase après 4h d'exposition au cuivre ; (B)  $CE_{50}$  (valeurs moyennes  $\pm$  intervalle de confiance 95%) associées. Chaque point représente un échantillon et la courbe en trait plein la modélisation de la courbe dose-réponse. La zone colorée correspond à l'intervalle de confiance à 95 %. Les concentrations et les  $CE_{50}$  sont exprimées en mg/kg poids sec.

Ces résultats, associés aux changements que nous avons observés par ailleurs au niveau de la structure des communautés bactériennes chroniquement exposées au Cu (seul et en mélange), sont totalement en accord avec le concept PICT. Ils démontrent donc que **l'approche PICT est tout à fait applicable aux communautés microbiennes du sédiment** et que **le protocole que nous avons développé est adapté pour mesurer les niveaux de tolérance de ce type de communautés aux métaux**, incluant le Cu.

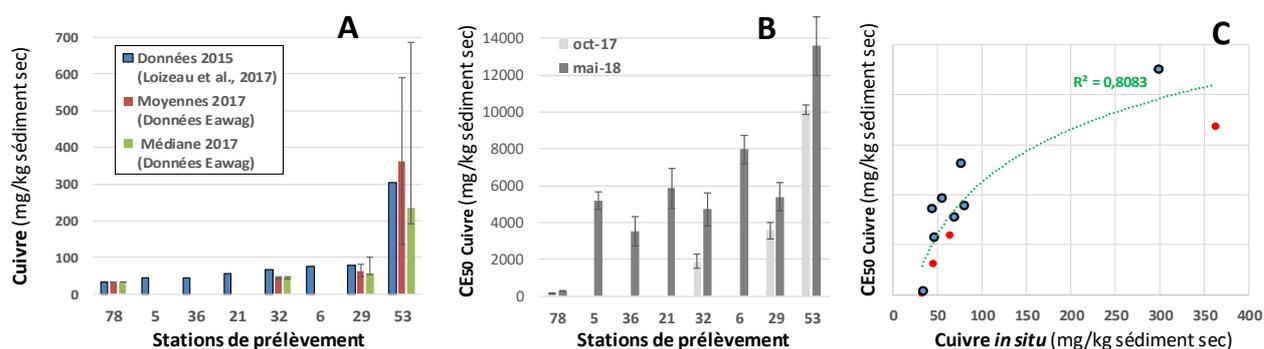
## 4. Application en milieu lacustre et lotique

Après avoir démontré expérimentalement l'applicabilité du concept PICT dans un contexte de contamination artificielle au Cu, nous avons décidé d'appliquer le même protocole à des sédiments naturellement contaminés par ce métal, dans le cadre de suivis réalisés en milieu lacustre (lac Léman) et dans différentes rivières localisées en région Auvergne-Rhône-Alpes.

**Concernant le lac Léman**, nous avons organisé deux campagnes de prélèvements, respectivement en octobre 2017 (sur 4 stations) et mai 2018 (sur 8 stations incluant les 4 citées précédemment) afin d'évaluer la pertinence de l'approche PICT développée pour mettre en évidence l'impact de l'exposition au Cu sur les communautés microbiennes des sédiments superficiels. L'objectif était ainsi de vérifier si les variations spatio-temporelles des niveaux de tolérance mesurés étaient en adéquation avec celles des concentrations en Cu dans les sédiments superficiels du lac Léman.

Les niveaux de tolérance au Cu estimés à partir de la méthode développée mettent en évidence des variations spatiales très importantes à l'échelle du lac (Fig. S2B). En mai 2018, les valeurs moyennes de  $CE_{50}$  varient ainsi de 267 mg/kg ps (poids sec) au niveau de la station 78 à 13582 mg/kg ps au niveau de la station 53. Ces deux stations correspondent respectivement aux stations les moins et les plus contaminées par le Cu avec des concentrations moyennes de l'ordre de 33 mg/kg ps en 2015 et 2017 pour la station 78 et supérieures à 300 mg/kg ps ces deux années pour la station 53 (Fig. S2A). Les sédiments issus des 6 autres stations de prélèvements présentent des niveaux de tolérance au Cu intermédiaires à ceux déterminés respectivement aux stations 78 et 53, ce qui est en accord avec les niveaux de contamination au Cu mesurés dans le lac (Fig. S2A).

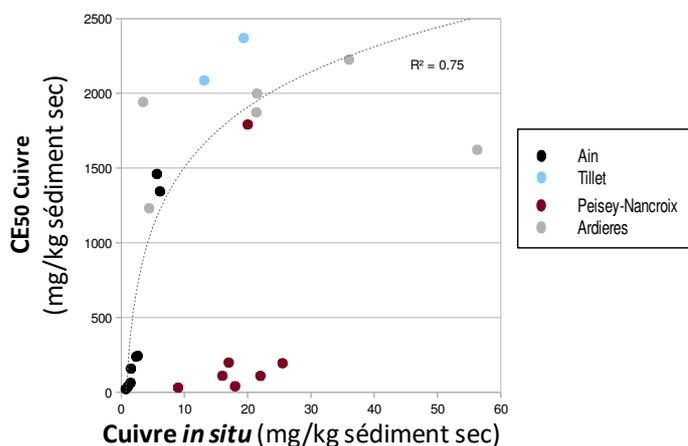
De ce fait, et malgré l'absence de données de contamination actualisées concernant la campagne de mai 2018, **les résultats de l'approche PICT font apparaître une corrélation exponentielle assez remarquable entre, d'une part, l'ensemble des valeurs moyennes de  $CE_{50}$  obtenues lors des deux campagnes d'échantillonnage et, d'autre part, les niveaux de contamination des sédiments superficiels**, mesurés en 2015 et corrigés partiellement par les valeurs mesurées pour les 4 échantillons prélevés en octobre 2017 (Fig. S2C,  $n=12$ ,  $R^2=0,81$ ).



**Figure S2 :** (A) Concentrations en cuivre mesurées dans les sédiments superficiels du lac Léman en 2015 (Loizeau et al., 2017) et 2017 (Eawag, moyennes  $\pm$  écart-types ; médianes et valeurs minimales et maximales) sur les 8 stations d'échantillonnage ; (B)  $CE_{50}$  mesurées sur ces mêmes stations et exprimées en mg de Cu par kg de sédiment sec ; (C) Illustration de la corrélation exponentielle observée entre les valeurs moyennes de  $CE_{50}$  obtenues lors des deux campagnes d'échantillonnage (octobre 2017,  $n=4$  et mai 2018,  $n=8$ ) et les niveaux de contamination des sédiments superficiels, mesurés en 2015, corrigés partiellement par les valeurs mesurées par l'Eawag concernant les 4 échantillons prélevés en octobre 2017 (représentés en rouge)

**Concernant les études en milieu lotique**, nous avons mené plusieurs campagnes d'échantillonnage sur quatre rivières présentant des niveaux et des types de contamination variées : un site de référence situé sur la **rivière Ain** et peu contaminé au Cu (2 stations et 4 campagnes d'échantillonnage) ; la **rivière Ardières**, située en zone viticole du Beaujolais (3 stations, 2 campagnes) ; la **rivière Tillet**, qui est un affluent du lac du Bourget (3 stations, 2 campagnes) ; et des petits cours d'eau situés dans la **zone minière de Peisey-Nancroix** (7 stations, 1 campagne).

Comme observé en milieu lacustre, les niveaux de tolérance au Cu (exprimés sous forme de  $CE_{50}$ ) des communautés microbiennes des sédiments lotiques étudiés augmentent en fonction du niveau de Cu mesuré dans ce compartiment. Cette relation exponentielle est vérifiée pour tous les sites à l'exception des sédiments prélevés dans les torrents de la zone minière de Peisey-Nancroix (Fig. S3,  $n=16$ ,  $R^2 = 0,75$ ).



**Figure S3 :** Niveau de tolérance microbienne au cuivre ( $CE_{50}$ ) en fonction de la teneur en cuivre des sédiments pour les différents sites étudiés. La ligne en pointillé représente la relation exponentielle entre la  $CE_{50}$  et la concentration en cuivre pour tous les sites sauf ceux de Peisey-Nancroix

**L'application de l'approche PICT en milieu lotique nous a permis de valider la corrélation entre tolérance microbienne au Cu et exposition *in situ*.** Cette application démontre notamment que les facteurs influençant le plus largement la tolérance microbienne au Cu restent liés à la contamination métallique et à la biodisponibilité des métaux dans le sédiment. Cependant, elle met en évidence **l'influence potentielle des caractéristiques du sédiment sur la tolérance microbienne.** Il serait donc pertinent de renforcer la présente étude en explorant plus en détails les facteurs pouvant influencer les liens de causalité entre l'exposition au Cu et les niveaux de tolérance mesurés (*via* le renforcement du nombre de sites d'études et la vérification d'hypothèses dans des approches expérimentales contrôlées).

## 5. Perspectives opérationnelles

A notre connaissance, cette étude est la première qui explore le potentiel de l'approche PICT pour mettre en évidence un impact écotoxicologique de contaminants métalliques dans le compartiment sédimentaire. **Le couplage entre d'une part, des campagnes d'échantillonnage en milieu lotique et lacustre et, d'autre part, des développements méthodologiques en laboratoire, nous a permis de proposer une méthodologie robuste.** Celle-ci tient compte de toutes les étapes, depuis l'échantillonnage jusqu'à l'analyse des courbes dose-réponse permettant de déterminer les niveaux de tolérance. **Développée en prenant comme modèle le Cu, cette méthodologie est applicable à d'autres types de composés métalliques.**

La mise en œuvre de cette méthode dans différents écosystèmes a permis de démontrer son **fort potentiel opérationnel pour répondre au besoin de marqueurs biologiques d'exposition dans le compartiment sédimentaire** afin de compléter les méthodes de bioindication existantes, peu adaptées à la problématique des contaminants toxiques. A ce stade, elle est par exemple **directement applicable pour suivre l'évolution temporelle de la qualité écotoxicologique d'une station donnée, dans un contexte de dégradation ou au contraire d'amélioration de la qualité chimique en lien avec la contamination métallique** (e.g. pour évaluer l'efficacité de mesures visant à réduire localement l'impact de ce type de contamination).

En complément, notre travail fait ressortir deux perspectives principales d'amélioration de cette approche pour renforcer son caractère opérationnel :

- 1) Sur la base de la méthode développée, la première concerne la définition de valeurs-seuils d'exposition à partir des niveaux de tolérance mesurés, afin de s'affranchir du besoin de mettre en œuvre une démarche de comparaison relative, basée sur la comparaison de la tolérance d'une communauté microbienne exposée avec celle d'une communauté « de référence ». Pour ce faire, **il serait nécessaire de déployer la méthode développée à large échelle géographique, en multipliant le nombre de stations de prélèvements, incluant des sites de référence, peu contaminés, et des sites présentant des niveaux de contamination contrastés** afin de constituer une base de données robuste.
- 2) La deuxième concerne l'élaboration d'une méthode permettant de s'affranchir de « l'effet matrice » en passant par une étape de détachement des communautés microbiennes du sédiment avant la réalisation des tests de toxicité visant à mesurer les niveaux de tolérance. Une telle méthode offrirait également la possibilité de miniaturiser les protocoles et de les automatiser, ce qui pourrait grandement faciliter son transfert opérationnel. Nous avons travaillé sur ce point en proposant **une première méthode de détachement microbienne très prometteuse. Des recherches supplémentaires sont néanmoins nécessaires pour vérifier que cette méthode est applicable à tout type de sédiment et qu'elle ne fausse pas les conclusions fournies par les résultats des approches PICT.**

• **SOMMAIRE**

<b>1. Introduction</b>	<b>11</b>
1.1. Un déficit de méthodes pour évaluer les impacts écotoxicologiques de la contamination des sédiments	11
1.2. Potentiel de l'approche PICT pour évaluer in situ l'impact des contaminants métalliques dans le compartiment sédimentaire	11
1.3. Objectifs de l'action et contenu du guide méthodologique	12
<b>2. Principe général de la méthode PICT et du protocole proposé</b>	<b>13</b>
2.1. Principe général de la méthode PICT	13
2.2. Description synthétique du protocole proposé pour évaluer la tolérance au cuivre à partir de la mesure de l'activité enzymatique beta-glucosidase ( $\beta$ -Glu)	14
<b>3. Preuve de concept à partir d'une expérience en laboratoire</b>	<b>15</b>
<b>4. Application du protocole en milieu lacustre et en milieu lotique</b>	<b>16</b>
4.1. Application en milieu lacustre : l'exemple du lac Léman	16
4.2. Application en milieu lotique	19
<b>5. Recommandations méthodologiques pour la mise en œuvre de la méthode développée</b>	<b>20</b>
5.1. Recommandations pour l'échantillonnage des sédiments en vue de réaliser les tests PICT	20
5.2. Recommandations pour la conservation des sédiments en vue de réaliser les tests PICT	24
5.2.1. <i>Température de conservation</i>	
5.2.2. <i>Durée de conservation</i>	
5.3. Limites de la méthode actuelle et perspectives d'amélioration	26
5.3.1. <i>Importance de l'effet matrice</i>	
5.3.2. <i>Détacher les communautés microbiennes du sédiment pour limiter l'effet matrice</i>	
5.3.3. <i>Vers la définition de valeurs-seuils d'exposition à partir des niveaux de tolérance mesurés (valeurs de CEx)</i>	
<b>6. Conclusions</b>	<b>30</b>
<b>7. Glossaire</b>	<b>31</b>
<b>8. Sigles &amp; Abréviations</b>	<b>31</b>
<b>9. Bibliographie</b>	<b>31</b>
<b>10. Table des illustrations</b>	<b>33</b>
<b>11. Annexe 1 : Protocole détaillé de l'approche PICT appliquée aux sédiments</b>	<b>35</b>
11.1. Description rapide du protocole	35
11.2. Prélèvement des sédiments	35
11.3. Conservation des échantillons	35
11.4. Matériel et réactifs	35
11.5. Détermination de la concentration saturante en fluorogène	36
11.5.1. <i>Mesurer l'activité beta-glucosidase en fonction de la concentration en substrat</i>	
11.5.2. <i>Déterminer la concentration saturante en MUF-Glu</i>	
11.6. Réalisation des tests de toxicité	37
11.6.1. <i>Préparation de la gamme de concentrations en cuivre</i>	
11.6.2. <i>Réalisation des tests de toxicité</i>	
11.7. Courbe d'étalonnage du fluorogène	39
11.7.1. <i>Déterminer la gamme de fluorescence de MUF pour chaque échantillon</i>	
11.7.2. <i>Réaliser une courbe d'étalonnage pour chaque échantillon</i>	
11.8. Modélisation des courbes dose-réponse et comparaison des niveaux de tolérance	40
11.8.1. <i>Préparation des données</i>	
11.8.2. <i>Modélisation des courbes dose-réponse et détermination du niveau de tolérance</i>	
11.8.3. <i>Comparaison des niveaux de tolérance entre stations</i>	
<b>12. Annexe 2 : Scripts R</b>	<b>43</b>
<b>13. Annexe 3 : Exemple de fichier de données préparées pour modéliser la courbe dose-réponse et calculer les CEx pour une station</b>	<b>45</b>
<b>14. Annexe 4 : Tableau de métadonnées issues des suivis en milieu lotique</b>	<b>46</b>
<b>15. Remerciements</b>	<b>48</b>

- **L'APPROCHE PICT POUR EVALUER L'IMPACT ECOTOXICOLOGIQUE DES CONTAMINANTS METALLIQUES DANS LES SEDIMENTS – GUIDE METHODOLOGIQUE, APPLICATION ET PERSPECTIVES OPERATIONNELLES**

## 1. Introduction

### 1.1. Un déficit de méthodes pour évaluer les impacts écotoxicologiques de la contamination des sédiments

Le compartiment sédimentaire représente une composante importante des écosystèmes lotiques et lentiques car il est le support d'une large biodiversité d'organismes benthiques, qui vivent dans les sédiments ou à leur surface. Les communautés formées par ces organismes contribuent au fonctionnement des milieux aquatiques puisqu'elles jouent un rôle majeur dans de nombreuses fonctions écologiques telles que la minéralisation de la matière organique du sédiment, la dégradation des polluants ou la production de biomasse soutenant les réseaux trophiques aquatiques.

D'autre part, les sédiments sont également des puits naturels pour de nombreux contaminants qui s'y déposent et s'y accumulent avec le temps. C'est le cas notamment de certains éléments-traces métalliques qui se retrouvent dans le compartiment sédimentaire en raison de leur affinité avec la matière organique particulaire.

A l'échelle européenne, le compartiment sédimentaire a longtemps été ignoré dans la directive cadre sur l'eau (DCE ; 2000/60/CE). Deux amendements successifs (2008/105/CE et 2013/39/UE) ont toutefois permis sa prise en compte progressive dans les démarches de protection et de gestion des milieux aquatiques dans un contexte de contamination chimique. D'un point de vue opérationnel, cela se traduit notamment par le suivi chimique de substances prioritaires et par la mise en œuvre de démarches d'évaluation des risques, qui combinent des tests de toxicité sur des organismes benthiques modèles à une approche mécanistique basée sur la méthode du coefficient de partage à l'équilibre des contaminants entre la fraction dissoute et la fraction particulaire. Cependant, force est de constater qu'il existe encore à ce jour un déficit de recommandations et de méthodes robustes pour évaluer *in situ* les impacts écotoxicologiques de la contamination des sédiments sur les communautés benthiques. Cela empêche donc la prise en compte de ces impacts dans l'évaluation de la qualité écologique des milieux aquatiques.

### 1.2. Potentiel de l'approche PICT pour évaluer *in situ* l'impact des contaminants métalliques dans le compartiment sédimentaire

Les communautés microbiennes hétérotrophes (i.e. qui se nourrissent de substances organiques et ne peuvent effectuer elle-même la synthèse de ces éléments constitutifs, au contraire de ce que font par exemple les microorganismes photosynthétiques), et en particulier les communautés bactériennes, représentent la majorité de la biomasse dans le compartiment sédimentaire. Ainsi, 1 gramme de sédiment peut abriter plusieurs milliards de microorganismes incluant plusieurs milliers d'espèces bactériennes. Ces communautés sont donc indispensables au bon fonctionnement des cycles biogéochimiques, les transformations qui les assurent étant pour l'essentiel sous contrôle des micro-organismes hétérotrophes.

L'écotoxicologie microbienne a pour spécificité de privilégier l'échelle biologique de la communauté (Ghiglione et al. 2016), ce qui présente l'avantage de renforcer la dimension écologique des approches écotoxicologiques (Gessner et Tlili 2016). Compte tenu du rôle fonctionnel majeur des communautés microbiennes dans le compartiment sédimentaire, l'écotoxicologie microbienne offre donc des perspectives prometteuses pour mieux évaluer l'impact des contaminants sur la qualité écologique des sédiments et pour appréhender ses conséquences sur le fonctionnement de la zone benthique, et plus généralement des écosystèmes aquatiques.

Dans ce contexte, le développement d'outils permettant d'établir *in situ* des liens de causalité entre la présence de contaminants et la réponse des communautés microbiennes exposées représente un enjeu important en vue de proposer de nouveaux indicateurs d'impacts écotoxicologiques dans les différents compartiments aquatiques. Pour ce faire, il s'avère cependant nécessaire de tenir compte de la multiplicité des pressions chimiques (pollutions toxiques et trophiques) et/ou physiques, qui peuvent apparaître comme des « facteurs confondants », rendant alors difficile la distinction des effets spécifiques des contaminants sur les communautés microbiennes étudiées (Montuelle et al. 2010).

Pour pallier à cette contrainte, une des stratégies proposées par les scientifiques consiste à s'intéresser plus spécifiquement aux capacités d'adaptation des communautés microbiennes aux contaminants. En effet, l'exposition chronique à de faibles doses de substances toxiques organiques ou métalliques peut se traduire par la sélection d'espèces tolérantes mais également par des phénomènes d'adaptation génétique ou physiologique. A l'échelle des communautés microbiennes, ces processus d'adaptation peuvent ainsi engendrer l'acquisition et le développement de capacités de tolérance généralement spécifiques d'une famille de composés et/ou d'un mode d'action (concept PICT « Pollution Induced Community Tolerance » ; Blanck et al. 1988).

A ce jour, la plupart des études mettant en œuvre des approches PICT dans les milieux aquatiques ont ciblé les communautés microbiennes phototrophes (représentées principalement par des microalgues et des cyanobactéries), en mesurant et comparant leurs niveaux de tolérance à des herbicides organiques ou des métaux à partir de tests de toxicité effectués sur la photosynthèse (voir par exemple les revues de Pesce et al. 2011 et de Tlili et Montuelle 2011). L'approche PICT a été utilisée avec succès pour évaluer la récupération de communautés phytoplanctoniques (libres dans la colonne d'eau) dans un écosystème lacustre (lac Léman ; Larras et al. 2016) et de communautés périphytiques (qui se développent sur des supports immergés, tels que les pierres et les cailloux) dans une rivière (Morcille, Beaujolais ; Pesce et al. 2016) suite à l'amélioration de la qualité chimique de ces milieux découlant de changements de pratiques phytosanitaires en réponse à l'interdiction d'utilisation de certains herbicides inhibant la photosynthèse (i.e. l'atrazine et le diuron). Ces études de cas ont ainsi permis de démontrer le potentiel opérationnel des approches PICT pour suivre l'évolution spatio-temporelle de la qualité écologique des milieux aquatiques (récupération ou dégradation) selon l'évolution des niveaux de contamination. Ce potentiel opérationnel a été souligné dans un rapport technique de la commission Européenne (European Commission, 2014) et par un groupe de chercheurs européens reconnu dans le domaine de l'écotoxicologie microbienne aquatique (Tlili et al. 2016) et auquel contribuent les équipes portant cette action.

Les communautés microbiennes aquatiques hétérotrophes ont également été considérées dans des approches PICT. Ces travaux ont par exemple permis de mettre en évidence l'impact de pollutions métalliques sur les communautés hétérotrophes de biofilms périphytiques en mesurant les niveaux de tolérance à partir de tests de toxicité réalisés sur la respiration induite par le glucose (Dorigo et al. 2010 ; Tlili et al. 2011a) et sur l'activité enzymatique beta-glucosidase ( $\beta$ -Glu ; Fechner et al. 2012, 2014 ; Faburé et al. 2015). L'étude de cette activité enzymatique a également permis de montrer une augmentation de la tolérance de communautés périphytiques à des anti-inflammatoires non stéroïdiens dans une section de rivière située à l'aval d'une station d'épuration (Corcoll et al. 2014). Plus récemment, Tlili et al. (2017) ont mis en évidence l'intérêt de mettre en œuvre des approches PICT couplant des tests de toxicité sur les communautés microbiennes hétérotrophes et phototrophes afin d'offrir une vision plus globale des effets de rejets de stations d'épuration, qui sont composés de mélanges de différentes familles de contaminants (pesticides, substances médicamenteuses...) et qui présentent donc un large panel de modes d'action.

Concernant le compartiment sédimentaire, il n'existe à notre connaissance qu'une seule étude ayant mis en œuvre une approche PICT pour appréhender les effets d'une contamination au cuivre (Cu) sur les communautés bactériennes benthiques de trois écosystèmes estuariens localisés en Grande Bretagne (estuaires de Hayles, Fal et Kingsbridge ; Ogilvie et Grant, 2008). A partir de tests de toxicité réalisés respectivement sur l'incorporation de leucine tritiée ou de thymidine tritiée (afin de mesurer l'inhibition de la production bactérienne), cette étude datant de plus de 10 ans a permis de montrer une forte corrélation positives entre i) les teneurs en Cu dans l'eau interstitielle des sédiments des trois estuaires et ii) les niveaux de tolérance mesurées, confirmant ainsi la faisabilité des approches PICT dans le compartiment sédimentaire.

### **1.3. Objectifs de l'action et contenu du guide méthodologique**

Dans le contexte précité, et dans le cadre de la feuille de route 22.4 de l'AFB (Risques liés à la contamination chimique des milieux aquatiques<sup>2</sup>), les travaux faisant l'objet de ce rapport visaient à développer, appliquer et valider des approches PICT pour évaluer l'impact écotoxicologique d'un contaminant métallique modèle (le cuivre) sur les communautés microbiennes hétérotrophes dans des sédiments de milieux lotiques et lacustres.

---

<sup>2</sup> Sous-thèmes « Enjeux émergents liés aux contaminants et solutions innovantes » (développement et application de bioessais innovants) et « Sédiments contaminés » (développement et validation d'outils et de méthodes d'évaluation des risques).

Cet objectif répond ainsi aux besoins d'amélioration des procédures d'évaluation des impacts et des risques écotoxicologiques des substances chimiques dans les sédiments, en appréhendant les effets sur les communautés benthiques (Pesce et al., 2018).

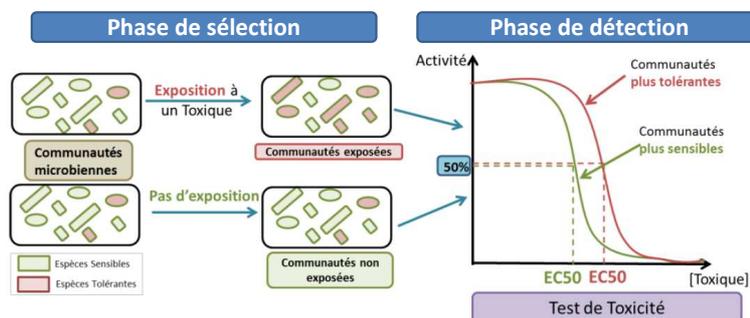
Le rapport se décline sous la forme d'un guide méthodologique incluant :

- une description synthétique du principe général de la méthode PICT et du protocole proposé (la méthodologie détaillée, de l'échantillonnage jusqu'à l'analyse, est fournie en annexe du rapport),
- une illustration du potentiel de la méthode proposée pour évaluer les effets chroniques du Cu sur des communautés microbiennes de sédiments naturels (preuve de concept à partir d'une expérience en laboratoire),
- une illustration du niveau d'applicabilité de cette méthode pour faire le lien *in situ* entre les niveaux de contamination au Cu et la réponse PICT des communautés microbiennes benthiques hétérotrophes dans des sédiments lacustres et de rivières,
- une discussion sur les avantages et les limites de chacune des étapes (i.e. échantillonnage, conservation des échantillons, protocole de mesure de la tolérance et interprétation des résultats) de la méthodologie proposée, afin notamment d'identifier les verrous et leviers potentiels pour la rendre opérationnelle dans les démarches d'évaluation de la qualité des milieux aquatiques.

## 2. Principe général de la méthode PICT et du protocole proposé

### 2.1. Principe général de la méthode PICT

Le concept PICT (tolérance des communautés induite par une exposition chronique aux contaminants) proposé initialement en 1988 par Blanck et al., est basé sur le fait qu'une communauté biologique naturelle est constituée de différentes populations et différentes espèces ayant des sensibilités variables vis-à-vis d'un toxique donné (ou de toxiques présentant des modes d'action similaires). L'exposition chronique d'une communauté à ce toxique se traduira ainsi par la sélection des organismes les plus tolérants (sélection inter-spécifique) et pourra engendrer la mise en place de mécanismes physiologiques ou génétiques d'adaptation intra-spécifique (ex. mécanismes de détoxification). La communauté résultante présentera alors, dans son ensemble, une tolérance au toxique supérieure à celle d'une communauté n'ayant pas subi de pression de sélection par celui-ci. L'acquisition de la tolérance est détectée grâce à la réalisation de tests de toxicité aiguë. Le principe du test de toxicité aiguë repose sur l'exposition à court terme d'une communauté à une gamme de concentrations croissantes en toxique, qui permet d'observer, sur des durées courtes d'exposition (de quelques heures généralement), l'inhibition d'une fonction biologique (l'activité  $\beta$ -Glu dans notre cas). La comparaison des courbes dose-réponse obtenues entre une communauté microbienne dite « de référence » (i.e. non exposée au préalable au(x) toxique(s) testé(s)) et une communauté exposée permet la détection du PICT. Généralement, la tolérance est exprimée en CEx, qui définit la concentration efficace en toxique inhibant x% de l'activité biologique mesurée.



© Marie-Audrey Rivière (2017)

Figure 1: Principe général de l'approche PICT

L'approche PICT est donc constituée de deux phases (Molander et Blanck, 1992) : (i) une phase de sélection au cours de laquelle la communauté est exposée chroniquement au toxique et (ii) une phase de détection, au cours de laquelle sa tolérance au toxique est évaluée au laboratoire, à partir de tests de toxicité aiguë (Fig 1). Une augmentation de la tolérance par rapport à une communauté de référence peut donc donner une indication sur l'exposition préalable *in situ* et renseigner ainsi sur le dépassement d'un seuil d'exposition suffisant pour engendrer l'acquisition d'une tolérance induite via les différents processus inter et intra spécifiques cités ci-dessus.

## 2.2. Description synthétique du protocole proposé pour évaluer la tolérance au cuivre à partir de la mesure de l'activité enzymatique beta-glucosidase ( $\beta$ -Glu)

Un des verrous du travail résidait dans le développement d'un protocole permettant de réaliser des tests de toxicité avec des communautés microbiennes de sédiment, afin de pouvoir évaluer leur niveau de tolérance au Cu dans le cadre d'une approche PICT.

Dans le compartiment sédimentaire, les communautés microbiennes sont fortement dominées par des microorganismes hétérotrophes (bactéries, champignons, protozoaires...) qui y jouent un rôle écologique majeur. Pour renforcer la pertinence écologique du protocole développé, nous avons donc choisi de cibler une fonction microbienne hétérotrophe à savoir l'activité enzymatique  $\beta$ -Glu. Cette activité enzymatique, principalement associée aux bactéries, est assurée par une ecto-enzyme, c'est-à-dire une enzyme excrétée à l'extérieur de la cellule et liée à la membrane cellulaire. Les ecto-enzymes jouent un rôle primordial dans les milieux aquatiques où les composés de haut poids moléculaire sont les principaux composants de la matière organique. En effet, ces composés ne peuvent pas être assimilés directement par les bactéries et ils doivent dans un premier temps être hydrolysés à l'extérieur de la cellule, en molécules de plus faible poids moléculaire afin de permettre leur transport à travers la membrane bactérienne. La  $\beta$ -Glu intervient dans le cycle du carbone en participant notamment à la dégradation de polymères naturels tels que les carbohydrates (i.e. glucides). Elle hydrolyse par exemple les liaisons  $\beta$ -disaccharides du glucose, de la cellulose et de la carboxyméthylcellulose (Barman et al. 1969).

L'activité enzymatique  $\beta$ -Glu est mesurée par fluorimétrie. Le principe de cette mesure est basé sur l'utilisation d'un ensemble non fluorescent composé d'un fluorogène (MUF : 4-méthylumbelliférone) associé à une molécule analogue à un substrat de la  $\beta$ -Glu, par exemple le  $\beta$ -D-glucopyranoside utilisé dans ce protocole. L'hydrolyse enzymatique casse la liaison de cet ensemble, libérant ainsi le fluorogène qui devient fluorescent. L'activité enzymatique est alors quantifiée par l'augmentation de la fluorescence, la réaction d'hydrolyse étant équimolaire (1 mole de fluorogène pour 1 mole de substrat libéré). L'ensemble fluorogène-substrat pour la  $\beta$ -Glu est le 4-méthylumbelliféryl- $\beta$ -D-glucopyranoside (MUF-Glu).

L'activité  $\beta$ -Glu est fréquemment prise en considération dans les approches PICT ciblant les microorganismes hétérotrophes de biofilms périphytiques afin d'évaluer les effets chroniques de différents types de pollutions incluant les polluants métalliques sur ces communautés (ex. Fechner et al. 2012, 2014 ; Faburé et al. 2015, Lambert et al. 2017). Le protocole permettant d'identifier des différences de tolérance au Cu entre différents échantillons est résumé sur la figure 2. Dans un premier temps, la réalisation d'une courbe de saturation permet de déterminer la concentration saturante en MUF-Glu (i.e. couple fluorogène-substrat) qui est ensuite utilisée lors des tests de toxicité. Ensuite, la réalisation d'une courbe d'étalonnage, visant à établir la correspondance entre unités de fluorescence et quantité de MUF (i.e. fluorogène) libérée, permet d'exprimer les résultats des tests de toxicité en activité spécifique. Finalement, les résultats des tests de toxicité sont analysés afin d'identifier d'éventuelles différences de tolérance entre les échantillons testés. **La méthodologie détaillée, de l'échantillonnage jusqu'à l'analyse, est fournie en annexe du rapport (Annexe 1).**

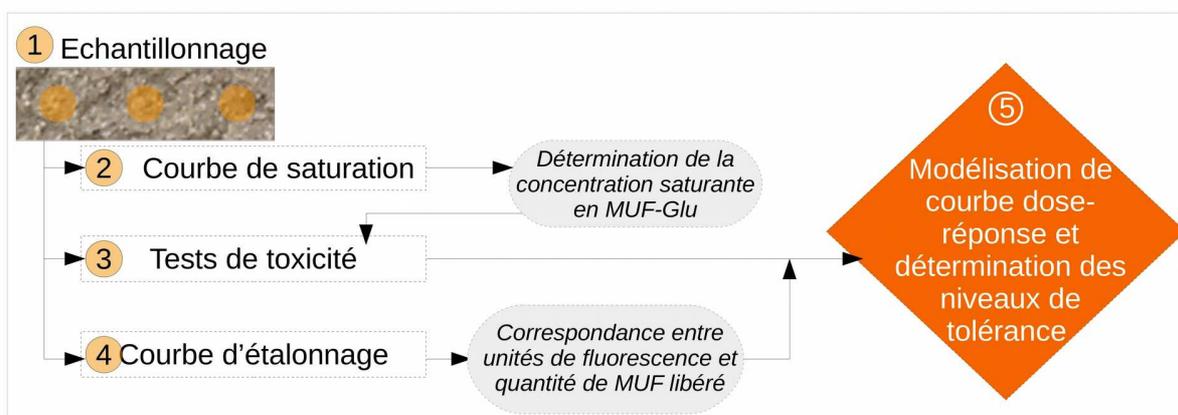


Figure 2 : Schéma récapitulatif des différentes étapes nécessaires pour identifier une augmentation de tolérance au cuivre induite par une exposition chronique dans des échantillons de sédiments. MUF-Glu : fluorogène-substrat, MUF : fluorogène.

### 3. Preuve de concept à partir d'une expérience en laboratoire

Comme énoncé précédemment, il n'existe à notre connaissance qu'une seule étude ayant mis en œuvre une approche PICT dans le compartiment sédimentaire (Ogilvie et Grant, 2008). Cette étude a été réalisée il y a plus de 10 ans, à l'aide de tests de toxicité visant à mesurer l'inhibition induite par des concentrations croissantes en Cu sur la production bactérienne, à partir de la mesure du taux d'incorporation de leucine tritiée ou de thymidine tritiée. Du fait de l'utilisation de ces substances radioactives, le protocole proposé dans cette précédente étude présente des contraintes peu compatibles avec un objectif de transfert opérationnel.

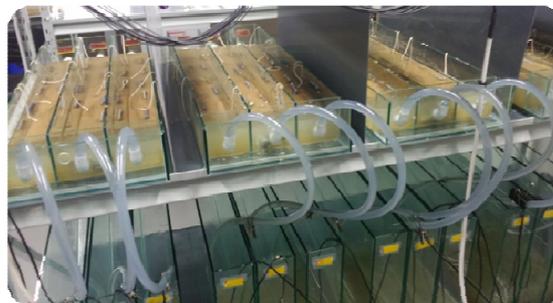
De ce fait, nous avons choisi d'adapter au compartiment sédimentaire le protocole mettant en œuvre la mesure de l'activité  $\beta$ -Glu, que nous utilisons en routine avec les communautés microbiennes hétérotrophes de biofilms périphytiques.

Afin d'établir une preuve de concept, il était donc nécessaire dans un premier temps de s'assurer que le protocole proposé pourrait permettre :

- de mesurer une toxicité aigüe du Cu sur les communautés du sédiment afin de pouvoir déterminer et comparer des niveaux de tolérance via l'étude de courbes dose-réponse,
- de différencier deux communautés en fonction de leur niveau d'exposition préalable au Cu, conformément au concept PICT.

Ce travail a été réalisé dans le cadre de la thèse d'Ayanleh Mahamoud Ahmed (en cours) qui vise à appréhender l'impact structurel et fonctionnel d'une exposition chronique au Cu et à l'arsenic (seuls et en mélange) sur des communautés microbiennes de sédiments de rivière.

Pour ce faire, nous avons mis en œuvre une approche expérimentale à partir de canaux artificiels contenant du sédiment naturel prélevé dans la rivière de l'Ain, peu contaminé en Cu et en As (Fig. 3). Ce sédiment a été exposé pendant 4 semaines à des niveaux de contamination réalistes (concentrations nominales visées de 40 mg/kg poids sec en Cu et/ou en As), en considérant 4 traitements, testés en triplicats : « Ref » (référence, sans Cu ni As), « Cu » (contamination en Cu seul), « As » (contamination en As seul) et « Mix » (mélange Cu + As).



© Ayanleh Mahamoud Ahmed

Figure 3 : Photographie des dispositifs expérimentaux (canaux artificiels) utilisés pour la première expérience en laboratoire

Les résultats des analyses chimiques ont montré que les concentrations en métaux dans les sédiments ont respectivement varié entre 55 mg/kg ps (poids sec) environ (en début d'expérience) et 45 mg/kg ps environ (en fin d'expérience) pour le Cu et entre 30 mg/kg ps environ et 25 mg/kg ps environ pour l'As. Il est à noter que de tels niveaux de concentrations ne sont pas irréalistes puisqu'ils sont régulièrement observés dans des sédiments issus de différents écosystèmes aquatiques français (INERIS, 2010; DREAL-REMIPP, 2013).

La dynamique des communautés microbiennes en réponse à ces niveaux d'exposition a été appréhendée à partir de différents descripteurs structurels et fonctionnels (Mahamoud Ahmed et al., 2018). Ces résultats (qui dépassent le cadre de l'action et ne sont donc pas présentés ici) ont mis en évidence un impact fort et rapide du Cu (seul ou en mélange avec l'As) sur la structure génétique des communautés bactériennes et sur la plupart des fonctions analysées. A l'inverse, nous n'avons pas observé d'effet de l'As seul à partir des descripteurs considérés.

En complément, nous avons mesuré en fin d'expérience les niveaux de tolérance au Cu et à l'As des communautés exposées pendant 4 semaines aux différents traitements, à partir de tests de toxicité réalisés avec l'activité  $\beta$ -Glu après 4h d'exposition à des concentrations croissantes de ces deux métaux (testés individuellement).

Les tests de toxicité réalisés avec l'As ont permis d'obtenir des courbes dose-réponse et donc de mesurer la tolérance des communautés à ce métal mais ils n'ont pas permis de mettre en évidence une augmentation de cette tolérance suite à l'exposition chronique dans les traitements As et Mix. Cela est cohérent avec l'absence d'effet de l'As seul sur la structure des communautés bactériennes, qui suggère que le niveau d'exposition et la toxicité en résultant n'ont pas été suffisants pour induire le développement d'espèces plus résistantes au détriment des espèces les plus sensibles.

A l'inverse, les courbes dose-réponse obtenues avec le Cu (Fig. 4A) montrent clairement que les communautés exposées chroniquement au Cu (seul ou en mélange avec l'As) pendant 4 semaines dans les canaux artificiels (traitements Cu et Mix) sont devenues plus tolérantes à ce métal que les communautés non exposées au préalable à celui-ci (traitements Ref et As). Cela se traduit par une augmentation de leur capacité de tolérance au cours des tests de toxicité aigüe comme le démontre l'augmentation significative (d'un facteur 7 environ) des valeurs de  $CE_{50}$  (concentrations efficaces inhibant 50% de l'activité, exprimées ici en mg/kg ps) obtenues après modélisation de celles-ci (Fig. 4B).

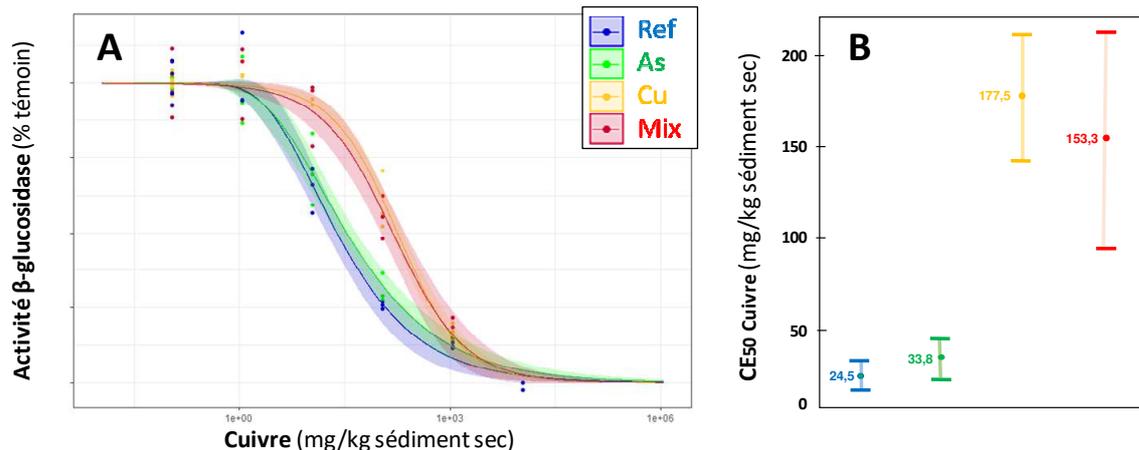


Figure 4 : (A) Courbes dose-réponse obtenues avec l'activité β-glucosidase après 4h d'exposition au cuivre ; (B)  $CE_{50}$  (valeurs moyennes ± intervalle de confiance 95%) associées (B). Chaque point représente un échantillon et la courbe en trait plein la modélisation de la courbe dose-réponse. La zone colorée correspond à l'intervalle de confiance à 95 %. Les concentrations et les  $CE_{50}$  sont exprimées en mg/kg poids sec

Ces résultats, associés aux changements que nous avons observés par ailleurs au niveau de la structure des communautés bactériennes chroniquement exposées au Cu (seul et en mélange), sont totalement en accord avec le concept PICT. En effet, l'augmentation de la tolérance confirme que les remaniements structurels engendrés par les effets toxiques du Cu traduisent la sélection d'espèces plus tolérantes. Ils démontrent donc que :

- le concept PICT est tout à fait applicable aux communautés microbiennes du sédiment et,
- que le protocole utilisé jusqu'alors avec les biofilms périphytiques est adapté pour mesurer les niveaux de tolérance de ce type de communautés aux métaux, incluant le Cu.

Les résultats de cette approche PICT, associée à l'étude de la diversité bactérienne (par approche de séquençage) et à la quantification de gènes de résistance au Cu, feront spécifiquement l'objet d'une publication scientifique internationale, actuellement en cours de rédaction.

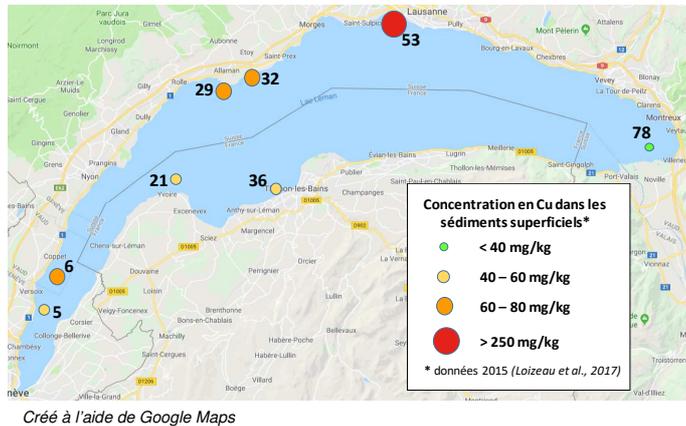
## 4. Application du protocole en milieu lacustre et en milieu lotique

Après avoir démontré expérimentalement l'applicabilité du concept PICT dans un contexte de contamination artificielle au Cu, nous avons décidé d'appliquer le même protocole à des sédiments naturellement contaminés par ce métal, dans le cadre de suivis réalisés en milieu lacustre (lac Léman) et dans différentes rivières localisées en région Rhône-Alpes.

### 4.1. Application en milieu lacustre : l'exemple du lac Léman

Le Lac Léman présente une superficie d'environ 580 km<sup>2</sup> pour une longueur de rives légèrement supérieure à 200 km. Il fait l'objet de nombreux suivis physico-chimiques (incluant les micropolluants) et biologiques, réalisés notamment dans le cadre des études pilotées par la Commission internationale pour la protection des eaux du Léman (CIPEL), organe inter-gouvernemental franco-suisse, qui contribue depuis 1963 à la coordination de la politique de l'eau à l'échelle du bassin versant lémanique.

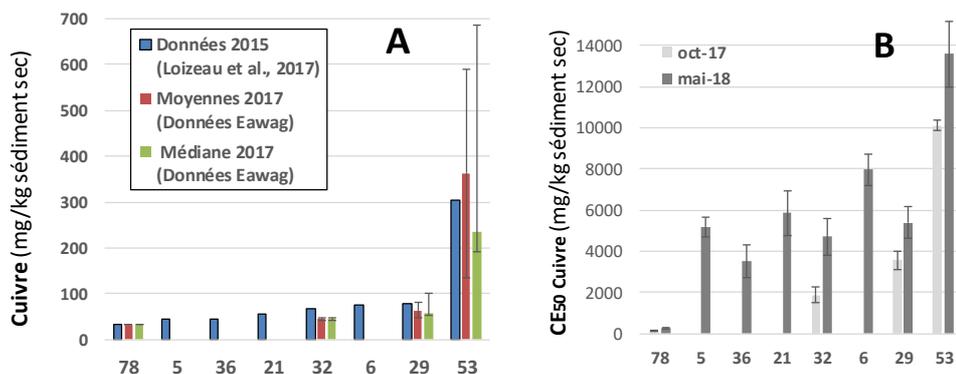
Une évaluation globale de la contamination des sédiments superficiels du Léman (métaux et nutriments) a été réalisée en 1988 dans le cadre de la CIPEL. Suite à celle-ci, une nouvelle campagne de prélèvements et d'analyses visant à évaluer l'état actuel des niveaux de contamination de ces sédiments par les micropolluants métalliques et organiques a été réalisée en 2015 par Loizeau et al. (2017). L'analyse des métaux traces sur 80 sites leur a permis de réaliser une cartographie de la contamination de la zone benthique par ces substances, à l'échelle du lac. Sur la base des concentrations en Cu mesurées, nous avons ainsi sélectionné 8 stations d'échantillonnage, réparties sur le pourtour du lac et présentant un gradient de contamination par ce métal. Celles-ci sont localisées sur la Fig. 5 (en conservant la numérotation utilisée par Loizeau et al., 2017 qui correspond à l'identification géographique établie par la CIPEL).



**Figure 5 :** Localisation des 8 stations d'échantillonnage sur le Lac Léman et classification en fonction des concentrations en cuivre mesuré en 2015 par Loizeau et al. (2017) dans les sédiments superficiels

Nous avons organisé deux campagnes de prélèvements, respectivement en octobre 2017 (uniquement sur les 4 stations 29, 32, 53 et 78) et mai 2018 (sur l'ensemble des 8 stations) afin d'évaluer la pertinence de l'approche PICT développée pour mettre en évidence l'impact de l'exposition au Cu sur les communautés microbiennes des sédiments superficiels. L'objectif était ainsi de vérifier si les variations spatio-temporelles des niveaux de tolérance mesurés étaient en adéquation avec celles des concentrations en Cu dans les sédiments superficiels. L'échantillonnage, effectué à une profondeur comprise entre 20 et 95 mètres en fonction des stations, a été réalisé à partir de trois prélèvements indépendants (triplicats) à l'aide d'une benne Ekman. Sur chacun des réplicats, la couche superficielle (i.e. les 3 premiers centimètres environ) a été prélevée et homogénéisée avant d'être distribuée en sous-échantillons destinés entre autre à la réalisation ultérieure des analyses chimiques (dosage de Cu, réalisé par l'équipe d'Ahmed Tlili, Eawag, Suisse) et des tests de toxicité dans le cadre de l'approche PICT.

La moyenne des concentrations en Cu mesurées dans les échantillons de sédiments prélevés en octobre 2017 diffère de 2 à 33% des concentrations mesurées sur les mêmes sites en 2015 (Fig. 6A). Compte tenu de l'hétérogénéité spatiale des sédiments et de l'incertitude concernant le point exact de prélèvement dans le fond du lac (en fonction des mouvements du bateau et de la benne lors de la descente en profondeur), ces variations temporelles peuvent être considérées comme relativement faibles. Les analyses de Cu dans les sédiments prélevés en mai 2018 sont encore en cours d'analyse dans les laboratoires de l'Eawag.

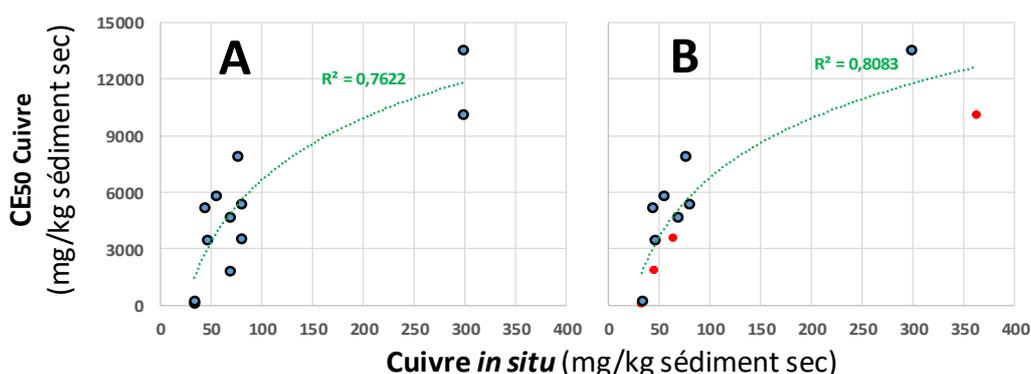


**Figure 6 :** (A) Concentrations en cuivre mesurées dans les sédiments superficiels du lac Léman en 2015 (Loizeau et al., 2017) et 2017 (Eawag, moyennes  $\pm$  écart-types ; médianes et valeurs minimales et maximales) sur les 8 stations d'échantillonnage ; (B) CE50 mesurées sur ces mêmes stations et exprimées en mg de Cu par kg de sédiment sec

Les niveaux de tolérance au Cu estimés à partir de la méthode développée sont illustrés sur la Fig. 6B. Ils mettent en évidence des variations spatiales très importantes à l'échelle du lac. En mai 2018, les valeurs moyennes de  $CE_{50}$  varient ainsi de 267 mg/kg ps au niveau de la station 78 à 13582 mg/kg ps au niveau de la station 53. Ces deux stations correspondent respectivement aux stations les moins et les plus contaminées par le Cu avec des concentrations moyennes de l'ordre de 33 mg/kg ps en 2015 et 2017 pour la station 78 et supérieures à 300 mg/kg ps ces deux années pour la station 53 (Fig. 6A). Les stations 5, 36 et 21, qui présentaient en 2015 des niveaux de contamination en Cu compris entre 40 et 60 mg/kg ps (Fig. 5 et Fig. 6A) sont caractérisées en mai 2018 par des valeurs moyennes de  $CE_{50}$  comprises entre 494 et 1079 mg/kg ps. Elles ne sont pas véritablement différenciées des stations 32, 6 et 29, qui présentaient en 2015 des niveaux de contamination en Cu compris entre 60 et 80 mg/kg ps (Fig. 5 et Fig. 6A) et qui sont caractérisées en mai 2018 par des valeurs moyennes de  $CE_{50}$  comprises entre 757 et 911 mg/kg ps. Cependant, ces niveaux de tolérance sont intermédiaires à ceux déterminés respectivement aux stations 78 et 53, ce qui est en accord avec les niveaux de contamination mesurés en 2015.

Nos résultats mettent également en évidence une variabilité temporelle assez marquée des niveaux de tolérance pour les quatre stations échantillonnées en octobre 2017 et en mai 2018. Ainsi, si les tendances spatiales sont identiques (communautés les plus sensibles = 78, sensibilité intermédiaire = 32 et 29, communautés les plus tolérantes = 53), les valeurs moyennes de  $CE_{50}$  mesurées sont sensiblement plus faibles en octobre qu'en mai, où elles augmentent de 34 à 139 % en fonction de la station considérée.

A ce stade, le niveau d'interprétation des variations spatiale et temporelle de la tolérance au Cu est limité par l'absence de données actualisées concernant les niveaux de contamination en Cu (en autres métaux) et d'autres paramètres importants tels que la granulométrie et le taux de matière organique pour chacune des stations. Ces données (complétées également par d'autres informations concernant la physico-chimie, l'activité et la biodiversité biologique ainsi que la toxicité des sédiments) sont en cours d'acquisition par l'ensemble des partenaires internationaux<sup>3</sup> impliqués sur ce suivi à l'échelle du Lac Léman. Cependant, il est intéressant de constater que malgré les imprécisions concernant l'estimation des niveaux de contamination réelle en 2018, **les résultats de l'approche PICT font apparaître une corrélation exponentielle assez remarquable entre, d'une part, l'ensemble des valeurs moyennes de  $CE_{50}$  obtenues lors des deux campagnes d'échantillonnage et, d'autre part, les niveaux de contamination des sédiments superficiels**, mesurés en 2015 (Fig. 7A,  $n=12$ ,  $R^2=0,76$ ) ou corrigés partiellement par les valeurs mesurées par l'Eawag concernant les 4 échantillons prélevés en octobre 2017, permettant ainsi d'améliorer légèrement le niveau de corrélation (Fig. 7B,  $n=12$ ,  $R^2=0,81$ ).



**Figure 7** : Illustration de la corrélation exponentielle observée entre les valeurs moyennes de  $CE_{50}$  obtenues lors des deux campagnes d'échantillonnage (octobre 2017,  $n=4$  et mai 2018,  $n=8$ ) et (A) les niveaux de contamination des sédiments superficiels, mesurés en 2015 ; ou (B) corrigés partiellement par les valeurs mesurées par l'Eawag concernant les 4 échantillons prélevés en octobre 2017 (représentés en rouge)

*Tous les résultats issus de ce suivi sur le lac Léman seront présentés et discutés dans un séminaire qui réunira courant 2019 les partenaires internationaux impliqués<sup>2</sup>. Les résultats de l'approche PICT seront ainsi mis en regard de l'ensemble des données environnementales obtenues et leur interprétation fine fera spécifiquement l'objet en 2020 d'un article scientifique dans une revue internationale.*

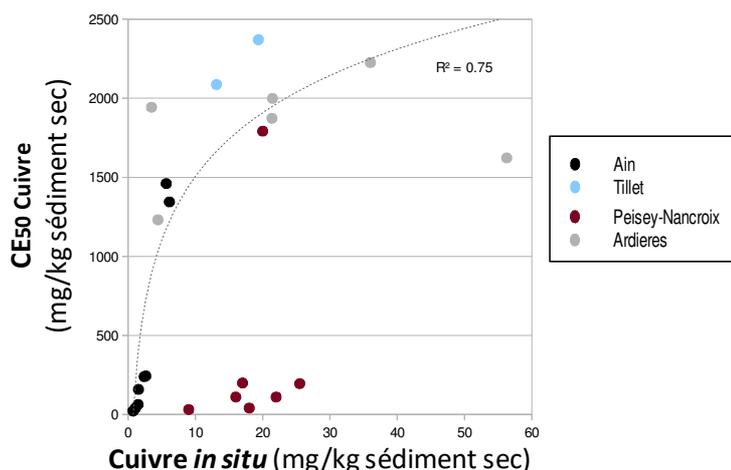
<sup>3</sup> 10 partenaires situés en France (Irstea, Université Savoie Mont Blanc, Université de Lorraine), Suisse (Centre Ecotox, Eawag, Université de Genève, EPFL), Allemagne (Bielefeld University, Ecosa) et Canada (Agriculture and Agri Food Canada) sont pour l'instant impliqués sur ce suivi qui vise à combiner différentes méthodes de chimie, écologie et écotoxicologie afin d'appréhender les liens entre i) la contamination des sédiments superficiels du Lac Léman par différents contaminants métalliques et organiques (PCB, HAP, substances pharmaceutiques...) et ii) la réponse structurelle et fonctionnelle des communautés benthiques de microorganismes et d'invertébrés.

## 4.2. Application en milieu lotique

L'approche PICT a également été appliquée dans plusieurs rivières de la région Auvergne-Rhône-Alpes présentant des niveaux et des types de contamination variées. Nous avons mené plusieurs campagnes sur ces différents sites afin de constituer une première base de données pour explorer les liens entre tolérance au Cu et contamination *in situ*. Ces sites sont brièvement décrits ci-après.

- sur **la rivière Ain**, la **station Pont-de-Chazay** a été choisie comme station de référence pour sa faible contamination au Cu. Quatre campagnes ont été menées sur cette station (hiver, été 2017, printemps, été 2018) ;
- sur **la rivière Ardieres**, en zone viticole du Beaujolais, nous avons sélectionné 3 stations (Chatillon, Montmay, Pizay) présentant un gradient croissant en contamination au Cu et aux pesticides en relation avec l'usage des sols. Deux campagnes ont été menées sur ces stations correspondant à une situation de pleine eau (mai 2017) et d'étiage (septembre 2017) ;
- sur **la rivière Tillet**, un affluent du lac du Bourget, nous avons sélectionné 3 stations (Amont, Méandre, Port) caractérisées par un gradient de contamination aux PCBs due à une ancienne pollution industrielle mais également par la présence de divers métaux dans les sédiments. Deux campagnes ont été menées en novembre 2017 et 2018 ;
- dans **la zone minière de Peisey-Nancroix**, nous avons étudié 7 stations de torrents de montagne caractérisées par des niveaux de contamination variables en métaux, notamment en plomb et en Cu. Une campagne a été menée en octobre 2018.

Sur chacune des stations étudiées, 3 échantillons de sédiment de surface (0-3 cm) ont été prélevés sauf pour la zone de Peisey-Nancroix où un seul échantillon a été prélevé par station. Les sédiments ont ensuite été tamisés à 2 mm et ramenés au laboratoire pour analyse. Les niveaux de tolérance au Cu ont été mesurés sur le sédiment frais suivant le protocole décrit en annexe. De plus, les niveaux de contamination en métaux (a minima Cu et plomb) ainsi que les caractéristiques physico-chimiques des sédiments prélevés ont également été déterminés. Les résultats de ces analyses sont présentés en Annexe 4.

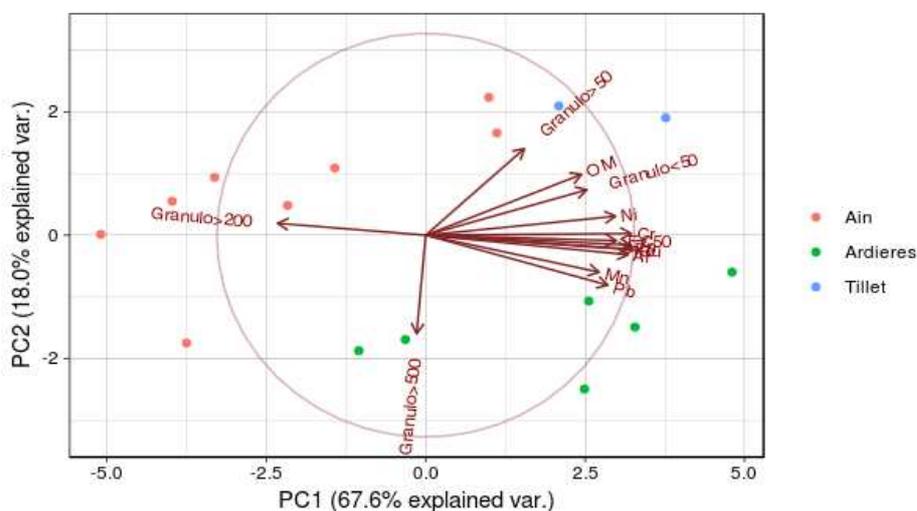


**Figure 8 :** Niveau de tolérance microbienne au cuivre ( $CE_{50}$ ) en fonction de la teneur en cuivre des sédiments pour les différents sites étudiés. La ligne en pointillé représente la relation exponentielle entre la  $CE_{50}$  et la concentration en cuivre pour tous les sites sauf ceux de Peisey-Nancroix

Les niveaux de tolérance au Cu, estimés à partir de la méthode développée et exprimés en fonction des concentrations en Cu mesurées dans les sédiments prélevés aux différentes stations, sont illustrés sur la Fig. 8.

Comme observé précédemment en milieu lacustre, la  $CE_{50}$  des communautés microbiennes de sédiments lotiques augmente en fonction du niveau de Cu dans les sédiments. Cette relation exponentielle est vérifiée pour tous les sites à l'exception des sédiments prélevés dans les torrents de la zone minière de Peisey-Nancroix (Fig. 8,  $n=16$ ,  $R^2 = 0,75$ ). En effet, les sédiments issus de cette zone sont caractérisés par des concentrations en Cu relativement proches (entre 16 et 25 mg Cu/kg pour toutes les stations sauf un à 9 mg Cu/kg) mais des niveaux de tolérance au Cu variables, avec des  $CE_{50}$  allant de 31 à 1792 mg Cu/kg sédiment sec. Les fortes concentrations en plomb retrouvées dans certains échantillons de la zone de Peisey-Nancroix n'ont pu être corrélées aux niveaux de tolérance au Cu (voir Annexe 4). Néanmoins, la présence d'autres métaux divalents (e.g. Cd, Zn) dans ces sédiments pourraient être à l'origine des différences de tolérance microbienne observées sur le site de Peisey-Nancroix, suivant le principe de co-tolérance.

Les caractéristiques du sédiment semblent donc en mesure d'influencer la tolérance des communautés microbiennes au Cu. Pour déterminer les paramètres ayant une influence importante sur les niveaux de tolérance, nous avons réalisé une analyse en composante principale (ACP) basée sur les caractéristiques des 16 stations suivant la relation exponentielle entre les CE<sub>50</sub> mesurées et les concentrations en Cu mesurées *in situ* (Fig. 9). La majorité de la variance des données est expliquée par l'axe 1. Elle montre une forte corrélation entre CE<sub>50</sub>, concentrations en métaux (notamment en Cu, Al, Fe, Cr et Zn), matière organique et proportion de sédiments très fins (granulométrie < 50µm). Cette ACP pourra être complétée ultérieurement en y incluant les caractéristiques physico-chimiques (% en matière organique, concentrations en cations) des sédiments, après acquisition de ces données.



**Figure 9 :** Résultats de l'analyse en composante principale des caractéristiques des sédiments prélevés sur l'Ain (en rose), l'Ardières (en vert) et le Tillet (en bleu). Les données en pourcentage ont été transformées par arcsinus de la racine carrée, les autres données ont été log-transformées, l'ACP a été réalisée sur les valeurs centrées et normées

**L'application de l'approche PICT en milieu lotique nous a permis de valider la corrélation entre tolérance microbienne au Cu et exposition *in situ*,** démontrée au laboratoire. Cette application démontre notamment que les facteurs influençant le plus largement la tolérance microbienne au Cu restent liés à la contamination métallique et à la biodisponibilité des métaux dans le sédiment. Cependant, elle met en évidence **l'influence potentielle des caractéristiques du sédiment sur la tolérance microbienne.** Il serait donc pertinent de renforcer la présente étude en explorant plus en détails les facteurs pouvant influencer les liens de causalité entre l'exposition au Cu et les niveaux de tolérance mesurés (*via* le renforcement du nombre de sites d'études et la vérification d'hypothèses dans des approches expérimentales contrôlées).

## 5. Recommandations méthodologiques pour la mise en œuvre de la méthode développée

Les applications mises en œuvre dans le cadre des différents suivis *in situ* ont permis d'améliorer la méthodologie visant à réaliser les tests de toxicité indispensables à la détection du PICT. A ce stade, elles nous permettent ainsi de proposer plusieurs recommandations quant à la stratégie d'échantillonnage et de conservation des sédiments afin de réaliser des tests de toxicité aigüe. De plus, nous avons parfois observé sur le terrain des incohérences entre le gradient de concentration en Cu dans les sédiments et le gradient de tolérance microbienne. Ces incohérences mettent en avant les limites de l'approche PICT et nous proposons ici des perspectives solides permettant de dépasser ces limites et de faciliter l'application de l'approche PICT aux sédiments.

### 5.1. Recommandations pour l'échantillonnage des sédiments en vue de réaliser les tests PICT

Le sédiment est par nature une matrice hétérogène et de précédents travaux réalisés dans le cadre du consortium AQUAREF ont mis en évidence l'importance de prendre en compte la variabilité spatiale des concentrations en contaminants dans les sédiments pour déterminer le niveau moyen de contamination d'une station de prélèvement (Schivone et al. 2011).

**La question de la variabilité spatiale se pose également concernant la mise en œuvre des approches PICT dans le sédiment** puisque celle-ci est potentiellement susceptible d'influencer la représentativité des niveaux de tolérance mesurés dans ce compartiment.

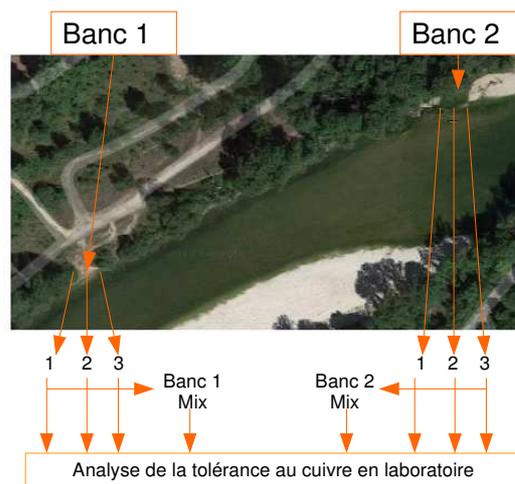
Afin d'appréhender l'importance de la variabilité spatiale sur la tolérance des communautés microbiennes de sédiments de rivière, nous avons choisi de mener une série de campagne d'échantillonnage au niveau de plusieurs points d'une station de référence située sur la rivière Ain (Pont de Chazey) et caractérisée par de très faibles concentrations en Cu. En nous inspirant du protocole présenté dans le rapport AQA-REF I-A-01 (Schiavone et al. 2011), nous avons réalisé 4 campagnes de prélèvement dans le but de définir un protocole d'échantillonnage du sédiment permettant d'obtenir des niveaux de tolérance des communautés microbiennes qui soient représentatifs de la station étudiée.

Ces campagnes de prélèvements ont été effectuées en février 2017, août 2017, avril 2018 et août 2018. A chacune de ces campagnes, des échantillons de sédiments ont été prélevés :

- sur 2 bancs de sédiments distincts d'environ 200 m pour évaluer l'impact du choix du site de prélèvement pour représenter la station;
- à 3 endroits distincts d'environ 50 cm sur chacun de ces bancs de sédiments, afin d'évaluer la variabilité au sein d'un banc de sédiment.

Pour chacun des bancs étudiés, un échantillon composite a également été réalisé en mélangeant à parts égales les 3 échantillons du banc de sédiment correspondant. Tous les échantillons de sédiment ont été tamisés à 2 mm sur le site puis ramenés au laboratoire pour mesurer la tolérance au Cu des communautés microbiennes associées au sédiment à partir du protocole développé.

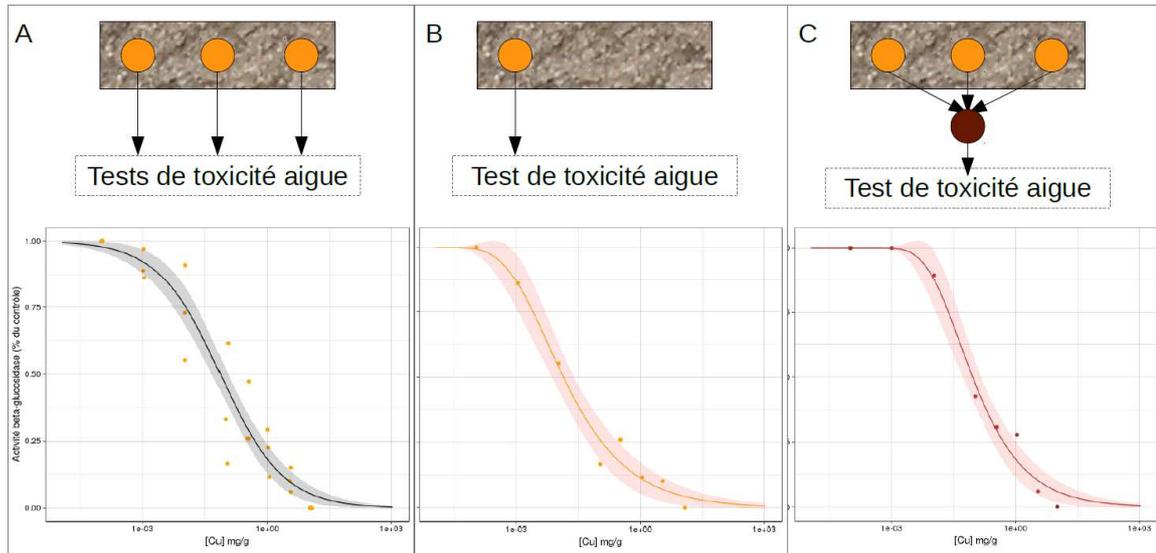
La stratégie d'échantillonnage décrite ci-dessus est illustrée sur la Fig. 10.



**Figure 10** : Description synthétique de la stratégie d'échantillonnage sur la station de référence de la rivière Ain (Pont-de-Chazey)

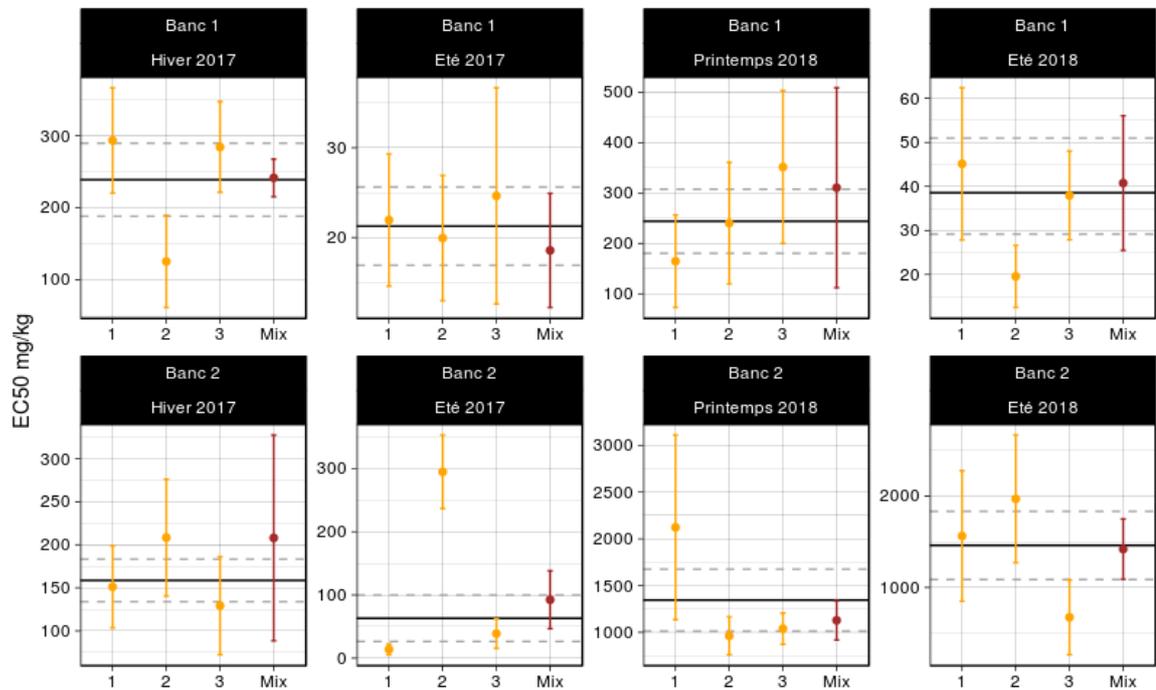
Dans un premier temps, nous avons déterminé la tolérance au Cu de chaque banc en nous basant sur les résultats des tests de toxicité réalisés sur les échantillons obtenus à partir des 3 prélèvements indépendants, en les incluant dans une seule et unique modélisation. Cette stratégie permet ainsi d'intégrer la variabilité biologique des 3 prélèvements dans la modélisation de la courbe dose-réponse (Fig. 11A). Cependant, elle est coûteuse en temps et en matériel car elle nécessite de réaliser 3 tests de toxicité aigüe pour chaque station étudiée. C'est pourquoi, nous avons également comparé ces résultats avec la tolérance au Cu mesurée de manière indépendante pour chaque échantillon de sédiment prélevé (Fig. 11B) y compris pour le mélange (Fig. 11C).

Les résultats des  $CE_{50}$  obtenus pour chaque prélèvement indépendant de sédiment montrent une forte hétérogénéité pour un même banc de sédiment (Fig. 12). Cette variabilité de tolérance reflète également une variabilité dans les niveaux d'exposition au Cu (Figure 13). Ainsi, lors de la campagne de prélèvement du printemps 2018, l'échantillon 1 du banc 2 présente une tolérance plus élevée au Cu ( $CE_{50}1 = 2,12$  g Cu/kg) que les 2 autres échantillons de ce banc ( $CE_{50}2=0,96$  g Cu/kg,  $CE_{50}3=1,04$  g Cu/kg). Les niveaux de Cu relevés dans cet échantillon sont également plus élevés ( $[Cu]1=7,64$  mg/kg) que dans les autres échantillons  $[Cu]2=5,22$  mg/kg,  $[Cu]3=5,54$  mg/kg).

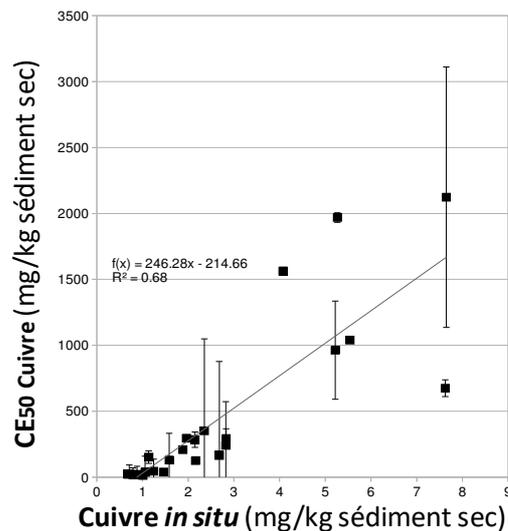


**Figure 11** : Description des 3 stratégies d'échantillonnage mises en œuvre sur le site de l'Ain. A : 3 échantillons de sédiments sont prélevés et analysés de manière indépendante, les résultats des 3 tests de toxicité sont utilisés pour modéliser une courbe dose-réponse et déterminer les valeurs seuils de toxicité. B : 1 échantillon de sédiment est prélevé et analysé, les résultats de ce test sont utilisés pour modéliser une courbe dose-réponse et déterminer les valeurs seuils de toxicité. C : 3 échantillons de sédiments sont prélevés et mélangés à parts égales avant de réaliser un test de toxicité dont les résultats sont utilisés pour modéliser une courbe dose-réponse et déterminer les valeurs seuils de toxicité

Les valeurs de  $CE_{50}$  obtenues à partir de l'analyse conjointe des 3 prélèvements indépendants ou à partir de l'analyse de l'échantillon de sédiment composite, sont proches de la moyenne des  $CE_{50}$  des 3 échantillons indépendants (Figure 12). Ces approches permettent donc d'intégrer la variabilité inhérente au sédiment et de limiter le poids des valeurs extrêmes. Les intervalles de confiance obtenus après l'analyse conjointe des 3 prélèvements indépendants représentent environ 15 à 25% de la valeur de la  $CE_{50}$  (sauf pour les résultats du Banc 1 au printemps 2018 où une valeur plus élevée de 58% a été obtenue) alors que la taille des intervalles de confiance obtenue après analyse de l'échantillon composite est plus variable allant de 11 à 64%.

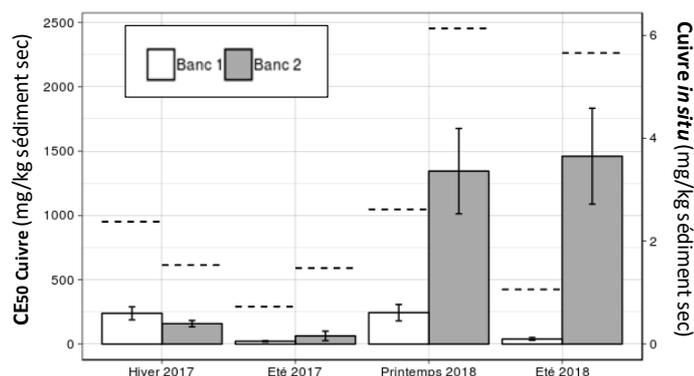


**Figure 12** :  $CE_{50}$  (mg Cu/ kg sédiment sec) et intervalle de confiance à 95% pour l'activité  $\beta$ -glucosidase des communautés microbiennes sédimentaires des différents prélèvements effectués sur le site de l'Ain au cours de 4 campagnes. Pour chaque campagne et chaque date, la ligne pleine représente la  $CE_{50}$  obtenue à partir des tests de toxicité réalisés de manière indépendante sur les 3 prélèvements de chaque banc, les lignes en pointillés correspondent à l'intervalle de confiance à 95%. Les points et barres d'erreur indiquent les  $CE_{50}$  (et intervalle de confiance à 95%) obtenues après l'analyse d'un seul échantillon de sédiment issu soit d'un prélèvement unique (en orange) soit du mélange des 3 prélèvements pour chaque banc (Mix, en marron). Les résultats sont utilisés pour modéliser une courbe dose-réponse et déterminer les valeurs seuils de toxicité



**Figure 13 :**  $CE_{50}$  (mg Cu/kg) en fonction de la concentration en cuivre *in situ* des échantillons de sédiment prélevés et analysés de manière indépendante. Les barres d'erreur indiquent les intervalles de confiance à 95%

Les niveaux de tolérance au Cu des communautés microbiennes prélevées sur le banc 1 se répètent d'une année sur l'autre avec une tolérance plus élevée en hiver ou au début du printemps qu'en été, ces niveaux de tolérance reflètent une variation similaire des niveaux de Cu dans le sédiment (Fig. 14). Les niveaux de tolérance des communautés microbiennes du 2ème banc de sédiment sont relativement proches de ceux du premier banc en 2017 mais considérablement plus élevées en 2018, reflétant les concentrations plus élevées de Cu retrouvées dans ces échantillons (Fig. 14).



**Figure 14 :**  $CE_{50}$  et intervalle de confiance à 95% issues de l'analyse de 3 échantillons de sédiments prélevés sur le banc 1 (histogramme blanc) et le banc 2 (histogramme gris) du site Pont-de-Chazay sur l'Ain. La moyenne des niveaux de cuivre dans les échantillons prélevés est indiquée par la ligne en pointillés

Les niveaux de tolérance microbienne étant conditionnés par l'exposition, la variabilité spatiale de la contamination des sédiments à l'échelle de la station va fortement influencer les résultats. Comme préconisé dans les rapports AQUAREF (Schiavone et al. 2011), **nous recommandons une identification précise des sites de prélèvement** (e.g. coordonnées GPS). Afin de caractériser au mieux l'impact de la contamination sur une station particulière, la détermination de la tolérance microbienne sur de nombreux échantillons de sédiment serait pertinente pour établir une cartographie de la tolérance microbienne de la station étudiée et diminuer l'influence de la variabilité spatiale sur la station étudiée. Des recherches supplémentaires sont néanmoins nécessaires pour déterminer le nombre minimal de prélèvements à effectuer pour cartographier au mieux une station, en fonction notamment des caractéristiques des sédiments et du contaminant étudié.

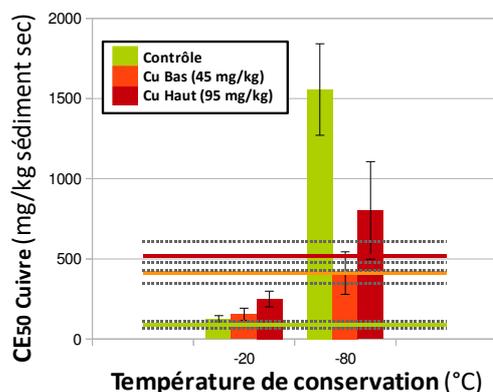
Afin d'être représentatif du banc de sédiment échantillonné, il est donc essentiel de prélever plusieurs échantillons par banc de sédiment. Pour intégrer la variabilité biologique de manière optimale **nous recommandons de réaliser au minimum 3 tests de toxicité indépendants sur 3 échantillons de sédiments prélevés indépendamment puis d'utiliser les résultats de ces 3 tests de toxicité pour modéliser la courbe dose-réponse correspondante et en déduire les valeurs seuils ainsi que les intervalles de confiance correspondants** (Fig. 11A). Cependant, **si les ressources sont limitées, il nous semble acceptable de réaliser un seul test de toxicité sur un échantillon composite de sédiment** réalisé en mélangeant à parts égales au moins 3 prélèvements indépendants réalisés sur le site.

## 5.2. Recommandations pour la conservation des sédiments en vue de réaliser les tests PICT

Les tests de toxicité réalisés dans le cadre de l'approche PICT ont pour objectif d'évaluer le potentiel de tolérance de la communauté microbienne indigène du site étudié. Il est donc essentiel, après échantillonnage, de préserver au maximum l'intégrité structurelle et fonctionnelle de la communauté prélevée et de limiter son évolution qui peut être relativement rapide. Les temps de génération des bactéries peuvent varier d'une quinzaine de minutes (en conditions optimales) à plusieurs jours. Dans ce contexte, nous avons mené plusieurs expériences pour déterminer des conditions de température et de durée de conservation des échantillons de sédiment n'affectant pas les résultats de l'approche PICT.

### 5.2.1. Température de conservation

Des échantillons de sédiments prélevés sur l'Ain ont été contaminés au laboratoire à deux niveaux de Cu (concentration finale en Cu de 45 mg/kg et de 95 mg/kg) suivant le protocole appliqué lors de l'expérience en canaux présentée comme preuve de concept (voir chapitre 3). Les sédiments contaminés ont ensuite été répartis dans des aquariums, selon trois conditions expérimentales testées en triplicats : « Contrôle » (sans ajout de cuivre), « Cu Bas » (45 mg Cu/kg) et « Cu Haut » (95 mg Cu/kg). Après 27 jours d'exposition, le potentiel de tolérance au Cu des échantillons frais a été déterminé afin d'établir une valeur de référence, une partie des sédiments des différentes conditions a également été conservée à -20°C ou à -80°C. Le potentiel de tolérance des échantillons congelés a ensuite été déterminé (après décongélation) dans les 2 mois suivants le prélèvement. Les résultats obtenus sont illustrés sur la Fig. 15.



**Figure 15 :**  $CE_{50}$  (mg Cu/ kg sédiment sec) et intervalle de confiance à 95% pour l'activité  $\beta$ -glucosidase des communautés microbiennes sédimentaires exposées pendant 27 jours à différents niveaux de cuivre (contrôle : vert ; 45 mg/kg : orange ; 95 mg/kg : rouge). Les histogrammes indiquent les valeurs de  $CE_{50}$  obtenues après congélation des échantillons à -20°C ou -80°C et sont comparées aux valeurs de référence du potentiel de tolérance obtenues sur le sédiment frais et indiquées par les lignes

Comme attendu, les communautés microbiennes pré-exposées au cuivre présentent un potentiel de tolérance plus élevé qui augmente avec la concentration d'exposition. Ainsi la  $CE_{50}$  des communautés microbiennes exposées à 95 mg Cu/kg ( $CE_{50}$ Cu Haut = 516 mg Cu/kg) est légèrement plus élevée que celle des communautés exposées à 45 mg Cu/kg ( $CE_{50}$ Cu Bas = 414 mg Cu/kg) et est presque 6 fois plus élevée que la  $CE_{50}$  des communautés microbiennes non exposées au Cu ( $CE_{50}$ Contrôle = 87 mg Cu/kg).

**Tableau 1 :** Moyenne et écartype de l'activité  $\beta$ -glucosidase (nmol/h/g sédiment sec) des communautés microbiennes sédimentaires contrôles et exposées pendant 27 jours à deux niveaux de cuivre distinct (n=3 pour chaque condition). Pour chaque condition, l'activité a été mesuré sur des sédiments frais (conservés à 4°C) ou après décongélation d'échantillons conservés à -20°C ou -80°C

	Température de conservation du sédiment	Activité beta-glucosidase (nmol/h/g sédiment sec)
Contrôle	4°C	27.6 ± 2.4
	-20°C	21.6 ± 1.1
	-80°C	6.9 ± 0.2
Exposition chronique à 45 mg Cu/kg	4°C	15.6 ± 0.6
	-20°C	20.4 ± 1.7
	-80°C	11.5 ± 0.6
Exposition chronique à 95 mg Cu/kg	4°C	13.6 ± 1.8
	-20°C	15.2 ± 2.0
	-80°C	7.7 ± 0.6

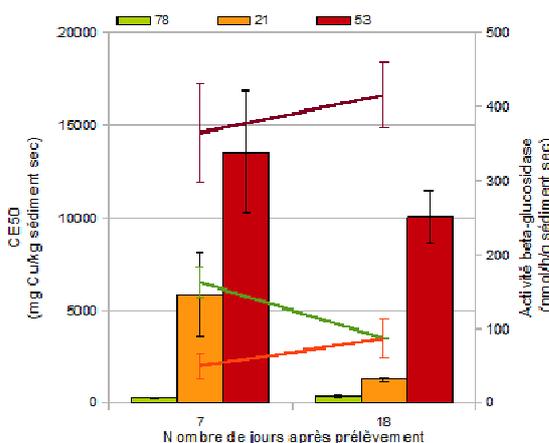
La congélation des sédiments a un effet négatif sur l'activité  $\beta$ -glucosidase, entraînant une diminution de cette activité notamment après congélation à  $-80^{\circ}\text{C}$  (Tableau 1). Cette baisse d'activité est possiblement due à la mortalité microbienne associée à la congélation, l'activité  $\beta$ -glucosidase observée étant alors générée par les enzymes extracellulaires résiduelles résistantes à la congélation. Les potentiels de tolérance déterminés après congélation sont différents des valeurs de référence et ne permettent pas de rendre compte de l'exposition chronique des communautés microbiennes au Cu (Fig. 15). De plus, la congélation à  $-80^{\circ}\text{C}$  augmente l'hétérogénéité entre les réplicats biologiques, entraînant alors une incertitude plus importante sur les valeurs-seuils obtenues (Fig. 15).

Au vu de ces résultats, **il est essentiel de réaliser les tests de toxicité aigüe sur des communautés microbiennes viables** pour déterminer leur potentiel réel de tolérance au cuivre et discriminer les historiques d'exposition. **Nous recommandons donc d'effectuer les tests PICT sur des sédiments non-congelés, conservés à  $4^{\circ}\text{C}$ .**

### 5.2.2. Durée de conservation

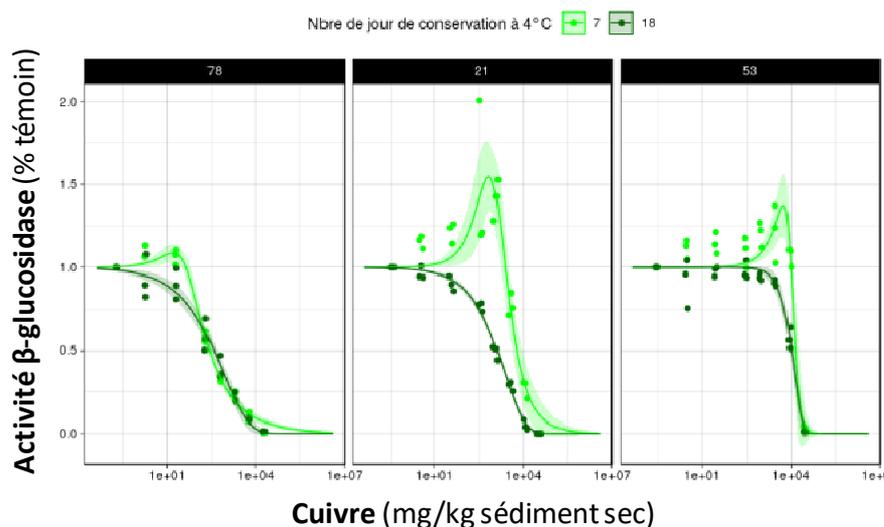
Lors d'études de terrain, il n'est pas toujours possible de réaliser rapidement les tests de toxicité et le délai entre le prélèvement et les analyses au laboratoire peut s'étendre à plusieurs jours. Nous avons donc testé deux durées de conservation à  $4^{\circ}\text{C}$  afin d'estimer un délai maximum entre le prélèvement et les analyses permettant une estimation correcte du potentiel de tolérance au Cu.

Pour cela, nous avons estimé le potentiel de tolérance au Cu de communautés microbiennes sédimentaires du lac Léman, après 7 et 18 jours de conservation à  $4^{\circ}\text{C}$  dans des contenants hermétiques. Trois stations ayant des niveaux de contamination en cuivre contrastés ont été sélectionnés pour cette étude réalisée lors de la campagne de mai 2018. Par ordre de concentrations croissantes en Cu, il s'agit des stations 78, 21 et 53 (voir Fig. 6A) qui présentaient des valeurs de  $CE_{50}$  respectivement proches de 270, 5870 et 13580 mg Cu/kg ps (Fig. 6B). Les résultats de ces tests sont illustrés sur la Fig. 16.



**Figure 16** :  $CE_{50}$  (histogramme, mg Cu/kg sédiment sec) et activité  $\beta$ -glucosidase basale (ligne, nmol/h/g sédiment sec) des communautés microbiennes sédimentaires du lac Léman mesurées 7 et 18 jours après le prélèvement (conservation à  $4^{\circ}\text{C}$ ). Les barres d'erreur correspondent à l'intervalle de confiance à 95% pour les  $CE_{50}$  et à la déviation standard pour l'activité  $\beta$ -glucosidase ( $n=3$ )

L'évolution de la communauté microbienne de la station moins contaminée (78) diffère de celles des communautés microbiennes des stations les plus contaminées (21, 53). Sur cette station, l'activité  $\beta$ -glucosidase basale des communautés microbiennes diminue au cours du temps alors que la  $CE_{50}$  augmente tandis que le phénomène inverse est observé pour les stations les plus contaminées. Cependant, après 7 et 18 jours de conservation, le classement des trois sites en fonction des niveaux de tolérance mesurés reste le même et reflète les niveaux d'exposition au Cu mesurés in situ (voir Fig. 6A). Lors des tests de toxicité aigüe, la durée de conservation à  $4^{\circ}\text{C}$  influence principalement la réponse des communautés microbiennes aux faibles concentrations en Cu. Ainsi, le phénomène d'hormèse (voir glossaire) observé sur les courbes dose-réponse des différentes stations 7 jours après le prélèvement n'est plus visible sur celles réalisées 18 jours après le prélèvement (Fig. 17).



**Figure 17** : Courbes dose-réponse obtenues avec l'activité  $\beta$ -glucosidase 7 jours (en vert clair) et 18 jours (en vert foncé) après le prélèvement dans le lac Léman. Les lignes correspondent à la modélisation de la courbe dose-réponse et de son intervalle de confiance à 95% ; les points correspondent aux valeurs mesurées. Les 3 stations de prélèvement étudiées sont indiquées au-dessus de chaque graphe et classées de la moins contaminée à la plus contaminée en cuivre : 78, 21, 53

Afin de refléter au mieux le potentiel de tolérance des communautés microbiennes *in situ*, nous recommandons de réaliser les tests de toxicité aiguë sur du sédiment frais aussi vite que possible et dans un délai raisonnable de 15 jours maximum après le prélèvement. Pour déterminer des concentrations entraînant de faibles effets biologiques (e.g. EC10, NOEC, LOEC), nous recommandons néanmoins de réaliser les tests dans les 7 jours suivant le prélèvement.

### 5.3 Limites de la méthode actuelle et perspectives d'amélioration

Grâce aux nombreuses campagnes de terrain réalisées en milieux lacustres et lotiques, nous avons pu vérifier la corrélation entre l'exposition des communautés microbiennes sédimentaires au Cu *in situ* et leur niveau de tolérance à ce métal, mesuré au laboratoire. Cependant, des recherches sont encore nécessaires pour améliorer la méthode actuelle et faciliter son application par les gestionnaires de l'environnement. Nous avons ainsi identifié deux perspectives majeures d'amélioration, qui sont :

- une meilleure prise en compte de l'influence des caractéristiques du sédiment sur la biodisponibilité des contaminants (i. e. effet matrice) et ses conséquences sur la mesure des niveaux de tolérance,
- la définition de valeurs-seuils absolues permettant de s'affranchir du besoin de considérer une ou plusieurs stations de référence lors de chaque cas d'étude.

#### 5.3.1. Importance de l'effet matrice

Les disparités entre les valeurs de CE<sub>50</sub> obtenus et les concentrations en Cu dans certains sédiments (comme par exemple ceux prélevés sur la zone de Peisey-Nancroix) attestent de l'influence d'autres facteurs sur les niveaux de tolérance mesurés. En fonction des conditions physico-chimiques (notamment redox), les métaux divalents, comme le Cu, peuvent se lier fortement aux oxydes ferriques (ou de manganèse), aux sulfides, aux carbonates ou à la matière organique (pour plus de détails se référer à la revue de Väänänen et al., 2018). C'est pourquoi la concentration mesurée dans le sédiment ne reflète pas toujours la quantité de Cu biodisponible à laquelle les communautés sont réellement exposées *in situ*. Ce constat est également applicable dans le cadre des tests de toxicité aiguë au Cu, qui sont indispensables à l'estimation des niveaux de tolérance de la communauté microbienne. Par exemple, lors de ces tests, la présence d'oxydes de fer en fortes concentrations peut réduire la biodisponibilité du Cu et fausser l'interprétation des courbes dose-réponse, du fait d'une surestimation des niveaux d'exposition aiguë. Dans un tel cas de figure, les communautés microbiennes testées peuvent alors apparaître plus tolérantes qu'elles ne le sont vraiment alors qu'elles ont simplement été exposées à des doses biodisponibles plus faibles.

L'effet matrice peut également être particulièrement gênant lorsqu'il est nécessaire de comparer les niveaux de tolérance de communautés microbiennes associées à des sédiments ayant des caractéristiques très différentes, notamment en terme de granulométrie, de pourcentage (et de qualité) de matière organique, etc.

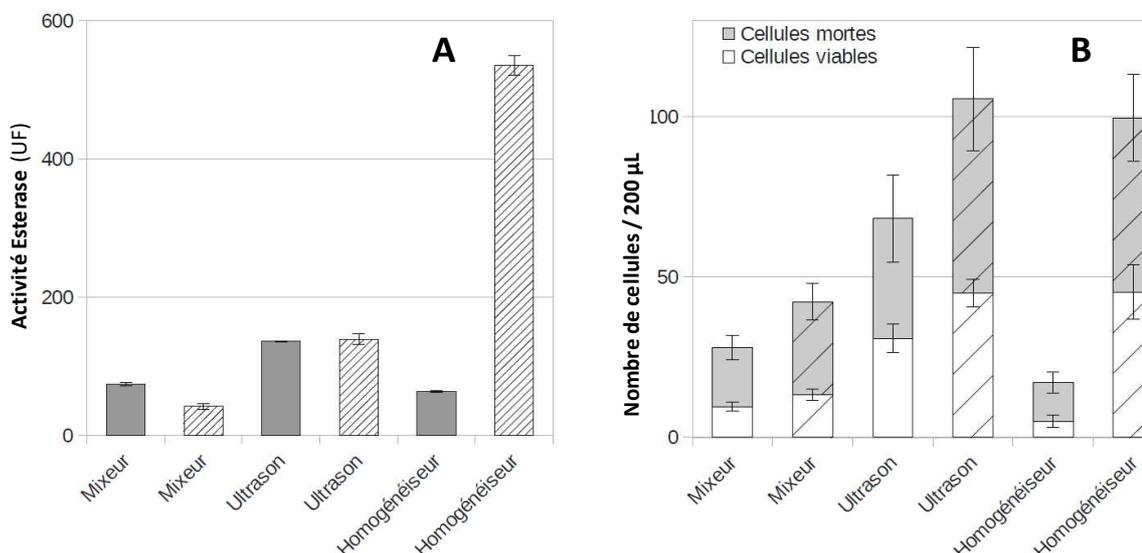
Dans ce contexte, mesurer la sensibilité des communautés microbiennes du sédiment à des contaminants hydrophobes, s'absorbant rapidement aux sédiments, tels que les HAPs ou PCBs représente un réel défi. Pour pouvoir relever ce défi et étendre la gamme des contaminants testés de l'approche PICT appliquée aux sédiments, il est essentiel de pouvoir s'affranchir de l'effet matrice dans les tests de toxicité aiguë.

### 5.3.2. Détacher les communautés microbiennes du sédiment pour limiter l'effet matrice

Pour limiter l'influence des caractéristiques du sédiment sur la biodisponibilité du contaminant pendant les tests de toxicité aiguë, nous proposons de détacher les communautés microbiennes sédimentaires de leur support et de mesurer la tolérance sur l'extrait microbien ainsi obtenu. Pour cela, il est essentiel que les bactéries détachées soient viables et actives. Suite à une recherche bibliographique, nous avons sélectionné trois méthodes de détachement physique (mixeur, homogénéiseur, bain à ultrason) que nous avons ensuite testées en utilisant soit de l'eau déminéralisée, soit un tampon pyrophosphate (sodium pyrophosphate décahydrate à 1g/L). Pour estimer la viabilité et la quantité de bactéries dans l'extrait microbien, nous avons mesuré différents indicateurs :

- l'activité estérase comme indicateur de viabilité;
- le nombre de bactéries totales et viables par comptage au microscope à épifluorescence des solutions microbiennes marquées au SYTO 9 et à l'iodure de propidium (kit LIVE/DEAD BacLight Bacterial Viability kit – Invitrogen) ;
- la concentration totale en protéines (par la méthode de Bradford) comme indicateur grossier de biomasse microbienne détachée (incluant les bactéries vivantes, mortes comme les enzymes extra-cellulaires).

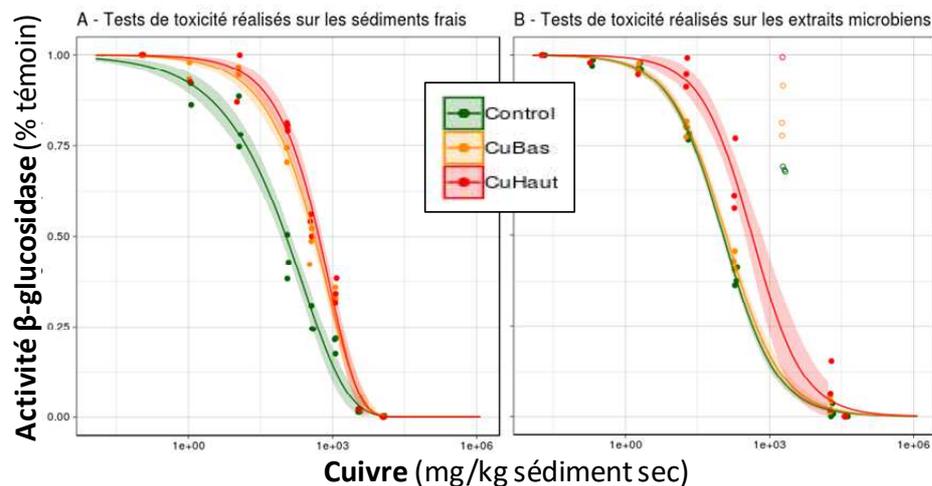
Les résultats obtenus à partir de ces indicateurs sont présentés sur la Fig. 18.



**Figure 18 :** Activité estérase (A), densité et viabilité (B) des extraits microbiens après détachement des communautés microbiennes en utilisant un mixeur, un bain à ultrasons ou un homogénéiseur. Chaque méthode a été réalisée avec de l'eau déminéralisée (histogramme plein) ou du tampon pyrophosphate (histogramme hachuré)

**L'utilisation d'un homogénéiseur pour détacher les communautés microbiennes du sédiment dans un tampon pyrophosphate est la méthode qui permet d'obtenir la plus grande quantité de cellules viables et actives** (Fig. 18).

Nous avons ensuite testé si cette méthode d'extraction pouvait être appliquée dans le cadre d'une approche PICT. Pour cela, nous avons utilisé des sédiments présentant des niveaux de cuivre contrastés (contrôle, 45 mg Cu/kg, 95 mg Cu/kg) en utilisant la stratégie expérimentale en microcosmes décrite au paragraphe 5.2.1. Dans ce contexte, la tolérance des communautés microbiennes attachées au sédiment a été comparée à celle des communautés microbiennes préalablement détachées de celui-ci grâce à la méthode sélectionnée (Fig.19).



**Figure 19** : Courbes dose-réponse obtenues avec l'activité  $\beta$ -glucosidase pour des communautés microbiennes attachées au sédiment (A) ou dans des extraits après détachement de celui-ci (B). Les sédiments ont été préalablement exposés pendant 27 jours à des niveaux de cuivre contrastés (contrôle en vert, CuBas : 45 mg Cu /kg en orange, CuHaut : 95 mg Cu/kg en rouge). Les points représentent les valeurs expérimentales, les lignes : l'ajustement des modèles de courbes dose-réponse, les zones colorées : l'intervalle de confiance à 95% du modèle. Les cercles vides sur le Panel B correspondent à des valeurs expérimentales qui n'ont pas été prises en compte lors de la modélisation des courbes doses-réponses

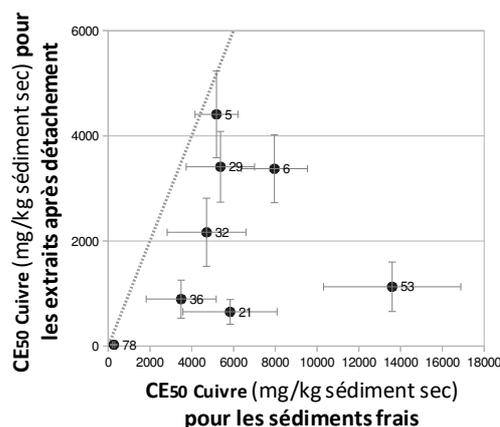
Les analyses sur les sédiments frais comme les analyses sur les communautés détachées permettent de différencier clairement les communautés microbiennes contrôles des communautés microbiennes exposées à 95 mg Cu / kg (Figure 12) avec des  $CE_{50}$  relativement proches entre les deux méthodes (Tableau 2). Cependant, les analyses réalisées à partir des sédiments exposés à 45 mg Cu/kg montrent une tolérance au Cu plus importante pour les communautés microbiennes attachées aux sédiments frais comparativement à celle des communautés microbiennes détachées (Fig.19, Tableau 2). Ces résultats pourraient s'expliquer par l'effet protecteur de la matrice sédiment pendant le test de toxicité aigüe ou par une sélection d'espèces plus sensibles au Cu lors du détachement. En effet, le détachement des communautés microbiennes du sédiment nous permet d'obtenir un échantillon de celle-ci, dont la représentativité par rapport à la communauté initiale n'a pas été vérifiée pour le moment.

**Tableau 2** :  $CE_{50}$  (mg/kg) des communautés microbiennes du sédiment exposées pendant 27 jours à des niveaux de cuivre contrastés, mesurées sur le sédiment frais ou sur des extraits des communautés microbiennes après détachement

Exposition chronique	$CE_{50}$ (mg/kg)	
	Sédiment frais	Extraits microbiens
contrôle	107,6	108,5
	[79 ; 136,2]	[98,9 ; 118,1]
45 mg Cu/kg	413,9	125,3
	[347 ; 480,8]	[108,7 ; 141,8]
95 mg Cu/kg	516,2	431
	[425,6 ; 606,7]	[256,5 ; 605,4]

Nous avons testé l'application de cette méthode de détachement des communautés microbiennes lors de la campagne de Mai 2018 réalisée sur le lac Léman. Sur chacune des stations, les niveaux de tolérance ont été estimés sur le sédiment frais (voir 4.1, Fig. 6B) ainsi que sur des extraits microbiens réalisés en homogénéisant le sédiment prélevé dans du tampon pyrophosphate (Fig. 20).

Les  $CE_{50}$  des extraits microbiens après détachement des communautés sont généralement plus faibles que celles mesurées directement sur le sédiment frais (Fig. 20). De plus, les disparités sont d'autant plus importantes lorsque la tolérance au cuivre estimée sur sédiment frais est importante (e.g. station 6 et 53). Comme remarqué précédemment, ces disparités peuvent être dues à un effet protecteur de la matrice sédiment qui fait apparaître les communautés microbiennes plus tolérantes qu'elles ne le sont en réalité. Une sélection différentielle des communautés microbiennes lors de l'étape de détachement pourrait également expliquer une plus grande sensibilité des extraits microbiens.



**Figure 20 :** Comparaison des  $CE_{50}$  (mg Cu/kg) des extraits microbiens après détachement avec celles des sédiments frais du lac Léman en Mai 2018. Les nombres à côté de chaque point indiquent la station du lac Léman correspondante. Les barres d'erreur correspondent à l'intervalle de confiance à 95%. La ligne pointillée indique la droite  $x=y$

**La méthode de détachement microbienne mise au point par notre équipe est très prometteuse.** En permettant de s'affranchir de l'effet matrice lors des tests de toxicités indispensables dans l'approche PICT, cette méthode faciliterait la comparaison de la tolérance microbienne entre sites et permettrait également d'étendre la gamme de contaminants à tester. De plus cette méthode permet de réaliser les tests de toxicité en microplaques et non en tubes de 10 mL comme c'est actuellement le cas pour les tests sur sédiments frais. Cette miniaturisation permet un gain de temps et de réactifs (diminution des volumes utilisés) non-négligeable.

**Des recherches supplémentaires sont néanmoins nécessaires pour mieux comprendre les disparités observées entre les niveaux de tolérance mesurés à partir des extraits microbiens après détachement et ceux obtenus avec les sédiments frais.** Pour cela, il faudrait d'une part vérifier la représentativité de la communauté microbienne des extraits par rapport à celle des sédiments frais en recourant à des analyses de diversité génomique (e.g. par géotypage ou metabarcoding). D'autre part, une série d'expériences simples devraient être menées en laboratoire pour estimer la part de l'effet protecteur de la matrice sédiment dans la tolérance des communautés microbiennes au cuivre (ou à d'autres contaminants).

### 5.3.3. Vers la définition de valeurs-seuils d'exposition à partir des niveaux de tolérance mesurés (valeurs de CEx)

**Jusqu'à présent, l'approche PICT a été utilisée comme un outil de comparaison relative, permettant de comparer la tolérance d'une communauté microbienne exposée avec celle d'une communauté « de référence ».** Nos stratégies d'échantillonnage ont été construites en suivant ce principe, afin de nous permettre d'obtenir des niveaux de tolérance pour une large gamme de concentration au Cu. L'utilisation d'un protocole standardisé dans toutes nos campagnes de prélèvement nous a permis de comparer les niveaux de tolérance entre différentes rivières (Tillet, Ardières, Ain) et de mettre en évidence une corrélation entre niveau de tolérance microbienne et concentration en Cu dans les sédiments. **Cette corrélation, indépendante du site étudié, indique la possibilité d'établir des valeurs seuils des niveaux de tolérance.** Ainsi, alors que les sites peu pollués que nous avons étudiés sont caractérisés par une  $CE_{50}$  inférieure à 500 mg/kg, une faible augmentation de la concentration en cuivre à 4,2 mg Cu/kg entraîne un doublement de cette  $CE_{50}$ . A partir de 10 mg Cu/kg, la  $CE_{50}$  atteint 1500 mg Cu/kg. Ces modifications du niveau de tolérance à des seuils d'exposition chronique au Cu limités indiquent que des concentrations relativement faibles peuvent être suffisantes pour modifier les communautés microbiennes et induire une acquisition de tolérance mesurable. Les concentrations seuils que nous indiquons ici sont beaucoup plus faibles que les ratios communément admis pour le Cu dans le sédiment soit un seuil d'effet toxique à 31,6 mg/kg (TEC : threshold effect concentrations, MacDonald et al., 2000) et une concentration probable d'effet toxique à 149 mg Cu/kg (PEC : probable effect concentration, MacDonald et al., 2000). Les corrélations mises en évidence doivent néanmoins être consolidées par d'autres résultats issues de campagnes de prélèvement en lacs et rivières. **Une attention particulière doit également être apportée aux valeurs extrêmes afin de mieux comprendre quelles sont les caractéristiques du sédiment (e.g. granulométrie, % matière organique) qui influencent la tolérance microbienne au Cu** et comment les prendre en compte pour mieux faire le lien entre réponse biologique et exposition.

**Une attention particulière doit également être portée sur la présence d'autres éléments métalliques qui peuvent induire des phénomènes de cotoxérance ou de sensibilité croisée.** Par exemple, Tlili et al. (2011b) ont démontré à partir de travaux réalisés sur des biofilms périphytiques que des communautés microbiennes hétérotrophes exposées au Cu pouvait devenir plus tolérantes au zinc, et vice-versa. A l'inverse, leurs travaux ont démontré l'absence de cotoxérance ente le Cu et l'arsenic (à l'instar des résultats que nous avons obtenus lors de l'étude expérimentale en canaux artificiels, voir ch. 3) alors que des communautés exposées au Cu ou au zinc se retrouvait plus vulnérable face à la toxicité de l'arsenic (illustrant ainsi le phénomène de sensibilité croisée).

L'approche PICT permet de faire le lien entre une réponse biologique (i.e. l'acquisition de tolérance) et la biodisponibilité d'un contaminant (ou d'une famille de contaminants) dans le milieu. **La mesure des niveaux de tolérance dans le sédiment représente donc un marqueur pertinent d'exposition.** Néanmoins, bien qu'indiquant le dépassement d'un seuil d'exposition suffisant pour induire une réponse biologique à l'échelle d'une communauté naturelle, l'observation d'une acquisition de tolérance seule ne donne pas d'indication sur ses conséquences en termes de structure microbienne (i.e. impact sur la biodiversité taxonomique et fonctionnelle) et de fonctionnement de la communauté microbienne voire de l'écosystème.

## 6. Conclusion

A notre connaissance, cette étude est la première qui explore le potentiel de l'approche PICT pour mettre en évidence un impact écotoxicologique de contaminants métalliques dans le compartiment sédimentaire. **Le couplage entre d'une part, des campagnes d'échantillonnage en milieu lotique et lacustre et, d'autre part, des développements méthodologiques en laboratoire, nous a permis de proposer une méthodologie robuste.** Celle-ci tient compte de toutes les étapes, depuis l'échantillonnage jusqu'à l'analyse des courbes dose-réponse permettant de déterminer les niveaux de tolérance. **Développée en prenant comme modèle le Cu, cette méthodologie est applicable à d'autres types de composés métalliques.**

La mise en œuvre de cette méthode dans différents écosystèmes a permis de démontrer son **fort potentiel opérationnel pour répondre au besoin de marqueurs biologiques d'exposition dans le compartiment sédimentaire** afin de compléter les méthodes de bioindication existantes, peu adaptées à la problématique des contaminants toxiques. A ce stade, elle est par exemple **directement applicable pour suivre l'évolution temporelle de la qualité écotoxicologique d'une station donnée, dans un contexte de dégradation ou au contraire d'amélioration de la qualité chimique en lien avec la contamination métallique** (e.g. pour évaluer l'efficacité de mesures visant à réduire localement l'impact de ce type de contamination).

En complément, notre travail fait ressortir deux perspectives principales d'amélioration de cette approche pour renforcer son caractère opérationnel :

- 1) Sur la base de la méthode développée, la première concerne la définition de valeurs-seuils d'exposition à partir des niveaux de tolérance mesurés, afin de s'affranchir du besoin de mettre en œuvre une démarche de comparaison relative, basée sur la comparaison de la tolérance d'une communauté microbienne exposée avec celle d'une communauté « de référence ». Pour ce faire, **il serait nécessaire de déployer la méthode développée à large échelle géographique, en multipliant le nombre de stations de prélèvements, incluant des sites de référence, peu contaminés, et des sites présentant des niveaux de contamination contrastés** afin de constituer une base de données robuste.
- 2) La deuxième concerne l'élaboration d'une méthode permettant de s'affranchir de « l'effet matrice » en passant par une étape de détachement des communautés microbiennes du sédiment avant la réalisation des tests de toxicité visant à mesurer les niveaux de tolérance. Une telle méthode offrirait également la possibilité de miniaturiser les protocoles et de les automatiser, ce qui pourrait grandement faciliter son transfert opérationnel. Nous avons travaillé sur ce point en proposant **une première méthode de détachement microbienne très prometteuse. Des recherches supplémentaires sont néanmoins nécessaires pour vérifier que cette méthode est applicable à tout type de sédiment et qu'elle ne fausse pas les conclusions fournies par les résultats des approches PICT.**

## 7. Glossaire

**Hormèse** : Dans notre cas, ce terme désigne une stimulation de l'activité biologique mesurée (ici l'activité  $\beta$ -glucosidase) lors du test de toxicité, en réponse à l'exposition aux plus faibles doses du toxique testé (ici le cuivre). Du fait de ce mécanisme, le cuivre peut donc avoir un effet opposé durant le test de toxicité suivant que la dose reçue est faible (stimulation de l'activité) ou forte (inhibition de l'activité)

## 8. Sigles & Abréviations

**AFB** : Agence Française pour la Biodiversité

**CE<sub>50</sub>** : Concentration Efficace inhibant 50% de l'activité mesurée lors d'un test de toxicité

**Irstea** : Institut national de recherche en sciences et technologies pour l'environnement et l'agriculture

**MUF-Glu** : 4-methylumbelliféryl- $\beta$ -D-glucopyranoside

**PICT** : Pollution Induced Community Tolerance (tolérance des communautés induite par une exposition chronique aux contaminants)

**$\beta$ -Glu** : Activité enzymatique beta-glucosidase

## 9. Bibliographie

Barman TE (1969). Enzyme handbook, Berlin, New York : Springer-Verlag 928

Blanck H, Wängberg SA, Molander S (1988). Pollution-induced community tolerance – a new ecotoxicological tool. In: Cairns J, Pratt JR (Eds), Functional testing of aquatic biota for estimating hazards of chemicals, Philadelphia, ASTM STP 988: 219-230.

Chróst RJ (1991) Environmental control of the synthesis and activity of aquatic microbial ectoenzymes. In Microbial enzymes in aquatic environments. Springer New York : 29-59

Corcoll N, Acuna V, Barcelo D, Casellas M, Guasch H, Huerta B, Petrovic M, Ponsati L, Rodriguez-Mozaz S, Sabater S (2014). Pollution-induced community tolerance to non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) in fluvial biofilm communities affected by WWTP effluents. Chemosphere 112: 185-193.

Dorigo U, Bérard A, Rimet F, Bouchez A, Montuelle B (2010). In situ assessment of periphyton recovery in a river contaminated by pesticides. Aquatic Toxicology 98: 396-406.

DREAL-REMIPP, 2013. Micropolluants dans les sédiments de la région Rhône-Alpes. Données cours d'eau et plans d'eau 2006-2011. ISBN: 978-2-11-129823-1, 84 p.

European Commission (2014). Technical Report on Aquatic Effect-based Monitoring Tools (No. 077)

Faburé J, Dufour M, Autret A, Uher E, Fechner LC (2015). Impact of an urban multi-metal contamination gradient: Metal bioaccumulation and tolerance of river biofilms collected in different seasons. Aquatic Toxicology 159: 276-289.

Fechner LC, Versace F, Gourlay-Francé C, Tusseau-Vuillemin MH (2012). Adaptation of copper community tolerance levels after biofilm transplantation in an urban river. Aquatic Toxicology 106-107: 32-41.

Fechner LC, Gourlay-Francé C, Tusseau-Vuillemin MH (2014). Linking community tolerance and structure with low metallic contamination: A field study on 13 biofilms sampled across the Seine river basin. Water Research 51: 152-162.

Gessner MO, Tilili A (2016). Fostering integration of freshwater ecology with ecotoxicology. Freshwater Biology 61: 1991-2001.

Ghiglione JF, Martin-Laurent F, Pesce S (2016). Microbial ecotoxicology: an emerging discipline facing contemporary environmental threats. Environmental Science and Pollution Research 23: 3981-3983

Grosjean P. (2017). SciViews: A GUI API for R. UMONS, Mons, Belgium. URL <http://www.sciviews.org/SciViews-R>.

INERIS, 2010. Qualité chimique des sédiments fluviaux en France. Synthèse des bases de données disponibles. Rapport d'étude. N° INERIS-DRC-10-105335-04971A, 99 p.

- Larras F, Rimet F, Gregorio V, Berard A, Leboulanger C, Montuelle B, Bouchez A (2016). Pollution-induced community tolerance (PICT) as a tool for monitoring Lake Geneva long-term in situ ecotoxic restoration from herbicide contamination. *Environmental Science and Pollution Research*, 23: 4301-4311.
- Loizeau JL, Makri S, Arpagaus P, Ferrari B, Casado-Martinez C, Benejam T, Marchand P, 2017. Micropolluants métalliques et organiques dans les sédiments superficiels du Léman. *Rapp. Comm. int. prot. eaux Léman contre pollut.*, Campagne 2016, 153-207.
- Mahamoud Ahmed A, Lyautey E, Bonnineau C, Dabrin A, Pesce S (2018). Environmental concentrations of copper, alone or in mixture with arsenic, can impact river sediment microbial community structure and functions. *Frontiers in Microbiology* 9, 1852
- MacDonald, D.D., Ingersoll, C.G., and Berger, T.A. (2000). Development and Evaluation of Consensus-Based Sediment Quality Guidelines for Freshwater Ecosystems. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 39, 20–31.
- Molander S, Blanck H (1992) Detection of pollution-induced community tolerance (PICT) in marine periphyton communities established under diuron exposure. *Aquatic Toxicology* 22: 129-143
- Montuelle B, Dorigo U, Bérard A, Volat B, Bouchez A, Tlili A, Gouy V, Pesce S (2010). The periphyton as a multimetric bioindicator for assessing the impact of land use on rivers: an overview of the Ardières-Morcille experimental watershed (France). *Hydrobiologia* 657:123–141.
- Ogilvie LA, Grant A, 2008. Linking pollution induced community tolerance (PICT) and microbial community structure in chronically metal polluted estuarine sediments. *Marine Environmental Research* 65:187-98.
- Pesce S, Bouchez A, Montuelle B (2011). Effects of Organic Herbicides on Phototrophic Microbial Communities in Freshwater Ecosystems. *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology* 214: 87-124.
- Pesce S, Margoum C, Foulquier A (2016). Pollution-induced community tolerance for in situ assessment of recovery in river microbial communities following the ban of the herbicide diuron: Agriculture, Ecosystems and Environment 221: 79-86.
- Pesce S, Perceval O, Bonnineau C, Casado-Martinez C, Dabrin A, Lyautey E, Naffrechoux E, Ferrari BJD (2018). Looking at biological community level to improve ecotoxicological assessment of freshwater sediments: report on a first French-Swiss workshop. *Environmental Science and Pollution Research* 25: 970–974.
- R Core Team (2017). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL <https://www.R-project.org/>.
- Ritz C, Baty F, Streibig JC, Gerhard D (2015). Dose-Response Analysis Using R *PLOS ONE*, 10: e0146021
- Schiavone S., Ghestem J.-P., Coquery M. (2011). Incertitudes liées à l'échantillonnage : exemple d'estimation pour la mesure des micropolluants dans les sédiments. *Cemagref*, 88 p
- Tlili A, Bérard A, Blanck H, Bouchez A, Cássio F, Eriksson KM, Morin S, Montuelle B, Navarro E, Pascoal C, Pesce S, Schmitt-Jansen M, Behra R (2016). Pollution-induced community tolerance (PICT): Towards an ecologically relevant risk assessment of chemicals in aquatic systems: *Freshwater Biology* 61: 2141-215
- Tlili A, Corcoll N, Bonet B, Morin S, Montuelle B, Bérard A, Guasch H (2011a). In situ spatio-temporal changes in pollution-induced community tolerance to zinc in autotrophic and heterotrophic biofilm communities. *Ecotoxicology* 20: 1823-1839.
- Tlili A, Hollender J, Kienle C, Behra R (2017). Micropollutant-induced tolerance of in situ periphyton: Establishing causality in wastewater-impacted streams. *Water Research* 111: 185-194
- Tlili A, Maréchal M, Bérard A, Volat B, Montuelle B (2011b). Enhanced co-tolerance and co-sensitivity from long-term metal exposures of heterotrophic and autotrophic components of fluvial biofilms. *Science of the Total Environment*, 409: 4335-4343.
- Tlili A, Montuelle B (2011). Microbial pollution-induced community tolerance. In: Amiard-Triquet C, Rainbow PS, Roméo M (Eds), *Tolerance to environmental contaminant*, CRC Press, p.85-108.
- Väänänen, K., Leppänen, M.T., Chen, X., and Akkanen, J. (2018). Metal bioavailability in ecological risk assessment of freshwater ecosystems: From science to environmental management. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 147, 430–446.
- Warnes GR, Bolker B, Gorjanc G, Grothendieck G, Korosec A, Lumley T, MacQueen D, Magnusson A, Rogers J and others (2017). gdata: Various R Programming Tools for Data Manipulation. R package version 2.18.0. <https://CRAN.R-project.org/package=gdata>
- Wickham H (2009). *ggplot2: Elegant Graphics for Data Analysis*. Springer-Verlag New York, 2009.
- Wickham H (2011). The Split-Apply-Combine Strategy for Data Analysis. *Journal of Statistical Software*, 40: 1-29. URL <http://www.jstatsoft.org/v40/i01/>

## 10. Table des illustrations

- Figure 1 :** Principe général de l'approche PICT
- Figure 2 :** Schéma récapitulatif des différentes étapes nécessaires pour identifier une augmentation de tolérance au cuivre induite par une exposition chronique dans des échantillons de sédiments. MUF-Glu : fluorogène-substrat, MUF : fluorogène
- Figure 3 :** Photographie des dispositifs expérimentaux (canaux artificiels) utilisés pour la première expérience en laboratoire
- Figure 4 :** (A) Courbes dose-réponse obtenues avec l'activité  $\beta$ -glucosidase après 4h d'exposition au cuivre ; (B) CE50 (valeurs moyennes  $\pm$  intervalle de confiance 95%) associées (B). Chaque point représente un échantillon et la courbe en trait plein la modélisation de la courbe dose-réponse. La zone colorée correspond à l'intervalle de confiance à 95 %. Les concentrations et les CE50 sont exprimées en mg/kg poids sec
- Figure 5 :** Localisation des 8 stations d'échantillonnage sur le Lac Léman et classification en fonction des concentrations en cuivre mesuré en 2015 par Loizeau et al. (2017) dans les sédiments superficiels
- Figure 6 :** (A) Concentrations en cuivre mesurées dans les sédiments superficiels du lac Léman en 2015 (Loizeau et al., 2017) et 2017 (Eawag, moyennes  $\pm$  écart-types ; médianes et valeurs minimales et maximales) sur les 8 stations d'échantillonnage ; (B) CE50 mesurées sur ces mêmes stations et exprimées en mg de Cu par kg de sédiment sec
- Figure 7 :** Illustration de la corrélation exponentielle observée entre les valeurs moyennes de CE50 obtenues lors des deux campagnes d'échantillonnage (octobre 2017, n=4 et mai 2018, n=8) et (A) les niveaux de contamination des sédiments superficiels, mesurés en 2015 ; ou (B) corrigés partiellement par les valeurs mesurées par l'Eawag concernant les 4 échantillons prélevés en octobre 2017 (représentés en rouge)
- Figure 8 :** Niveau de tolérance microbienne au cuivre (CE50) en fonction de la teneur en cuivre des sédiments pour les différents sites étudiés. La ligne en pointillé représente la relation exponentielle entre la CE50 et la concentration en cuivre pour tous les sites sauf ceux de Peisey-Nancroix
- Figure 9 :** Résultats de l'analyse en composante principale des caractéristiques des sédiments prélevés sur l'Ain (en rose), l'Ardières (en vert) et le Tillet (en bleu). Les données en pourcentage ont été transformées par arcsinus de la racine carrée, les autres données ont été log-transformées, l'ACP a été réalisés sur les valeurs centrées et normées
- Figure 10 :** Description synthétique de la stratégie d'échantillonnage sur la station de référence de la rivière Ain (Pont de Chazey)
- Figure 11 :** Description des 3 stratégies d'échantillonnage mises en œuvre sur le site de l'Ain. A : 3 échantillons de sédiments sont prélevés et analysés de manière indépendante, les résultats des 3 tests de toxicité sont utilisés pour modéliser une courbe dose-réponse et déterminer les valeurs seuils de toxicité. B : 1 échantillon de sédiment est prélevé et analysé, les résultats de ce test sont utilisés pour modéliser une courbe dose-réponse et déterminer les valeurs seuils de toxicité. C : 3 échantillons de sédiments sont prélevés et mélangés à parts égales avant de réaliser un test de toxicité dont les résultats sont utilisés pour modéliser une courbe dose-réponse et déterminer les valeurs seuils de toxicité
- Figure 12 :** CE50 (mg Cu/ kg sédiment sec) et intervalle de confiance à 95% pour l'activité  $\beta$ -glucosidase des communautés microbiennes sédimentaires des différents prélèvements effectués sur le site de l'Ain au cours de 4 campagnes. Pour chaque campagne et chaque date, la ligne pleine représente la CE50 obtenue à partir des tests de toxicité réalisés de manière indépendante sur les 3 prélèvements de chaque banc, les lignes en pointillés correspondent à l'intervalle de confiance à 95%. Les points et barres d'erreur indiquent les CE50 (et intervalle de confiance à 95%) obtenues après l'analyse d'un seul échantillon de sédiment issu soit d'un prélèvement unique (en orange) soit du mélange des 3 prélèvements pour chaque banc (Mix, en marron). Les résultats sont utilisés pour modéliser une courbe dose-réponse et déterminer les valeurs seuils de toxicité
- Figure 13 :** CE50 (mg Cu/kg) en fonction de la concentration en cuivre in situ des échantillons de sédiment prélevés et analysés de manière indépendante. Les barres d'erreur indiquent les intervalles de confiance à 95%
- Figure 14 :** CE50 et intervalle de confiance à 95% issues de l'analyse de 3 échantillons de sédiments prélevés sur le banc 1 (histogramme blanc) et le banc 2 (histogramme gris) du site Pont-de-Chazay sur l'Ain. La moyenne des niveaux de cuivre dans les échantillons prélevés est indiquée par la ligne en pointillés
- Figure 15 :** CE50 (mg Cu/ kg sédiment sec) et intervalle de confiance à 95% pour l'activité  $\beta$ -glucosidase des communautés microbiennes sédimentaires exposées pendant 27 jours à différents niveaux de cuivre (contrôle : vert ; 45 mg/kg : orange ; 95 mg/kg : rouge). Les histogrammes indiquent les valeurs de CE50 obtenues après congélation des échantillons à  $-20^{\circ}\text{C}$  ou  $-80^{\circ}\text{C}$  et sont comparées aux valeurs de référence du potentiel de tolérance obtenues sur le sédiment frais et indiquées par les lignes

- Figure 16 :** CE50 (histogramme, mg Cu/kg sédiment sec) et activité  $\beta$ -glucosidase basale (ligne, nmol/h/g sédiment sec) des communautés microbiennes sédimentaires du lac Léman mesurées 7 et 18 jours après le prélèvement (conservation à 4°C). Les barres d'erreur correspondent à l'intervalle de confiance à 95% pour les CE50 et à la déviation standard pour l'activité  $\beta$ -glucosidase (n=3)
- Figure 17 :** Courbes dose-réponse obtenues avec l'activité  $\beta$ -glucosidase 7 jours (en vert clair) et 18 jours (en vert foncé) après le prélèvement dans le lac Léman. Les lignes correspondent à la modélisation de la courbe dose-réponse et de son intervalle de confiance à 95% ; les points correspondent aux valeurs mesurées. Les 3 stations de prélèvement étudiées sont indiquées au-dessus de chaque graphe et classées de la moins contaminée à la plus contaminée en cuivre : 78, 21, 53
- Figure 18 :** Activité estérase (A), densité et viabilité (B) des extraits microbiens après détachement des communautés microbiennes en utilisant un mixeur, un bain à ultrasons ou un homogénéiseur. Chaque méthode a été réalisée avec de l'eau déminéralisée (histogramme plein) ou du tampon pyrophosphate (histogramme hachuré)
- Figure 19 :** Courbes dose-réponse obtenues avec l'activité  $\beta$ -glucosidase pour des communautés microbiennes attachées au sédiment (A) ou dans des extraits après détachement de celui-ci (B). Les sédiments ont été préalablement exposés pendant 27 jours à des niveaux de cuivre contrastés (contrôle en vert, CuBas : 45 mg Cu /kg en orange, CuHaut : 95 mg Cu/kg en rouge). Les points représentent les valeurs expérimentales, les lignes : l'ajustement des modèles de courbes dose-réponse, les zones colorées : l'intervalle de confiance à 95% du modèle. Les cercles vides sur le Panel B correspondent à des valeurs expérimentales qui n'ont pas été prises en compte lors de la modélisation des courbes doses-réponses
- Figure 20 :** Comparaison des CE50 (mg Cu/kg) des extraits microbiens après détachement avec celles des sédiments frais du lac Léman en Mai 2018. Les nombres à côté de chaque point indiquent la station du lac Léman correspondante. Les barres d'erreur correspondent à l'intervalle de confiance à 95%. La ligne pointillée indique la droite x=y
- Figure A1 :** Schéma récapitulatif des différentes étapes nécessaires pour appliquer l'approche PICT aux sédiments
- Figure A2 :** Exemple de courbe de saturation. La concentration saturante, au début du plateau des valeurs de fluorescence, est indiquée par une flèche rouge
- Figure A3 :** Exemples de courbes dose-réponse réalisées avec une gamme de concentrations de cuivre log et semi-log
- Figure A4 :** Exemple de courbe d'étalonnage du fluorogène
- Figure A5 :** Résumé des étapes de calcul nécessaire pour préparer les données
- Figure A6 :** Tableau des ECx et courbe dose-réponse obtenus après la modélisation de la courbe dose-réponse avec le script R fourni. Sur la figure, chaque point correspond à un échantillon de sédiment indépendant (en pourcentage des échantillons non exposés au cuivre), la courbe représente le modèle ajusté aux données et la zone grise l'intervalle de confiance à 95 %
- Figure A7 :** Exemple d'interprétation des valeurs de CE50

- Tableau 1 :** Moyenne et écartype de l'activité  $\beta$ -glucosidase (nmol/h/g sédiment sec) des communautés microbiennes sédimentaires contrôles et exposées pendant 27 jours à deux niveaux de cuivre distinct (n=3 pour chaque condition). Pour chaque condition, l'activité a été mesurée sur des sédiments frais (conservés à 4°C) ou après décongélation d'échantillons conservés à -20°C ou -80°C
- Tableau 2 :** CE50 (mg/kg) des communautés microbiennes du sédiment exposées pendant 27 jours à des niveaux de cuivre contrastés, mesurées sur le sédiment frais ou sur des extraits des communautés microbiennes après détachement
- Tableau A1 :** Liste du matériel et réactifs nécessaires aux analyses PICT du sédiment
- Tableau A2 :** Gamme de concentrations en MUF-Glu à préparer pour la réalisation d'une courbe de saturation. Les concentrations des solutions à préparer sont indiquées sur la première ligne, la deuxième ligne du tableau indique la concentration finale de MUF-Glu dans le tube pendant le test, avant l'ajout du tampon
- Tableau A3 :** Gamme de concentrations en cuivre à préparer pour la réalisation des tests de toxicité. Les concentrations des solutions à préparer sont indiquées sur la deuxième ligne, la troisième ligne du tableau indique la concentration finale de cuivre dans le tube pendant le test, avant l'ajout du tampon
- Tableau A4 :** Gamme de concentrations en MUF à préparer pour la réalisation de la courbe d'étalonnage. Les concentrations des solutions à préparer sont indiquées sur la première ligne, la deuxième ligne du tableau indique la quantité finale de MUF dans le tube pendant le test

## 11. Annexe 1 : Protocole détaillé de l'approche PICT appliquée aux sédiments

### 11.1 Description rapide du protocole

L'approche PICT décrite dans ce protocole, et dont les principales étapes sont résumées dans la figure A1, a pour objectif d'identifier l'acquisition de tolérance au cuivre de communautés microbiennes attachées aux sédiments pour mettre en avant la présence de cuivre dans l'environnement en quantité suffisante pour provoquer une réponse biologique à l'échelle de la communauté.

Après prélèvement (étape 1, Fig. A1), le sédiment est ramené au laboratoire pour y déterminer le niveau de tolérance microbienne au cuivre en mesurant l'activité bêta-glucosidase des communautés microbiennes exposées pendant 4h à des concentrations croissantes en cuivre. Pour cela, il est tout d'abord nécessaire de réaliser une courbe de saturation (étape 2) qui permet de déterminer la concentration saturante en fluorogène-substrat (MUF-Glu : 4-méthylumbelliféryl- $\beta$ -D-glucopyranoside) qui est ensuite utilisée lors des tests de toxicité (étape 3). En parallèle, la réalisation d'une courbe d'étalonnage (étape 4) entre unités de fluorescence et quantité de fluorogène (MUF) permet d'exprimer les résultats des tests de toxicité en activité spécifique. Finalement, des modèles de courbes dose-réponse sont ajustés aux données expérimentales obtenues lors des tests de toxicité (étape 5) afin d'obtenir les valeurs-seuils de tolérance des communautés microbiennes testées et d'identifier d'éventuelles différences de tolérance entre les stations étudiées.

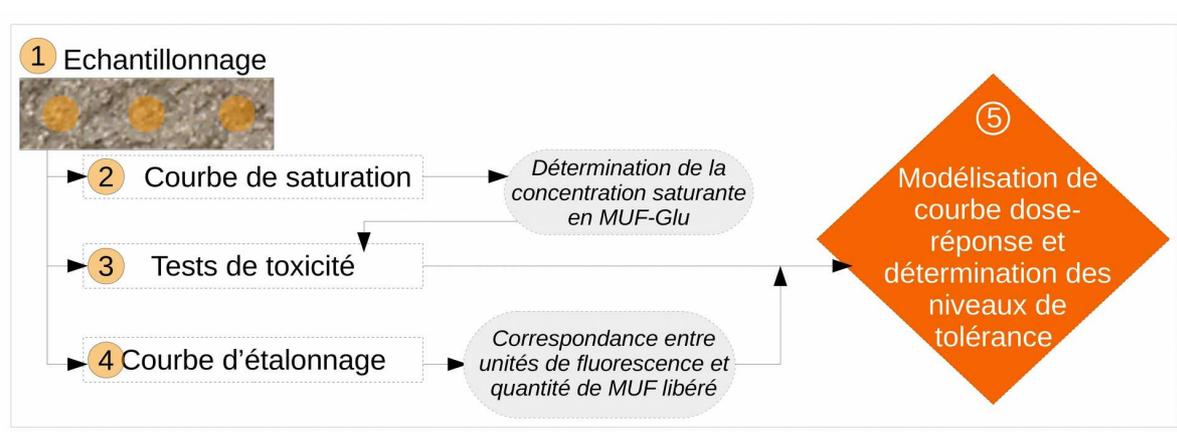


Figure A1 : Schéma récapitulatif des différentes étapes nécessaires pour appliquer l'approche PICT aux sédiments

### 11.2 Prélèvement des sédiments

Le prélèvement de sédiments se fait en suivant les recommandations du guide AQUAREF (Opérations d'échantillonnage de sédiments en milieu continental (cours d'eau et plan d'eau) dans le cadre des programmes de surveillance DCE - Recommandations techniques – Edition 2017).

Pour chaque station, un minimum de 3 échantillons indépendants sont prélevés. Le tamisage < 2 mm est ensuite réalisé sur place comme indiqué dans le guide AQUAREF (2017). Les sédiments prélevés sont placés dans un contenant en polyéthylène, polypropylène ou du polystyrène cristal (de préférence non teinté). Si une analyse de 3 échantillons par station n'est pas possible, il est possible de réaliser un échantillon composite en mélangeant à parts égales un minimum de 3 échantillons de sédiments tamisés (< 2mm).

Pour chaque échantillon, un minimum de 100 g de sédiment frais est nécessaire pour déterminer le niveau de tolérance microbienne au cuivre.

### 11.3 Conservation des échantillons

Après prélèvement, les sédiments sont conservés à 4°C dans un contenant fermé. Les mesures des niveaux de tolérance au cuivre doivent être réalisés le plus rapidement possible après prélèvement, idéalement dans les 7 jours suivant le prélèvement.

### 11.4 Matériel et réactifs

Le tableau A1 liste le matériel, les appareils et les réactifs nécessaires à la mesure des niveaux de tolérance.

**Tableau A1** : Liste du matériel et réactifs nécessaires aux analyses PICT du sédiment

Consommables	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Tubes de 5 mL minimum, en polypropylène, résistant à la centrifugation</li> <li>• Tubes en polypropylène de 50 mL (pour préparer la gamme de cuivre)</li> <li>• Microplaques de 96 puits en polystyrène</li> <li>• Verrerie de laboratoire ( fioles jaugées, béchers...)</li> <li>• Pipettes automatiques</li> </ul>
Appareils	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Balance</li> <li>• Vortex</li> <li>• Plateau agitateur</li> <li>• Centrifugeuse (rotor pour tubes 5 mL minimum)</li> <li>• Lecteur de fluorescence pour microplaques (Exc 360 / Em 460nm)</li> <li>• Etuve à 50 °C</li> </ul>
Réactifs	<ul style="list-style-type: none"> <li>• MUF-Glu : 4-Methylumbelliferyl β-D Glucopyranoside (CAS : 18997-57-4, poids moléculaire : 338,32 g/mol). Stocker à -20°C.</li> <li>• MUF : 4-methylumbelliférone (CAS : 90-33-5, poids moléculaire : 176.17 g/mol). Stocker à T°C ambiante.</li> <li>• Tampon d'arrêt de la réaction : glycine 0.05 M, NH<sub>4</sub>OH 0.2 M, ajuster le pH à 10.4 avec NaOH. Stocker à 4°C.</li> <li>• Sulfate de cuivre : CuSO<sub>4</sub>-5H<sub>2</sub>O (CAS : 7758-99-8)</li> </ul>

## 11.5 Détermination de la concentration saturante en fluorogène

L'induction de la production des enzymes extracellulaires dépend de la concentration en substrat dans le milieu et de l'état physiologique des cellules. Ainsi, la matière organique qui joue le rôle de substrat agit comme un activateur ou un répresseur de leur synthèse : elle est réprimée lorsque les concentrations présentes dans la cellule sont proches de celles du milieu environnant. Inversement, elle est induite lorsque la concentration des composés de faible poids moléculaire directement assimilables atteint une valeur critique à l'intérieur de la cellule bactérienne, ou dans son environnement proche (Chrost, 1991). Dans le cadre des tests de toxicité mis en œuvre il est donc nécessaire de s'assurer que l'inhibition de l'activité β-glu observée dans les courbes doses-réponses est bien liée à un impact physiologique et non à une répression de l'activité suite à une carence en substrat lors du test.

Pour ce faire, il est nécessaire de réaliser les tests de toxicité en présence d'un excès de substrat et de s'assurer que la consommation du substrat pendant le test ne dépasse pas 10 % de la concentration initiale. La concentration minimale du fluorogène-substrat (MUF-Glu) nécessaire pour garantir la présence en excès de substrat pendant tout le test est appelée concentration saturante. Celle-ci peut varier selon les échantillons, par conséquent avant de réaliser les tests de toxicité il faudra déterminer la concentration saturante pour chaque échantillon en réalisant une courbe de saturation comme décrit ci-après.

### 11.5.1. Mesurer l'activité beta-glucosidase en fonction de la concentration en substrat

Pour chaque station d'échantillonnage, une courbe de saturation est réalisée de manière indépendante pour chaque échantillon ou sur un mélange des sédiments issus d'une même station pour réduire le nombre d'analyses.

- Réaliser une gamme de 12 concentrations croissantes de MUF-Glu dans de l'eau déminéralisée à partir d'une solution mère à 6000 μM (Tableau 1). Afin de faciliter la dissolution de MUF-Glu, la solution peut être agitée à l'aide d'un barreau aimanté

**Tableau A2** : Gamme de concentrations en MUF-Glu à préparer pour la réalisation d'une courbe de saturation. Les concentrations des solutions à préparer sont indiquées sur la première ligne, la deuxième ligne du tableau indique la concentration finale de MUF-Glu dans le tube pendant le test, avant l'ajout du tampon

[MUF-Glu] μM	0	500	1000	1500	2000	2500	3000	3500	4000	4500	5000	6000
[MUF-Glu] μM finale dans le tube, avant ajout du tampon	0	333	667	1000	1333	1667	2000	2333	2667	3000	3333	4000

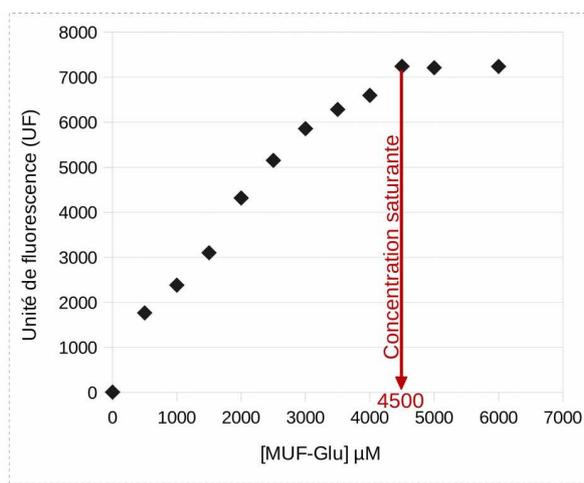
- Pour chaque échantillon et chaque concentration de MUF-Glu, ajouter dans un tube de 5 mL minimum, en polypropylène :
  - o 1.2 g de sédiment frais
  - o 2 mL de solution de MUF-Glu
  - o 1 mL d'eau déminéralisée

L'ajout d'eau déminéralisée permet de se placer dans les mêmes conditions que lors des tests de toxicité, pendant lesquels 1 mL de solution de cuivre est ajouté.

- Vortexer chaque tube
- Incuber les tubes à l'obscurité, sur le plateau agitateur (150 rpm), à température ambiante pendant 4h
- Ajouter 300  $\mu$ L de tampon pour stopper la réaction
- Vortexer chaque tube
- Centrifuger à 5000 g, pendant 5 min., à température ambiante
- Prélever 300  $\mu$ L de surnageant et transférer dans une microplaque
- Lire la fluorescence aux longueurs d'ondes suivantes : excitation : 360 nm / émission : 460 nm

### 11.5.2. Déterminer la concentration saturante en MUF-Glu

Tracer la courbe de saturation en indiquant en ordonnée les valeurs de fluorescence obtenues et en abscisse les concentrations en MUF-Glu. La valeur de la concentration saturante correspond à celle où la courbe atteint un plateau comme illustré sur la Fig. A2.



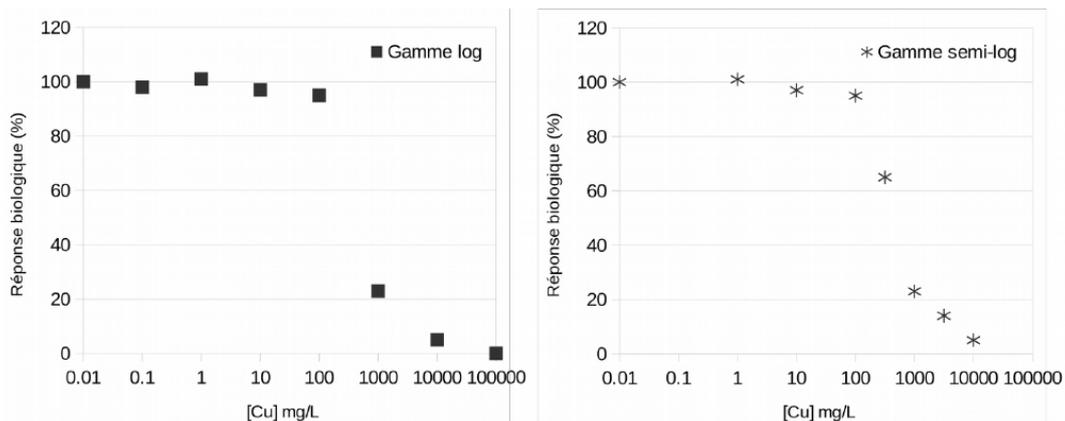
**Figure A2** : Exemple de courbe de saturation. La concentration saturante, au début du plateau des valeurs de fluorescence, est indiquée par une flèche rouge

## 11.6 Réalisation des tests de toxicité

### 11.6.1. Préparation de la gamme de concentrations en cuivre

Les solutions de cuivre sont préparées à partir de  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  (CAS : 7758-99-8), dans une eau déminéralisée afin d'éviter la formation de précipité. Les solutions peuvent être préparées quelques jours avant les tests de toxicité et conservées à 4°C. Après les tests, les solutions de cuivre sont acidifiées avec de l'acide nitrique suprapur à une concentration finale de 0.5% et conservées à 4°C en vue d'un dosage du cuivre pour vérification des concentrations.

La gamme de concentrations choisie doit permettre d'observer un nombre important de réponses biologiques intermédiaires afin de pouvoir modéliser au mieux une courbe dose-réponse. L'utilisation d'une gamme semi-log permet de couvrir une large gamme de concentrations avec un écart régulier et raisonnable entre chaque concentration et assure ainsi une modélisation précise des niveaux de tolérance, notamment des CE50 comme illustré sur la Fig. A3.



**Figure A3 :** Exemples de courbes dose-réponse réalisées avec une gamme de concentrations de cuivre log et semi-log

**Une gamme semi-log de 7 concentrations de cuivre** est préparée à partir d'une solution-mère à 10 g Cu /L (Tableau A3).

**Tableau A3 :** Gamme de concentrations en cuivre à préparer pour la réalisation des tests de toxicité. Les concentrations des solutions à préparer sont indiquées sur la deuxième ligne, la troisième ligne du tableau indique la concentration finale de cuivre dans le tube pendant le test, avant l'ajout du tampon

Niveaux de cuivre	C0	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7
[Cu] mg Cu L <sup>-1</sup>	0	1	10	100	316.5	1000	3165	10000
[Cu] mg Cu L <sup>-1</sup> finale dans le tube, avant ajout du tampon	0	0	3	33	106	333	1055	3333

### 11.6.2. Réalisation des tests de toxicité

Pour chaque station, les tests de toxicité sont réalisés sur 3 échantillons indépendants. De plus pour chaque échantillon, les tests de toxicité sont réalisés en triplicat, qui constituent des répétitions analytiques des mesures effectuées. Le protocole détaillé des tests de toxicité est décrit ci-après.

- Peser chaque tube de 5mL vide
- Pour chaque échantillon et chaque concentration de cuivre, ajouter dans chaque tube :
  - o 1.1 à 1.2 g de sédiment frais
  - o 2 mL de solution de MUF-Glu à la concentration saturante déterminée au préalable
  - o 1 mL de solution de cuivre à une des concentrations de la gamme de cuivre
- En parallèle, pour chaque concentration de cuivre, réaliser des blancs réactifs, c'est-à-dire des tubes sans sédiment, en ajoutant dans un tube de 5 mL :
  - o 2 mL de solution de MUF-Glu à la concentration saturante déterminée au préalable
  - o 1 mL de solution de cuivre à une des concentrations de la gamme de cuivre
- Vortexer chaque tube
- Incuber les tubes à l'obscurité, sur le plateau agitateur (150 rpm), à température ambiante pendant 4h
- Ajouter 300 µL de tampon d'arrêt pour stopper la réaction
- Vortexer chaque tube
- Centrifuger à 5000 g, pendant 5 min., à température ambiante
- Prélever 300 µL de surnageant et transférer dans une microplaque
- Lire la fluorescence aux longueurs d'ondes suivantes : excitation : 360 nm / émission : 460 nm
- Pour chaque tube à l'exception des tubes de blancs réactifs) :
  - o Vider la majeure partie du surnageant de chaque échantillon avec une pipette
  - o Incuber les tubes dans une étuve à 50°C, pendant 48h (jusqu'au séchage complet du sédiment)
  - o Peser les tubes et en déduire le poids sec de chaque échantillon

Pour chaque échantillon et chaque niveau de cuivre, les tests de toxicité permettent d'obtenir 3 valeurs de fluorescence qui seront ensuite converties en activité spécifique dans les étapes suivantes avant d'être utilisées pour déterminer le niveau de tolérance des communautés microbiennes de la station étudiée.

## 11.7 Courbe d'étalonnage du fluorogène

La fluorescence du fluorogène peut être influencée par les caractéristiques du sédiment. Pour pouvoir comparer les valeurs d'activité entre différents sédiments, **il est nécessaire de pouvoir relier les valeurs de fluorescence observées à la quantité de fluorogène (MUF) libéré**. Pour cela, une courbe d'étalonnage est réalisée pour chaque échantillon, selon le protocole ci-après

### 11.7.1. Déterminer la gamme de de fluorescence de MUF pour chaque échantillon

- Réaliser une gamme de 7 concentrations croissantes de MUF dans de l'eau déminéralisée à partir d'une solution mère à 200  $\mu\text{M}$  (tableau A4).

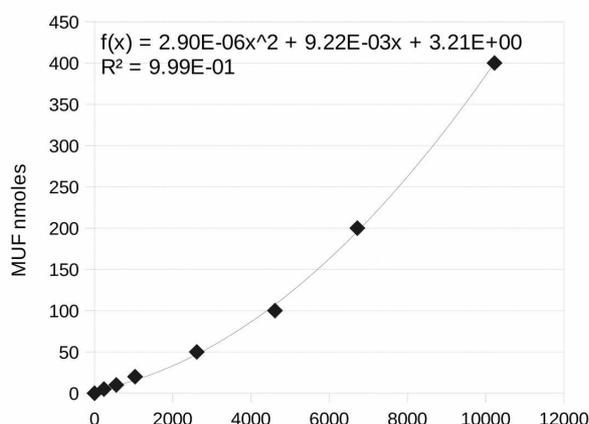
**Tableau A4** : Gamme de concentrations en MUF à préparer pour la réalisation de la courbe d'étalonnage. Les concentrations des solutions à préparer sont indiquées sur la première ligne, la deuxième ligne du tableau indique la quantité finale de MUF dans le tube pendant le test

[MUF] $\mu\text{M}$	0	2,5	5	10	25	50	100	200
Qté de MUF dans le tube (nmoles)	0	5	10	20	50	100	200	400

- Pour chaque échantillon et chaque concentration de fluorogène ajouter dans un tube de 5 mL minimum en polypropylène :
  - o 1.1 à 1.2 g de sédiment frais
  - o 2 mL de solution de MUF
  - o 1 mL d'eau déminéralisée. L'ajout d'eau déminéralisée permet de se placer dans les mêmes conditions que lors des tests de toxicité, pendant lesquels 1 mL de solution de cuivre est ajouté.
- Vortexer chaque tube
- Incuber les tubes à l'obscurité, sur une plaque agitante le plateau agitateur (150 rpm), à température ambiante pendant 4h
- Ajouter 300  $\mu\text{L}$  de tampon d'arrêt pour stopper la réaction
- Vortexer chaque tube
- Centrifuger à 5000 g, pendant 5 min., à température ambiante
- Prélever 300  $\mu\text{L}$  de surnageant et transférer dans une microplaque
- Lire la fluorescence aux longueurs d'ondes suivantes : excitation : 360 nm / émission : 460 nm

### 11.7.2. Réaliser une courbe d'étalonnage pour chaque échantillon

Pour chaque échantillon : tracer la courbe d'étalonnage en indiquant en ordonnée les quantités en MUF (en nmoles) et en abscisse les valeurs de fluorescence obtenues. En utilisant un logiciel de tableur (e.g. Excel de Microsoft, Calc de LibreOffice...), modéliser la courbe grâce à une équation polynomiale du second degré :  **$\text{MUF} = a \cdot \text{UF}^2 + b \cdot \text{UF} + c$**  (voir Fig. A4). L'équation de la droite d'étalonnage ainsi obtenue permet de convertir les valeurs de fluorescence obtenues lors des tests de toxicité en quantité de MUF libérée, pour chaque échantillon.



**Figure A4** : Exemple de courbe d'étalonnage du fluorogène

## 11.8 Modélisation des courbes dose-réponse et comparaison des niveaux de tolérance

Pour chaque station, les résultats des tests de toxicité des différents échantillons (3 minimum) sont utilisés pour modéliser une courbe dose-réponse par station et déterminer les niveaux de tolérance. Ensuite les niveaux de tolérance peuvent être comparés entre différentes stations.

Les résultats bruts des tests de toxicité doivent être convertis en activité spécifique avant de pouvoir être utilisés pour la modélisation de courbes dose-réponse.

### 11.8.1. Préparation des données

La Fig. A5 résume les différentes étapes nécessaires pour transformer la valeur de fluorescence en activité enzymatique spécifique.

- A chaque valeur de fluorescence obtenue, soustraire la valeur du blanc réactif exposé au même niveau de cuivre :  $UF - UF_{\text{BlancRéactif}}$
- Pour chaque échantillon, les unités de fluorescence obtenues sont ensuite converties en nmole de fluorogène libéré grâce à la courbe d'étalonnage spécifique à l'échantillon :  $MUF_{\text{libérée}} = a*(UF - UF_{\text{BlancRéactif}})^2 + b*(UF - UF_{\text{BlancRéactif}}) + c$  où a, b, c sont les paramètres de la courbe d'étalonnage tels que  $MUF = a*UF^2 + b*UF + c$ .
- L'activité de chaque échantillon est finalement exprimée en nmole de fluorogène libérée / h / g de sédiment sec en réalisant le calcul suivant :  $Activité = MUF_{\text{libéré}} / (\text{Temps} \times \text{Poids}_{\text{SédimentSec}})$  dans lequel Temps correspond au temps d'exposition au cuivre (4h) et PoidsSédimentSec au poids sec de l'échantillon en g. Si la valeur obtenue est inférieure à 0 alors la valeur de 0 est attribuée car l'activité enzymatique mesurée ne peut être négative.

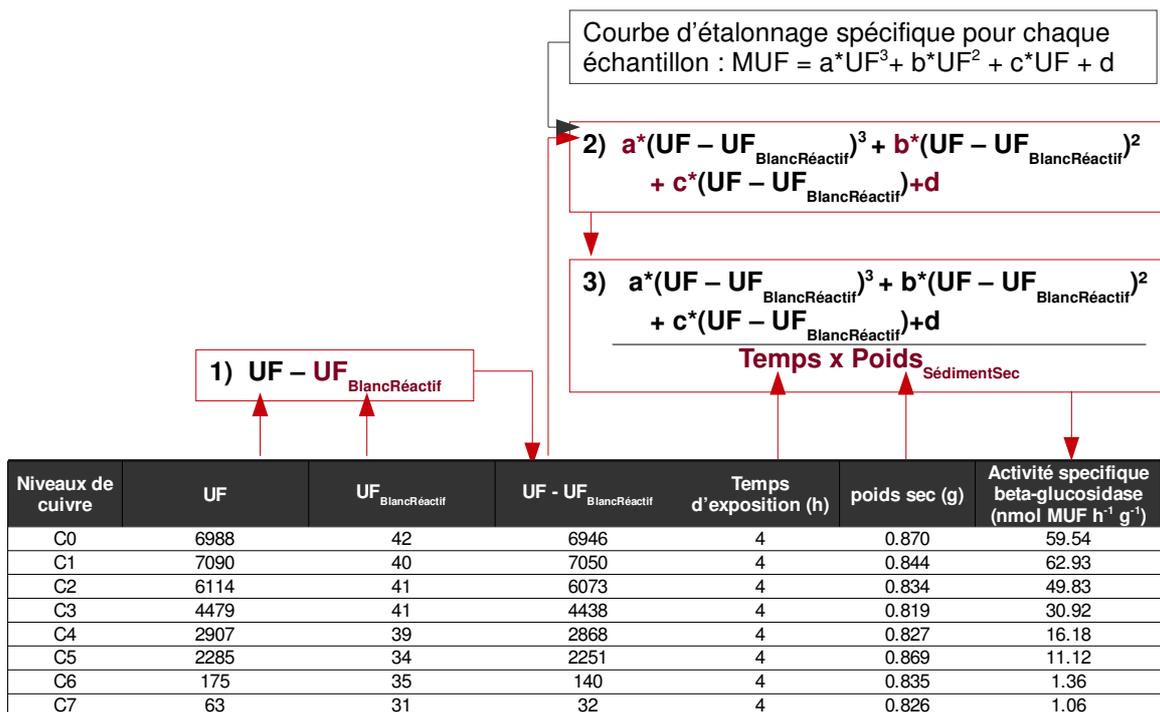


Figure A5 : Résumé des étapes de calcul nécessaire pour préparer les données

Les concentrations en cuivre utilisées lors des tests de toxicité aiguë sont standardisées par le poids sec du sédiment dans chacun des tubes en appliquant la formule suivante :

$$[Cu]_{\text{mg/kg}} = [Cu]_{\text{mg/L}} * \text{Volume} / \text{Poids}_{\text{SédimentSec}}$$

dans laquelle les concentrations en cuivre correspondent aux concentrations finales dans les tubes, le Volume correspond au volume total de liquide dans le tube (soit 3 mL) et PoidsSédimentSec correspond au poids sec de l'échantillon en kg.

### 11.8.2. Modélisation des courbes de dose-réponse et détermination du niveau de tolérance

La modélisation des courbes de dose-réponse se fait indépendamment pour chaque station en utilisant les logiciels :

- R version 3.4.3 (R Core Team 2017), téléchargeable gratuitement : <https://cran.r-project.org/bin/windows/base/>
- Rstudio version 1.0.136, téléchargeable gratuitement : <https://www.rstudio.com/products/rstudio/download/>

Les packages suivants doivent également être préalablement installés : gdata, plyr, svDialogs, drc, ggplot2 (Grosjean 2017 ; Ritz et al. 2015, Warnes et al. 2017 ; Wickham 2009, 2011).

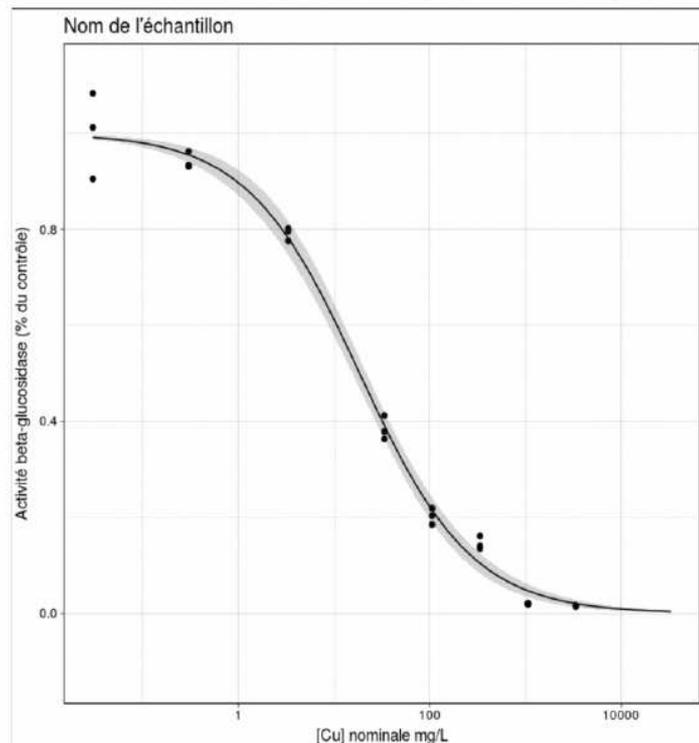
Pour chaque station, les données nécessaires sont regroupées dans un fichier source Excel contenant les colonnes suivantes :

- une colonne intitulée « Cu\_Niveaux » et contenant un indicateur des niveaux en cuivre testés lors des tests de toxicité aigue et allant de C0 pour le contrôle jusqu'à C7 ;
- une colonne intitulée « Cu\_mgkg » et contenant les concentrations en cuivre (mg Cu/kg sédiment sec) dans le tube, pendant le test, avant l'ajout du tampon ;
- une colonne intitulée « Replicat\_Bio » et indiquant par différents chiffres les différents échantillons de sédiments prélevés sur une même station ;
- une colonne intitulée « Replicat\_Tech » et indiquant par différents chiffres les différentes répétitions de mesure de toxicité réalisées pour un échantillon ;
- une colonne intitulée « BGlu » et contenant les valeurs d'activités spécifique beta-glucosidase en nmol MUF.h<sup>-1</sup>.g<sup>-1</sup>.

**Pour une exécution optimale du script R, il est indispensable de bien respecter l'intitulé et la casse utilisée pour les noms des colonnes.**

Le fichier ainsi créé est enregistré sous format Excel et est utilisé dans l'application du script R disponible en annexe 2 pour obtenir la courbe de dose réponse de la station, un tableau contenant différents CE<sub>x</sub> ainsi qu'un tableau contenant les données prédites par la modélisation. Un exemple de fichier d'entrée est disponible dans l'annexe 3. Un exemple de résultats du script R est présenté sur la Fig. A6.

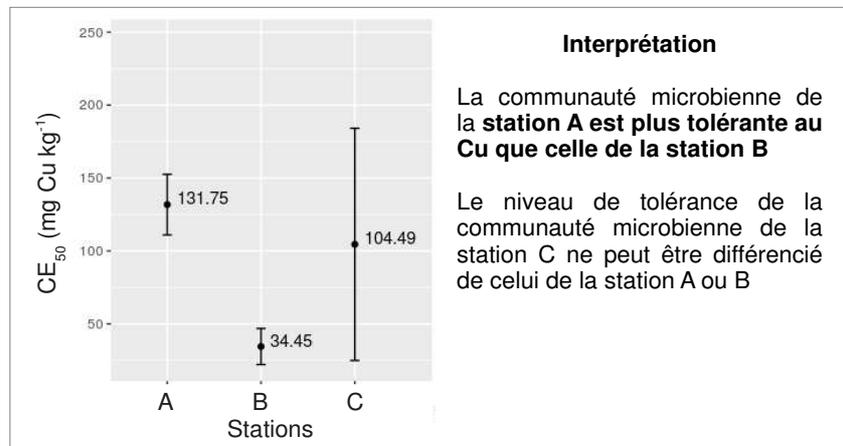
	Echantillon	Valeur Seuil	Erreur Standard	Valeur basse IC 95%	Valeur haute IC 95%
CE 50	Nom de l'échantillon	15.243	1.429	12.279	18.206
CE 10	Nom de l'échantillon	1.698	0.284	1.108	2.288
CE 90	Nom de l'échantillon	477.208	96.52	277.037	677.378



**Figure A6 :** Tableau des EC<sub>x</sub> et courbe dose-réponse obtenus après la modélisation de la courbe dose-réponse avec le script R fourni. Sur la figure, chaque point correspond à un échantillon de sédiment indépendant (en pourcentage des échantillons non exposés au cuivre), la courbe représente le modèle ajusté aux données et la zone grise l'intervalle de confiance à 95 %

### 11.8.3. Comparaison des niveaux de tolérance entre stations

Les résultats des tests de toxicité réalisés pour chaque station étudiée vont permettre de comparer les stations entre elles. Les niveaux de tolérance des communautés microbiennes sont considérés comme significativement différents si les intervalles de confiance des  $CE_{50}$  ne se superposent pas comme illustré dans la Fig. A7.



**Figure A7 :** Exemple d'interprétation des valeurs de  $CE_{50}$

## 12. Annexe 2 : Scripts R

Le script R ci-après permet d'ajuster 4 types de modèles de courbe dose-réponse aux données obtenues pour une station, de sélectionner le meilleur modèle, d'obtenir les valeurs-seuils (CE<sub>10</sub>, CE<sub>50</sub>, CE<sub>90</sub>) et de tracer le graphe correspondant à ce modèle.

```
###Charger dans R les différents packages nécessaires
#pour la préparation et l'export des données
library(gdata);library(plyr);library(dplyr);library(svDialogs)
#la réalisation des courbes doses-réponses et les calculs de valeurs seuils
library(drc)
#les graphiques
library(ggplot2)

###Effacer tous les fichiers précédents pour éviter des réécritures.
rm(list = ls())

###Charger le fichier contenant les concentrations en cuivre et les valeurs d'activité pour une #station
(1 à 3 répétitions de mesures pour au moins 3 échantillons indépendants de sédiments)
PICT_BGlu_Complet <- read.xls(file.choose(),sheet=1, header=TRUE)
#Indiquer le nom de l'échantillon
NomEchantillon="Nom de l'échantillon"

#Calculer les valeurs moyennes d'unités de fluorescence (UF) pour les répétitions techniques de
#chaque échantillon de sédiment indépendant
PICT_BGlu= PICT_BGlu_Complet %>% group_by(Cu_Niveaux,Replicat_Bio) %>%
summarise_all(funs(mean))

#Dans une nouvelle colonne : Les valeurs d'activité sont exprimées en pourcentage
#des échantillons non exposés au cuivre (controle)
PICT_BGlu=ddply(PICT_BGlu,.(Replicat_Bio),mutate,Pourcentage=Bglu/mean(Bglu[Cu_Niveaux=="C
0"]))

###Ajuster 4 modèles de dose-réponse aux données expérimentales et comparer les modélisations
#Modèles testés :
#Weibull (à 1 et 2 paramètres) : W1.2 et W2.2
#log-logistique : LL.2
#Brain-Cousens : BC.4 - ce modèle est utile pour modéliser les effets d'hormèse

#Comparaison des 4 modèles
A=W1.2();B=W2.2();C=LL.2();D=BC.4(c(NA,1,NA,NA));
DataA=drm(PICT_BGlu$Pourcentage~PICT_BGlu$Cu_mgkg,fct=A); RespPredA=predict(DataA)
DataB=drm(PICT_BGlu$Pourcentage~PICT_BGlu$Cu_mgkg,fct=B); RespPredB=predict(DataB)
DataC=drm(PICT_BGlu$Pourcentage~PICT_BGlu$Cu_mgkg,fct=C); RespPredC=predict(DataC)
DataD=drm(PICT_BGlu$Pourcentage~PICT_BGlu$Cu_mgkg,fct=D); RespPredD=predict(DataD)
#Affichage des modélisations permettant la sélection du meilleur modèle
par(mfrow=c(2,2))
plot(DataA,type="confidence", main="A",xlab="[Cu] mg/kg", ylab="Beta-glucosidase activity (%)")
plot(DataA,add=TRUE,type="obs");mtext(A$name,3)
plot(DataB,type="confidence",main = "B", xlab="[Cu] mg/kg", ylab="Beta-glucosidase activity (%)")
plot(DataB,add=TRUE,type="obs");mtext(B$name,3)
plot(DataC,type="confidence",main = "C", xlab="[Cu] mg/kg", ylab="Beta-glucosidase activity (%)")
plot(DataC,add=TRUE,type="obs");mtext(C$name,3)
plot(DataD,type="confidence",main = "D", xlab="[Cu] mg/kg", ylab="Beta-glucosidase activity (%)")
plot(DataD,add=TRUE,type="obs");mtext(D$name,3)
```

###Indiquer A, B, C ou D correspondant à la modélisation avec la plus juste

ModeleSelectionne = A

###Valeurs seuils et graphes

#Pour afficher le C0 dans les graphes, la concentration nulle est remplacée par la concentration C1/10  
PICT\_BGlu[PICT\_BGlu\$Cu\_Niveaux=="C0","Cu\_mgkg"]=(PICT\_BGlu[PICT\_BGlu\$Cu\_Niveaux=="C1",  
"Cu\_mgkg"])/10

#Ajustement du modèle choisi aux données

Modelisation\_BGlu=drm(PICT\_BGlu\$Pourcentage~PICT\_BGlu\$Cu\_mgkg,fct=ModeleSelectionne)

#Informations sur les paramètres du modèle

summary(Modelisation\_BGlu)

##Valeurs Seuils

TestED=ED(Modelisation\_BGlu,c(10,50,90),interval="delta")

#sauvegarder les valeurs seuils dans un tableau

ValeursSeuils=data.frame()

ValeursSeuils["CE 50","Echantillon"]=NomEchantillon

ValeursSeuils["CE 50","Valeur Seuil"]=round(TestED["e:1:50","Estimate"],3)

ValeursSeuils["CE 50","Erreur Standard"]=round(TestED["e:1:50","Std. Error"],3)

ValeursSeuils["CE 50","Valeur basse IC 95%"]=round(TestED["e:1:50","Lower"],3)

ValeursSeuils["CE 50","Valeur haute IC 95%"]=round(TestED["e:1:50","Upper"],3)

ValeursSeuils["CE 10","Echantillon"]=NomEchantillon

ValeursSeuils["CE 10","Valeur Seuil"]=round(TestED["e:1:10","Estimate"],3)

ValeursSeuils["CE 10","Erreur Standard"]=round(TestED["e:1:10","Std. Error"],3)

ValeursSeuils["CE 10","Valeur basse IC 95%"]=round(TestED["e:1:10","Lower"],3)

ValeursSeuils["CE 10","Valeur haute IC 95%"]=round(TestED["e:1:10","Upper"],3)

ValeursSeuils["CE 90","Echantillon"]=NomEchantillon

ValeursSeuils["CE 90","Valeur Seuil"]=round(TestED["e:1:90","Estimate"],3)

ValeursSeuils["CE 90","Erreur Standard"]=round(TestED["e:1:90","Std. Error"],3)

ValeursSeuils["CE 90","Valeur basse IC 95%"]=round(TestED["e:1:90","Lower"],3)

ValeursSeuils["CE 90","Valeur haute IC 95%"]=round(TestED["e:1:90","Upper"],3)

#Exporter le tableau des valeurs seuils

write.csv(ValeursSeuils,dlgSave())\$res)

##Graphe

#Modéliser les valeurs et leur intervalle de confiance sur base du modèle sélectionné

xData=expand.grid(Cu\_mgkg=exp(seq(log(PICT\_Bglu[PICT\_Bglu\$Cu\_Niveaux=="C0","Cu\_mgkg"])[1]),  
log(10\*PICT\_Bglu[PICT\_Bglu\$Cu\_Niveaux=="C7","Cu\_mgkg"])[1],length=10000))

BgluPredictions=predict(Modelisation\_BGlu,newdata=xData,level=0.95,interval="confidence")

BgluPredictions=cbind.data.frame(xData,BgluPredictions)

#Exporter les valeurs modélisées

write.csv(BgluPredictions,dlgSave())\$res)

#Graphe

ggplot(PICT\_BGlu,aes(x=Cu\_mgkg,y=Pourcentage))+

geom\_point(aes(x=Cu\_mgkg,y=Pourcentage))+

scale\_x\_log10()+

geom\_ribbon(data=BgluPredictions,aes(x=BgluPredictions\$Cu\_mgkg,y=BgluPredictions\$Prediction,  
ymin=BgluPredictions\$Lower,ymax=BgluPredictions\$Upper),alpha=0.2)+

geom\_line(data=BgluPredictions, aes(x=BgluPredictions\$Cu\_mgkg,y=BgluPredictions\$Prediction))+

xlab("[Cu] mg/kg sédiment sec")+

ylab("Activité beta-glucosidase (% du contrôle))+

scale\_y\_continuous(limits=c(-0.125,1.125))+

ggtitle(NomEchantillon)+

theme\_light()

**13. Annexe 3 : Exemple de fichier de données préparées pour modéliser la courbe dose-réponse et calculer les CEx pour une station**

<b>Cu_Niveaux</b>	<b>Cu_mgkg</b>	<b>Replicat_Tech</b>	<b>Replicat_Bio</b>	<b>Bglu</b>
C0	0.0	1	1	120.73
C0	0.0	2	1	106.10
C0	0.0	3	1	114.27
C1	4.2	1	1	106.91
C2	42.9	1	1	97.67
C3	411.1	1	1	83.37
C4	1345.1	1	1	50.27
C5	4327.1	1	1	29.04
C6	13248.2	1	1	2.74
C7	40221.2	1	1	0.00
C0	0.0	1	2	60.59
C0	0.0	2	2	62.88
C0	0.0	3	2	62.38
C1	3.1	1	2	58.60
C2	30.3	1	2	58.75
C3	306.8	1	2	47.97
C4	948.2	1	2	32.16
C5	3117.2	1	2	18.20
C6	10183.4	1	2	5.14
C7	29331.2	1	2	0.00
C0	0.0	1	3	83.73
C0	0.0	2	3	84.40
C0	0.0	3	3	88.46
C1	3.6	1	3	86.21
C2	35.4	1	3	76.78
C3	380.9	1	3	67.16
C4	1126.3	1	3	43.61
C5	3557.4	1	3	26.32
C6	11360.4	1	3	3.44
C7	34803.3	1	3	0.00

Année	Saison	Site	Station	CE50 (mg Cu/ kg sédiment sec) et intervalle de confiance à 95%	Concentration en métaux (mg/kg sédiment sec)											
					Al	As	Cd	Co	Cr	Cu	Fe	Mn	Ni	Pb	Zn	
2017	Hiver	Ain	Banc 1	238.8 [ 188.1 ; 289.5 ]	2590	Nd	0.43	Nd	4.92	2.38	5537	134.07	6.13	3.76	17.25	
2017	Hiver	Ain	Banc 2	158.6 [ 133.9 ; 183.2 ]	1888	Nd	0.43	Nd	3.69	1.53	3685	111.86	3.45	2.01	14.90	
2017	Été	Ain	Banc 1	21.3 [ 16.9 ; 25.6 ]	1220	Nd	0.43	Nd	1.70	0.73	2991	94.20	2.57	2.20	10.82	
2017	Été	Ain	Banc 2	63.2 [ 26.5 ; 99.8 ]	1336	Nd	0.43	Nd	2.18	1.48	3317	102.58	4.09	2.19	12.18	
2018	Printemps	Ain	Banc 1	243.9 [ 180.4 ; 307.5 ]	2551	Nd	0.43	Nd	5.39	2.62	4123	128.67	4.37	2.80	16.42	
2018	Printemps	Ain	Banc 2	1344.5 [ 1012.9 ; 1676.0 ]	4706	Nd	0.43	Nd	8.11	6.14	6379	173.16	6.76	6.70	26.92	
2018	Été	Ain	Banc 1	38.6 [ 29.2 ; 51.0 ]	1429	Nd	0.43	Nd	3.16	1.06	3482	102.11	4.31	2.00	12.17	
2018	Été	Ain	Banc 2	1460.5 [ 1087.7 ; 1833.3 ]	5785	Nd	0.43	Nd	10.62	5.66	6877	155.94	8.06	5.88	27.63	
2017	Printemps	Ardieres	chatillon	1943.0 [ 1376.2 ; 2509.8 ]	4222	22.68	Nd	1.97	5.63	3.47	4689	131.40	2.60	15.30	28.70	
2017	Printemps	Ardieres	montmay	1999.0 [ 1394.4 ; 2603.5 ]	7739	51.81	Nd	6.45	17.05	21.46	11994	339.10	9.65	75.12	61.29	
2017	Printemps	Ardieres	pizay	1873.0 [ 1379.4 ; 2366.6 ]	7857	40.63	Nd	6.84	19.70	21.37	12287	270.80	10.76	54.21	53.25	
2017	Été	Ardieres	chatillon	1231.4 [ 915.0 ; 1547.8 ]	5887	24.91	Nd	2.39	7.37	4.43	4927	132.42	3.46	17.27	34.35	
2017	Été	Ardieres	montmay	2225.9 [ 1923.4 ; 2528.5 ]	10442	52.99	Nd	6.94	21.53	36.01	11698	242.38	11.92	79.83	71.36	
2017	Été	Ardieres	pizay	1622.6 [ 1380.2 ; 1865.1 ]	13084	35.47	Nd	8.71	31.50	56.27	14045	333.33	16.23	67.39	86.43	
2017	Automne	Tillet	amont	2370.4 [ 1216.5 ; 3524.3 ]	6367	4.65	Nd	3.15	16.28	19.36	8345	166.78	12.60	15.84	94.56	
2017	Automne	Tillet	meandre	2087.1 [ 1695.5 ; 2478.7 ]	4364	1.73	Nd	3.12	26.77	13.13	8043	109.54	12.39	8.63	60.89	
2018	Automne	Tillet	amont	2276.0 [ 1562.3 ; 2989.7 ]	<i>en cours d'acquisition</i>											
2018	Automne	Tillet	port	3349.9 [ 2272.7 ; 4427.0 ]	<i>en cours d'acquisition</i>											
2018	Automne	Peisey-Nancroix	sed14	110.1 [ 27.7 ; 192.5 ]	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd	22.00	Nd	Nd	Nd	Nd	8	Nd
2018	Automne	Peisey-Nancroix	sed02	194.6 [ 31.6 ; 357.6 ]	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd	25.50	Nd	Nd	Nd	Nd	141.00	Nd
2018	Automne	Peisey-Nancroix	sed06	1792.0 [ 694.1 ; 2889.8 ]	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd	20.00	Nd	Nd	Nd	Nd	144.00	Nd
2018	Automne	Peisey-Nancroix	sed08	40.5 [ 13.5 ; 67.6 ]	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd	18.00	Nd	Nd	Nd	Nd	8.00	Nd
2018	Automne	Peisey-Nancroix	sed15	199.1 [ 45.0 ; 353.2 ]	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd	17.00	Nd	Nd	Nd	Nd	10	Nd
2018	Automne	Peisey-Nancroix	sed10	31.2 [ -9.3 ; 71.7 ]	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd	9.00	Nd	Nd	Nd	Nd	331.50	Nd
2018	Automne	Peisey-Nancroix	sed13	110.4 [ 22.8 ; 198.0 ]	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd	16.00	Nd	Nd	Nd	Nd	7.00	Nd

Nd : non déterminé

Année	Saison	Site	Station	Granulométrie (%)				Matière organique (%)	Proportion de C, N, S en % de sédiment sec				Concentration en cations (g / kg sédiment sec)				
				> 500 µm	>200 µm	>50 µm	<50 µm		C Org	C tot	N tot	S	P tot	Na	K	Mg	Ca
2017	Hiver	Ain	Banc 1	10.2	59.5	23.3	7.0	3.08	5.870	9.880	0.060	Nd	0.20	0.10	0.52	2.42	251.67
2017	Hiver	Ain	Banc 2	4.9	76.9	14.6	3.5	2.11	6.350	10.050	0.043	Nd	0.19	0.11	0.48	2.82	239.00
2017	Eté	Ain	Banc 1	17.3	68.4	13.5	0.8	1.08	5.010	10.400	0.033	Nd	0.13	0.11	0.35	2.59	314.33
2017	Eté	Ain	Banc 2	62.4	30.8	4.6	2.2	1.23	6.650	10.930	0.047	Nd	0.16	0.16	0.47	3.36	312.00
2018	Printemps	Ain	Banc 1	14.1	62.9	17.8	5.2	2.13	Nd	10.000	0.050	Nd	0.15	0.11	0.51	2.71	391.67
2018	Printemps	Ain	Banc 2	0.9	38.2	43.9	17.0	3.67	Nd	9.900	0.110	Nd	0.26	0.11	0.84	2.96	358.67
2018	Eté	Ain	Banc 1	12.9	66.0	19.7	1.5	1.28	Nd	10.100	0.030	Nd	0.12	0.10	0.32	2.41	358.00
2018	Eté	Ain	Banc 2	5.6	39.3	35.2	19.8	3.35	Nd	8.300	0.110	Nd	0.20	0.12	0.68	2.83	270.67
2017	Printemps	Ardieres	chatillon	47.9	37.9	9.5	4.7	1.47	0.373	0.487	0.027	0.020	1.50	0.25	0.43	1.12	0.41
2017	Printemps	Ardieres	montmay	41.7	41.8	12.4	4.0	1.74	0.260	0.283	0.023	0.020	4.00	0.25	1.43	2.80	1.77
2017	Printemps	Ardieres	pizay	22.7	45.1	26.6	5.6	1.86	0.277	0.377	0.030	0.020	4.60	0.25	1.25	3.02	2.16
2017	Eté	Ardieres	chatillon	49.2	33.1	10.8	6.8	1.87	<i>en cours d'acquisition</i>								
2017	Eté	Ardieres	montmay	34.7	40.7	15.3	9.3	3.10	<i>en cours d'acquisition</i>								
2017	Eté	Ardieres	pizay	25.6	30.3	19.6	24.5	4.40	<i>en cours d'acquisition</i>								
2017	Automne	Tillet	amont	10.3	18.1	37.1	34.4	6.23	<i>en cours d'acquisition</i>								
2017	Automne	Tillet	meandre	4.7	33.7	51.6	8.3	3.76	<i>en cours d'acquisition</i>								
2018	Automne	Tillet	amont	19.3	28.9	38.7	13.1	4.22	<i>en cours d'acquisition</i>								
2018	Automne	Tillet	port	36.4	32.8	23.4	7.4	3.79	<i>en cours d'acquisition</i>								
2018	Automne	Peisey-Nancroix	sed14	61.1	16.9	8.4	13.6	1.39	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd
2018	Automne	Peisey-Nancroix	sed02	42.1	26.6	19.4	11.9	2.12	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd
2018	Automne	Peisey-Nancroix	sed06	11.1	51.8	29.7	7.4	2.74	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd
2018	Automne	Peisey-Nancroix	sed08	5.3	28.4	46.4	19.8	1.48	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd
2018	Automne	Peisey-Nancroix	sed15	1.5	20.6	39.5	38.5	0.99	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd
2018	Automne	Peisey-Nancroix	sed10	25.7	54.1	19.4	0.9	1.16	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd
2018	Automne	Peisey-Nancroix	sed13	1.6	8.6	64.1	25.8	1.24	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd	Nd

Nd : non déterminé

## 15. Remerciements

Les auteurs remercient :

- la Région Auvergne-Rhône-Alpes, pour le cofinancement des suivis réalisés sur le lac Léman,
- les contributeurs listés,
- ainsi que l'ensemble des partenaires impliqués dans les différentes campagnes d'échantillonnage et en particulier Benoît Ferrari (Centre Ecotox Eawag-EPFL), Ahmed Tlili (Eawag), Emmanuel Naffrechoux (USMB LCME), Jean-Christophe Hustache (INRA CARTELE), Philippe Arpagaus et Jean-Luc Loizeau (Université de Genève).





**Irstea**

1, rue Pierre-Gilles de Gennes  
CS 10030  
92761 Antony Cedex

**01 40 96 61 21**

[www.irstea.fr](http://www.irstea.fr)

## **AGENCE FRANÇAISE POUR LA BIODIVERSITÉ**

*Établissement public du ministère de l'Environnement*

**Agence Française pour la Biodiversité**

Hall C – Le Nadar  
5, square Félix Nadar  
94300 Vincennes

**01 45 14 36 00**

[www.afbiodiversite.fr](http://www.afbiodiversite.fr)