

Rapport PIREN 2011

Axe 4

Evaluation intégrée de la pression chimique en Seine et de son impact par diverses réponses écotoxiques.

Lise Fechner¹, Jérémie Lebrun¹, Marine Perret¹, Aurélie Germain¹, Olivier Geffard², Christelle Clérandeau³, Pierre Labadie³, Hélène Budzinski³, Jérôme Cachot³, Isabelle George⁴, Adriana Anzil⁴, Pierre Servais⁴, Christophe Minier⁵, Maya Bimbot⁶, Viviane Huteau⁶, Yves Lévi⁶, Lucie Oziol⁶, Odile Dedourge-Geffard⁷, Laetitia Charron⁷, Adeline François², Patrice Noury², Hervé Quéau², Catherine Gourlay-Francé¹

¹ Irstea Antony, UR HBAN, Antony

² Irstea Lyon, UR MALY, Lyon

³ UMR 5805 EPOC-groupe LPTC, Bordeaux

⁴ Ecologie des systèmes aquatiques, ULB, Bruxelles

⁵ LEMA, Le Havre

⁶ LSPE, UMR 8079, Université Paris-Sud, Châtenay-Malabry

⁷ Université Reims Champagne Ardenne, Unité Interactions Animal-Environnement

Les travaux mis en œuvre en 2011 s'inscrivent dans la phase 6 de l'axe 4 du PIREN Seine. Ils avaient pour objectif de contribuer :

- d'une part à une meilleure évaluation du risque chimique en Seine en s'intéressant au phénomène de bioaccumulation et de transfert dans la chaîne trophique (sédiments, biofilms, gammares) de contaminants organiques dont le comportement dans le biote est aujourd'hui encore peu connu, et en cherchant à donner un sens écotoxique aux mesures chimiques par l'utilisation de mesures bio-analytiques au laboratoire permettant d'évaluer le potentiel toxique de différents compartiments (sédiments, eau : phase dissoute, particulaire) ;
- d'autre part au développement d'indicateurs écotoxicologiques permettant de relier la pression chimique à l'état de santé d'organismes vivants exposés *in situ* en se focalisant sur deux modèles biologiques : le compartiment microbien (biofilms et communautés bactériennes de la colonne d'eau et des sédiments) et le gammare.

Pour cela, trois sites ayant déjà fait l'objet de plusieurs campagnes de suivi ont été choisis sur la Seine à l'amont (Marnay) et à l'aval de l'agglomération parisienne (Bougival et Triel) pour faire le lien entre la présence de micropolluants et les réponses biologiques des organismes exposés dans le milieu naturel.

1. Présentation des sites

Les trois sites choisis pour cette campagne sont situés de l'amont (Marnay à environ 200 km de Paris) à l'aval (Bougival et Triel) de Paris sur la Seine ; le site de Triel est à l'aval du rejet de la station Seine-Aval.

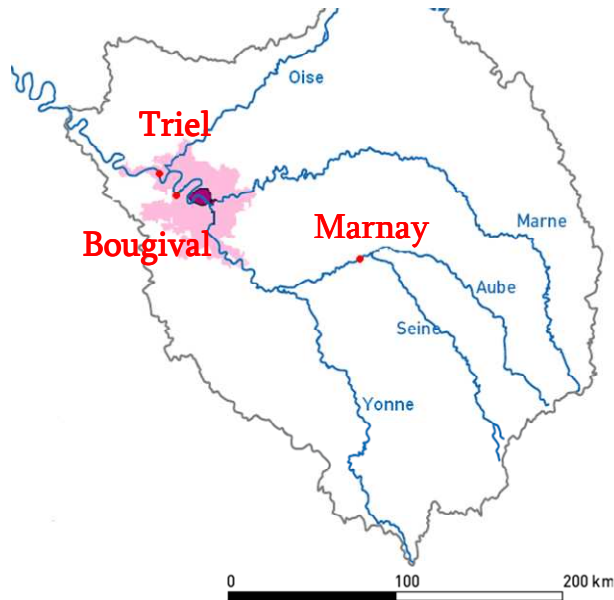


Figure 1 : Cartographie des trois sites.

Les résultats des mesures physico-chimiques réalisées en septembre 2011 (Figures 2 et 3) correspondent aux valeurs moyennes mesurées lors d'une campagne précédente en 2008-2009. Seule la valeur moyenne de pH à Marnay est plus faible que celle répertoriée précédemment.

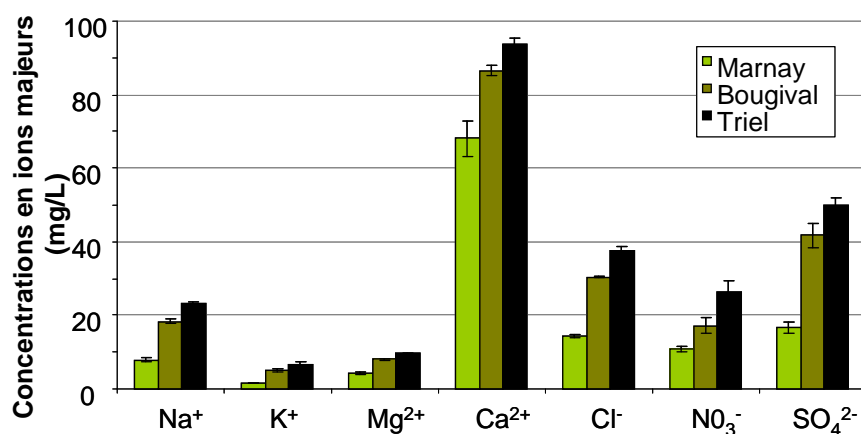


Figure 2 : Concentrations moyennes en anions et cations majeurs exprimées en mg/L. Les barres d'erreur représentent $\pm \sigma$ ($n = 3$; prélèvements ponctuels réalisés les 13, 20 et 27 septembre 2011).

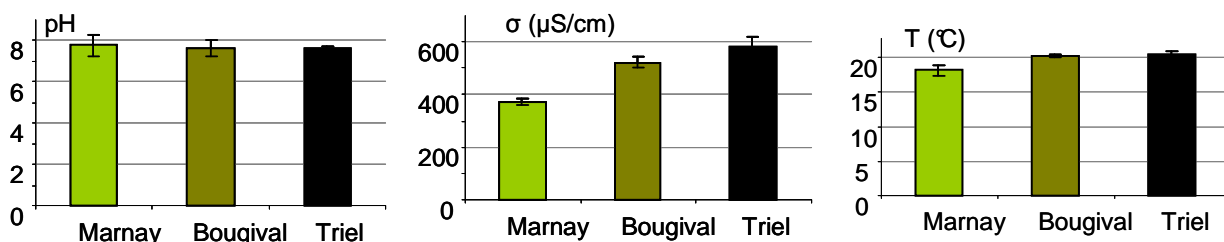


Figure 3 : Valeurs moyennes du pH, de la conductivité et de la température en septembre 2011. Les barres d'erreur représentent $\pm \sigma$ ($n = 3$; prélèvements ponctuels réalisés les 6, 20 et 27 septembre 2011).

Ces données illustrent l'existence d'un gradient physico-chimique entre l'amont (Marnay) et l'aval (Bougival et Triel) avec une augmentation des concentrations en ions majeurs, notamment les ions nitrates dont la concentration moyenne évolue de 10.9 à 17.1 puis 26.3 mg/L le long du fleuve. Une augmentation de l'amont à l'aval est constatée également pour la conductivité et la température avec une différence moyenne de 2.3 degrés entre Marnay et les deux autres sites.

2. Evaluation de la pression chimique et du potentiel toxique

2.1 Pression chimique et bioaccumulation dans les organismes vivants (Irstea Antony, UMR EPOC-groupe LPTC)

La présence de différents contaminants a été recherchée sur les trois sites :

- micropolluants métalliques dans les phases dissoute, particulaire, et labile échantillonnée par DGT¹ (échantillonneurs passifs immergées en Seine le 30/08/11 et prélevées le 27/09/11) ainsi que dans les biofilms et les gammars engagés ;
- Hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP) échantillonnés par SPMD² (mêmes dates que pour les DGT) ;
- micropolluants organiques hydrophiles échantillonnés par POCIS³ (idem) ;
- micropolluants organiques dont HAP, polychlorobiphényles (PCB) et pesticides organochlorés (OCP) dans les sédiments et les organismes vivants (gammars et biofilms).

2.1.a HAP dans la colonne d'eau

Les contaminants mesurés dans la colonne d'eau (Figure 4) révèlent un gradient physico-chimique particulièrement marqué pour les HAP avec des facteurs multiplicatifs entre Marnay et les sites en aval de Paris variant de 1,1 (Acénaphthylène, concentration de Triel par rapport à Marnay) à 35,7 (Benzo(a)anthracène, Bougival). Par ailleurs, les concentrations mesurées à Bougival sont systématiquement supérieures à celles mesurées à Triel d'un facteur variant de 1,4 (Acénaphthylène) à 2,4 (Acénaphthène) et en moyenne de 1,8.

Les concentrations obtenues correspondent à celles mesurées de la campagne précédente en 2008-2009 (Gourlay-Francé *et al.* 2010).

¹ Diffusive Gradient in Thin Film : échantillonneur passif permettant l'extraction et la concentration *in situ* des métaux labiles.

² Semi-Permeable Membrane Device échantillonneur passif permettant l'extraction et la concentration *in situ* des contaminants hydrophobes labiles.

³ Polar Organic Chemical Integrative Sampler : échantillonneur passif permettant l'extraction et la concentration *in situ* des molécules organiques polaires.

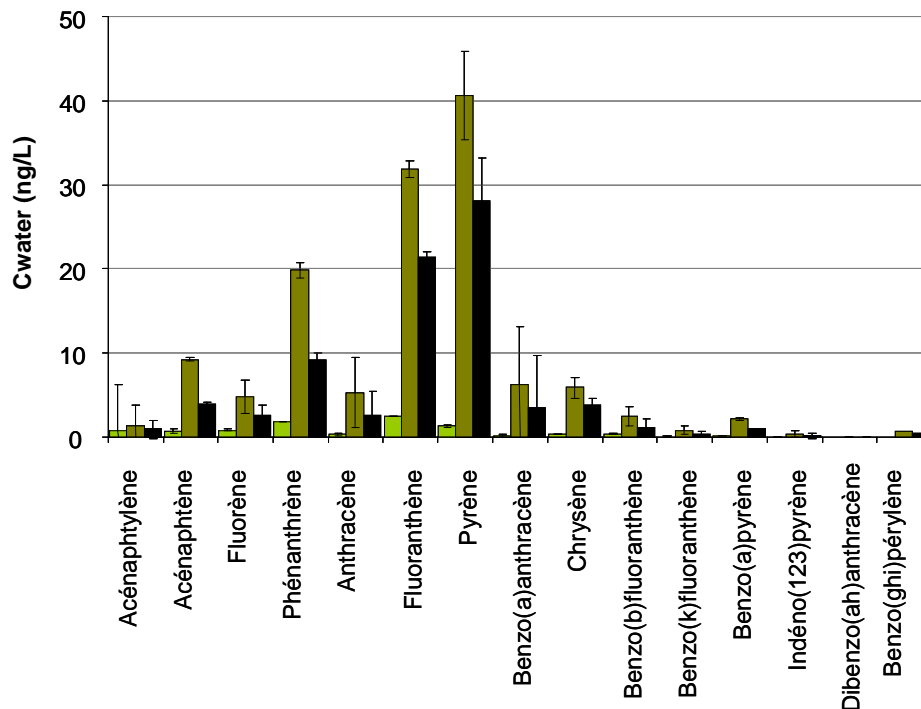


Figure 4 : Concentrations en HAP SPMD-labiles en ng/L.

2.1.b Micropolluants métalliques

Les concentrations en métaux (Cd, Cu, Ni, Pb, Zn, Cr, Co, Mn, Ag, Sb) totaux et dissous ont été mesurées à partir de prélèvements ponctuels réalisés les 30/08, 6, 13, 20 et 27/09/11. Les concentrations en métaux labiles ont été mesurées par DGT.

Les valeurs obtenues correspondent à celles de la campagne 2008-2009 (Priadi *et al.* 2011).

Pour tous les métaux analysés, un gradient amont/aval apparaît avec des concentrations plus élevées en aval de Paris qu'à Marnay d'un facteur variant entre 1,08 (Cr labile, rapport des concentrations entre Triel et Marnay) et 11,9 (Cd labile, rapport des concentrations entre Bougival et Marnay) et des niveaux de contamination similaires sur les deux sites aval (Figure 5).

On remarque que les concentrations en Cd, Ni et Pb sont bien inférieures aux normes de qualité environnementale (NQE) de la Directive Cadre sur l'Eau (DCE) (respectivement 0,25, 20 et 7,2 µg/L pour une eau riche en calcium, soit CaCO₃ > 200 mg/L), à comparer à des concentrations en métal dissous maximales mesurées de 0,09 µg Cd/L à Bougival, 3,11 µgNi/L à Triel et 0,44 µgPb/L à Triel). Pour le Cu et le Zn, les concentrations en métaux dissous mesurées à Bougival et à Triel, nettement supérieures à celles mesurées à Marnay (facteur 3 entre l'amont et l'aval pour le Cu et facteur 6 à 7 pour le Zn), sont de l'ordre de grandeur des NQE de la DCE (1,4 et 7,8 µg/L) avec une concentration moyenne légèrement supérieure à la norme à Triel (1,86 µg/L) et à Bougival (1,52 µg/L) pour le Cu et respectivement de 9,20 et 7,68 µg/L pour le Zn.

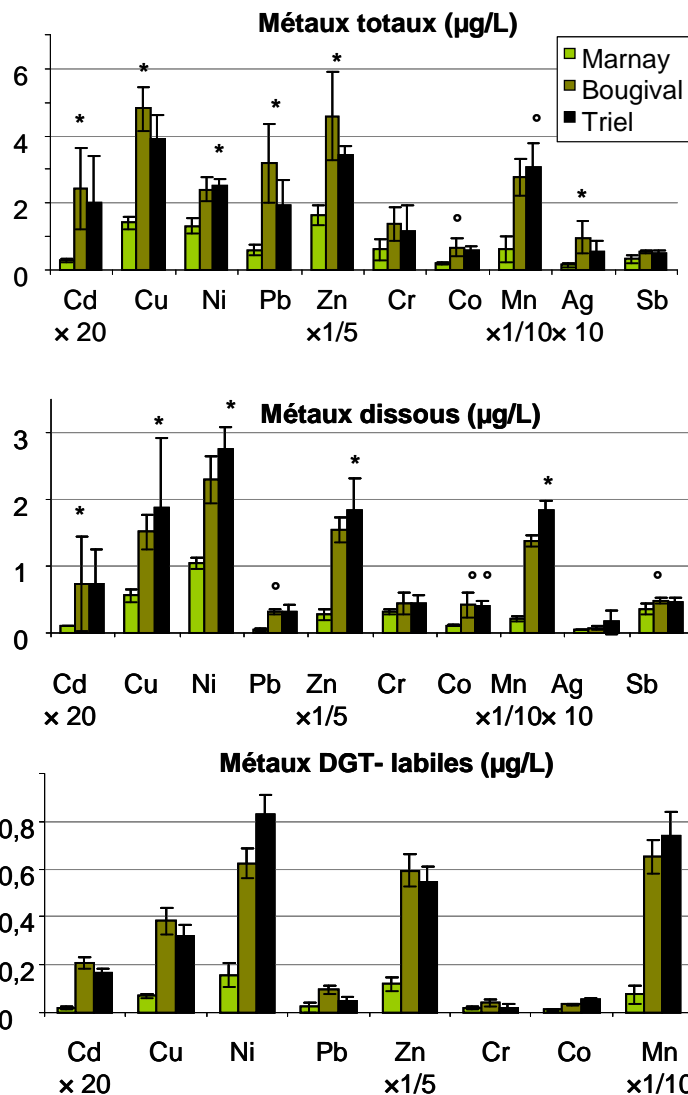


Figure 5 : Concentrations moyennes en métaux totaux, dissous et labiles exprimées en µg/L. Les barres d'erreur représentent $\pm \sigma$ ($n = 4$ pour les métaux totaux et dissous, $n = 3$ pour les métaux labiles). Pour les métaux totaux et dissous, les symboles indiquent une différence significative par rapport à la valeur de Marnay (test de Kruskal-Wallis : $p = 0.05$ et test Dunn * : $p = 0,025$ et ° : $p = 0,05$).

2.1.c Bioaccumulation des micropolluants métalliques dans les biofilms

Des biofilms périphytiques ont été prélevés les 20 et 27/09/11 sur les trois sites après colonisation de supports artificiels (membranes plastiques LDPE) immergés dans la Seine le 30/08/11. Les concentrations en métaux totaux accumulés dans les biofilms ont été analysées après minéralisation des échantillons suivant un protocole établi (Fechner *et al.* 2012a). Mis à part pour le biofilm de Marnay, pour lequel il apparaît une nette augmentation de la concentration métallique totale entre le premier et le second prélèvement (au maximum un facteur d'augmentation de 20 pour le cadmium), les concentrations mesurées aux deux dates sont similaires (facteurs de variation entre les deux prélèvements en moyenne égal à 1 pour tous les métaux pour les biofilms de Bougival et de Triel). Ceci suggère qu'un équilibre est atteint en termes de bioaccumulation des métaux après 3 semaines de colonisation *in situ* à Bougival et à Triel.

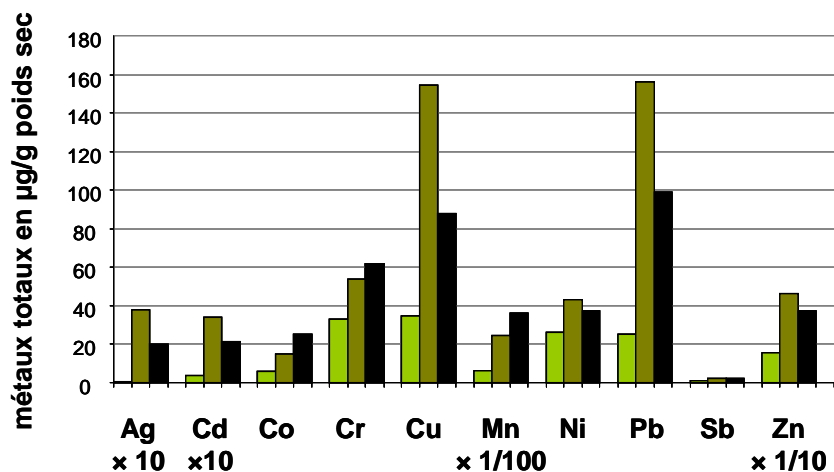


Figure 6 : Concentrations en métaux totaux accumulés dans les biofilms prélevés le 27/09/11 exprimées en µ de métal/g de poids sec.

Le gradient de contamination métallique dans la colonne d'eau de l'amont à l'aval de Paris (Figure 5) se traduit par un gradient métallique dans les biofilms naturels prélevés sur les trois sites (Figure 6). Les concentrations en métaux totaux accumulés sont en effet supérieures dans les deux biofilms prélevés en aval (facteur d'augmentation par rapport au biofilm de Marnay variant entre 1,4 pour le Ni et 8,8 pour le Cd). Pour la majorité des métaux (hormis Cr, Co et Mn), les concentrations accumulées dans le biofilm de Bougival sont plus fortes que les concentrations accumulées dans le biofilm de Triel (facteur de variation compris entre 1,1 et 1,9 pour ces métaux).

2.1.d Bioaccumulation des micropolluants métalliques dans les gammarus

Les objectifs de travaux présentés ci-après étaient de :

- caractériser la contamination biodisponible en métaux des sites-ateliers disposés le long de l'axe Seine par transplantations de gammarus contrôlés
- déterminer si les capacités à accumuler les métaux diffèrent entre espèces de gammarus très proches, telles que *pulex* et *fossarum*
- caractériser la contamination métallique des sites selon des seuils de référence définis chez *Gammarus fossarum*.

A ces fins, deux espèces de gammarus, *G. pulex* et *G. fossarum*, ont été engagés sur les sites-ateliers de Marnay, Bougival et Triel durant une et deux semaines (du 6 au 20 Septembre 2011). Les quantités de métaux accumulés dans les tissus des organismes (Ag, Cd, Cr, Co, Cu, Mn, Ni, Pb et Zn) ont été déterminées par spectrométrie de masse (ICP-MS) après minéralisation des gammarus (Pellet *et al.* 2009).

Les différences de teneurs corporelles en métaux mesurées au début et à la fin des transplantations confirment que les gammarus accumulent efficacement l'ensemble des métaux testés. Ces teneurs mesurées après une ou deux semaines d'engagement sont comparables, ce qui suggère que l'équilibre des échanges métalliques entre les organismes et les milieux est atteint dès la première semaine d'exposition.

A l'exception du Ni, les profils de contamination entre les deux espèces de gammarus sont identiques et suivent étroitement le gradient de contamination amont/aval de l'axe Seine (Figure 7). Néanmoins, le gradient de contamination des gammarus dans le cas du Cu et du Zn

sont moins prononcés que pour d'autres métaux, certainement du au fait que ces métaux sont des éléments essentiels bien régulés par les gammares.

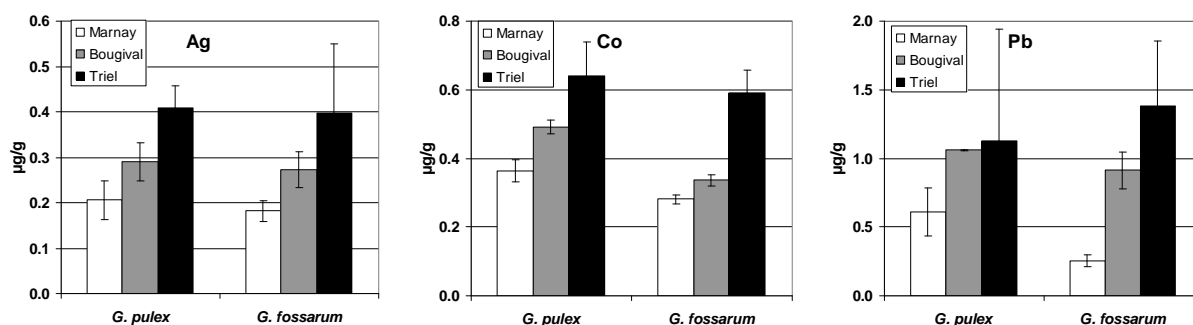


Figure 7 : Concentrations en métaux (Ag, Co et Pb) dans les gammares en µg/g de poids sec après deux semaines d'encagement.

Ces résultats confirment que les gammares sont de bons indicateurs de la contamination biodisponible des milieux aquatiques. Cependant, aucun lien direct ne peut être établi entre les teneurs en métaux mesurées dans les organismes et les niveaux de contamination des eaux des sites. Cela peut s'expliquer par l'hétérogénéité des propriétés physiques et chimiques entre les sites (température, pH, conductivité, composition ionique, teneur en matière organique...), lesquelles peuvent influencer la biodisponibilité des métaux et donc, la bioaccumulation des métaux par les gammares (cf. présentation des sites).

Pour l'ensemble des métaux, les capacités des deux espèces de gammares à accumuler les contaminants métalliques sont semblables, à l'exception du Pb et du Mn. En effet, les facteurs de bioconcentration sont au moins deux fois supérieurs chez *G. fossarum* que chez *G. pulex* (Figure 8). Par conséquent, *G. fossarum* présente une meilleure sensibilité que *G. pulex* pour détecter la fraction biodisponible de ces métaux dans la colonne d'eau.

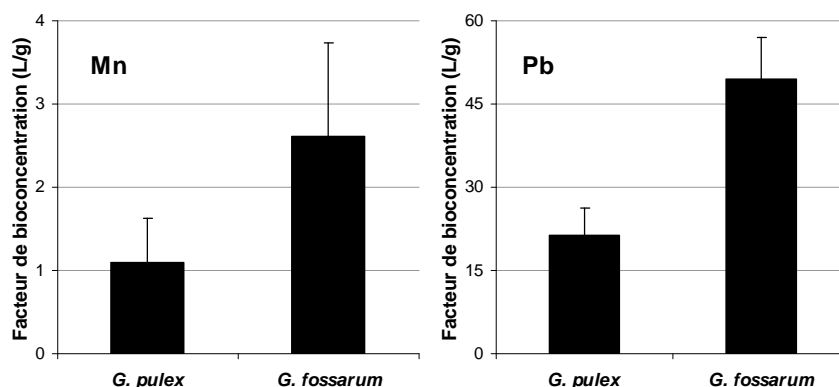


Figure 8 : Comparaison des facteurs de bioconcentration du Pb et du Mn entre les deux espèces de gammares encagés pendant deux semaines. Les facteurs ont été déterminés comme les rapports de la quantité nette de métal accumulé par les gammares sur la fraction labile des métaux mesurée sur les trois sites.

Des valeurs seuils de teneurs corporelles en métaux ont été définies par le laboratoire d'Irstea Lyon lors de transplantations de *G. fossarum* sur une trentaine de sites plus ou moins contaminés en métaux en région Lyonnaise (Besse *et al.* 2012). Ces valeurs seuils permettent de relativiser la contamination des sites-ateliers de l'axe fluvial Seine. En effet, bien que les teneurs corporelles en métaux chez *G. fossarum* augmentent de l'amont en aval (Figure 7), les profils de la contamination restent inférieurs aux valeurs seuils définis chez cette même

espèce. Seule une contamination marquée au Co est observée à Triel et au Pb sur les sites amont, Bougival et Triel (Figure 9).

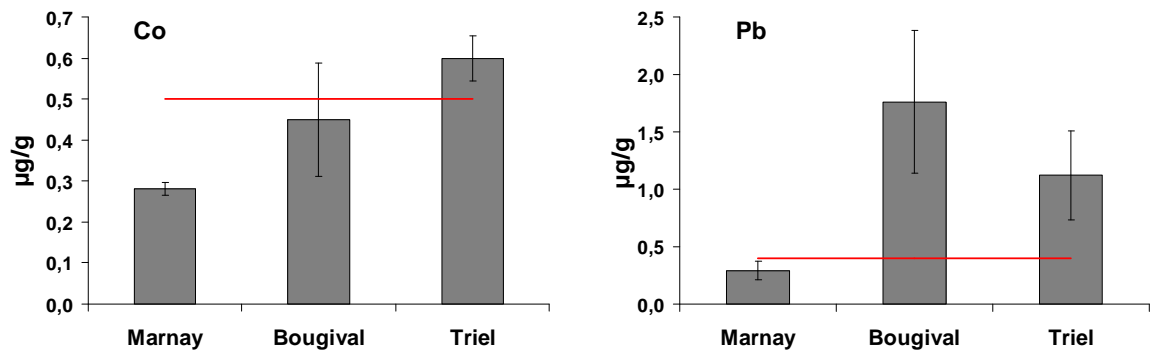


Figure 9 : Comparaison des teneurs corporelles en Co et en Pb mesurées chez *G. fossarum* après une semaine d'encagement aux valeurs de référence définies chez cette même espèce.

2.1.e Etude comparative des niveaux de contaminants hydrophobes dans le sédiment et le biote (biofilm et gammare)

L'objectif de ces travaux était de contribuer à l'étude intégrée des sites pilotes de l'axe fluvial, en déterminant les niveaux de contamination du sédiment et de la colonne d'eau (par échantillonnage intégratif de type POCIS dans ce dernier cas). Il s'agissait également de renseigner la bioaccumulation des micropolluants hydrophobes par le biofilm périphtyrique et le gammare. Les familles de contaminants ciblées étaient les suivantes : HAP, PCB, éthers de biphényles polybromés PBDE, pesticides organo-chlorés (OCP), alkylphénols, acides perfluorés (PFC), médicaments et pesticides. Les résultats partiels présentés ci-après concernent les PCB, OCP et HAP.

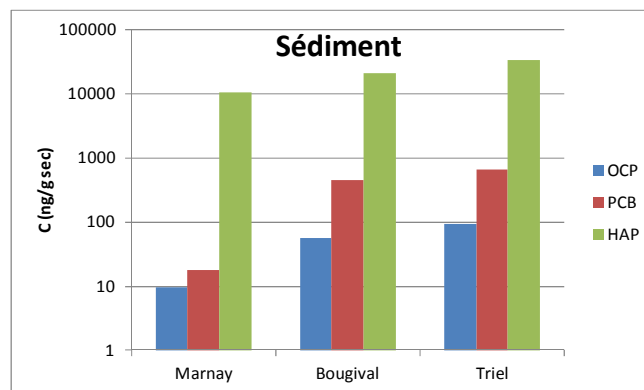


Figure 10 : Histogramme des concentrations en OCP, PCB et HAP en mg/g de poids sec dans les sédiments de Marnay, Bougival et Triel.

Les résultats présentés sur la Figure 10 mettent en évidence la présence généralisée des OCP, PCB et HAP dans les sédiments. Un fort gradient amont-aval est observé, notamment dans le cas des OCP et des PCB, en lien direct avec l'augmentation de la pression anthropique largement documentée par ailleurs. Ce gradient est moins prononcé pour les HAP, pour lesquels les teneurs observées sont très élevées. Il est important de noter également que les niveaux de contamination observés pour les deux stations aval sont relativement proches.

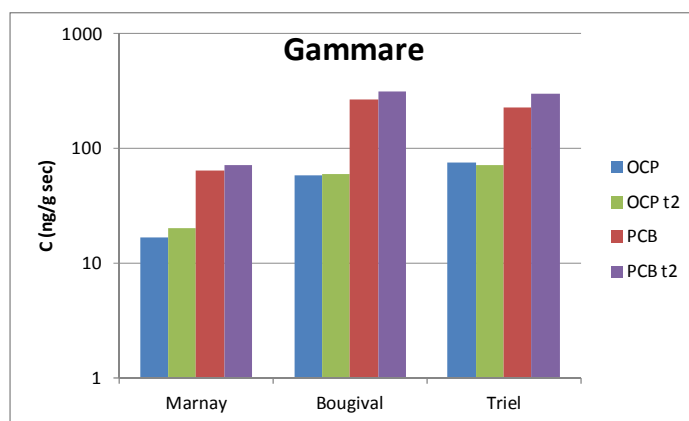


Figure 11 : Concentrations en OCP et PCB mesurées dans les gammarens en ng/g de poids sec.

Il apparaît une évolution spatiale chez les gammarens transplantés une (t1) ou deux (t2) semaines sur ces mêmes sites, similaire à celle observée dans le sédiment, aussi bien pour les OCP que pour les PCB (Figure 11). Par ailleurs, la bioaccumulation observée à t1 est sensiblement équivalente à celle observée à t2, ce qui suggère qu'une situation d'équilibre est rapidement atteinte. Des travaux réalisés antérieurement dans le PIREN-Seine avaient permis de montrer que le gammarens pouvait constituer un bon indicateur de la contamination du milieu pour des contaminants hydrophobes. Les résultats obtenus en 2011 indiquent néanmoins que le rapport des niveaux de contamination du sédiment et des gammarens (ng/g sec dans les deux compartiments) montre une tendance décroissante de l'amont vers l'aval. Ceci pourrait peut-être s'expliquer par une biodisponibilité moindre des PCB et des OCP sur les sites les plus contaminés. Ces résultats préliminaires devront être confirmés sur de nouvelles séries d'échantillons, en procédant également à une normalisation des données par rapport au taux de lipides (gammarens) et de carbone organique (sédiment).

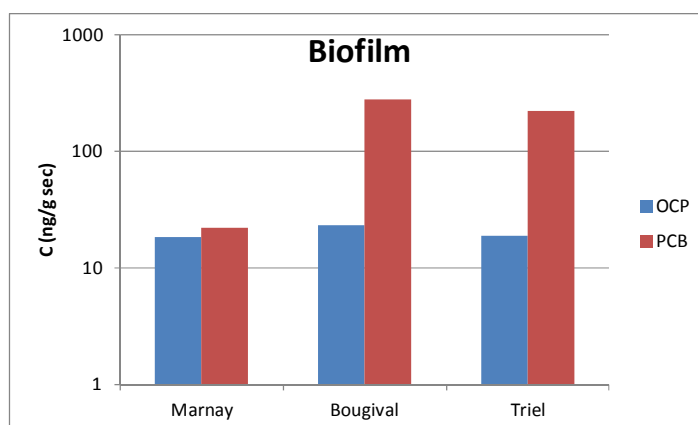


Figure 12 : Concentrations en OCP et PCB mesurées dans les biofilms prélevés sur les trois sites en ng/g de poids sec.

Concernant le biofilm, l'évolution spatiale des teneurs en PCB est similaire à celle observée pour les gammarens et le rapport des teneurs biofilm/sédiment décroît d'amont en aval. Pour les OCP, en revanche, aucune variation spatiale n'est observée sans que cette absence de tendance puisse être expliquée en l'état actuel des connaissances.

Les niveaux de contamination des stations pilotes par les acides et sulfonates perfluorés (biote sédiment) ainsi que par les alkylphénols, pesticides et résidus de médicaments seront

déterminés prochainement sur les échantillons prélevés en septembre 2011. L'ensemble de ces résultats devra être confirmé sur d'autres échantillons, prélevés à l'occasion de nouvelles campagnes réalisées en 2012.

Les mesures effectuées dans différents compartiments (eau, sédiment) confirment donc la présence d'un gradient urbain à la fois physico-chimique (ions majeurs, température, etc.) et chimique (micropolluants organiques et métalliques) entre l'amont (Marnay) et l'aval (Bougival et Triel) de Paris. Ce gradient est retrouvé en termes de bioaccumulation des métaux et organiques dans les organismes vivants.

2.2 Mesure des potentiels toxique et perturbateur endocrinien

2.2.a Evaluation de la toxicité et identification des molécules toxiques dans le milieu par la méthode "EDA" (UMR EPOC-groupe LPTC)

Cette étude avait pour but d'évaluer la toxicité globale en Seine en prenant en compte la phase dissoute, les matières en suspension (MES) et le sédiment. Les MES sont en cours d'analyse. Des échantillons d'eau et de sédiments ont été collectés au niveau de trois sites en amont (Marnay) et en aval (Bougival et Triel) de Paris le 21 septembre 2011. L'eau a été immédiatement filtrée sur 0,7 µm afin de séparer la phase dissoute et la phase particulaire. Les sédiments comme les matières en suspension ont été congelés à -20°C.

L'ensemble des échantillons a été analysé avec le test embryo-larvaire Médaka (MELA). Cet essai consiste à exposer en conditions contrôlées pendant 8 à 9 jours à 26°C des embryons de poisson médaka (*Oryzias latipes*) aux échantillons environnementaux (eau, matière en suspension, sédiment) et de mesurer les effets induits en termes de mortalité, retard d'éclosion, succès d'éclosion, croissance, malformations. Les effets ont été comparés à une eau de référence (eau de source) ou à un sédiment de référence (Yville-sur-Seine).

Les analyses réalisées sur les sédiments font apparaître une toxicité aiguë très marquée pour le sédiment de Triel avec un accroissement significatif de la mortalité embryonnaire et un échec total d'éclosion. Pour ce même sédiment un ralentissement significatif de l'activité cardiaque des embryons a également été observé. Par ailleurs, un accroissement significatif des malformations notamment cardiaques a été observé pour les embryons exposés aux sédiments de Marnay et de Bougival (Tableau I).

Tableau I : Toxicité relative des sédiments collectés en amont et en aval de Paris par comparaison au sédiment de référence d'Yville-sur-Seine. Les astérisques indiquent des différences significatives par rapport au groupe contrôle $p < 0,05$.

| Sites | Survie embryons (%) | Taux d'éclosion (%) | Taille des larves (mm) | Larves malformées (%) | Activité cardiaque (batt/min) |
|------------------|---------------------|---------------------|------------------------|-----------------------|-------------------------------|
| Yville-sur-Seine | 97,3 | 92 | 4,32 | 17,8 | 112,1 |
| Marnay | 100 | 92 | 4,18 | 35,6* | 113,7 |
| Bougival | 100 | 92 | 4,10 | 51,1* | 117,3 |
| Triel | 89,3* | 0* | nd | Nd | 84,5* |

(nd) non déterminé en raison de l'absence de larves.

L'exposition des embryons de médaka à l'eau filtrée collectée à Bougival et à Triel s'est traduite par une augmentation significative de la mortalité embryonnaire par rapport à l'eau de référence et l'eau de Marnay (Tableau II). De même une diminution significative du taux

d'éclosion a été observée pour les embryons exposés à l'eau de Triel et Bougival par rapport à ceux exposés à l'eau de référence. Le taux de malformations est très élevé pour les embryons exposés à l'eau de Bougival mais concerne un nombre d'individus trop limité pour être significatif.

Tableau II : Toxicité des eaux filtrées collectées en amont et en aval de Paris par comparaison à une eau de source. Les astérisques indiquent les différences significatives par rapport au groupe contrôle $p < 0,05$.

| Sites | Mortalité embryonnaire (%) | Taux d'éclosion (%) | Taille des larves (mm) | Larves malformées (%) | Activité cardiaque (batt/min) |
|---------------|----------------------------|---------------------|------------------------|-----------------------|-------------------------------|
| Eau de source | 6,7 | 93,3 | 4,60 | 28,6 | 115,8 |
| Marnay | 6,7 | 80,0 | 4,46 | 21,4 | 108,9 |
| Bougival | 46,7* | 26,7* | 4,38 | 83,3 | 107,0 |
| Triel | 66,7* | 40,0* | 4,40 | 25,0 | 114,3 |

Ces résultats montrent globalement une toxicité plus élevée de l'eau (phase dissoute) et des sédiments sur les sites en aval de Paris et notamment sur le site de Triel. Ces données encore préliminaires restent à confirmer au cours de nouvelles campagnes en 2012.

2.2.b Evaluation du potentiel perturbateur endocrinien (LSPE, Paris sud)

Le potentiel toxicologique *in vitro* de la contamination au niveau des trois sites pilotes de l'axe fluvial a été évalué à la fois au niveau de la colonne d'eau et au niveau du sédiment (campagne du 27/09/2011). Parmi les contaminants recherchés, nombreux sont ceux qui sont connus pour être des perturbateurs endocriniens (PE). Les potentiels perturbateurs estrogénique et thyroïdien de la phase dissoute et du sédiment ont ainsi été caractérisés en utilisant deux tests cellulaires de mesure de la perturbation de l'activité transcriptionnelle de récepteurs nucléaires hormono-dépendants, les hormones endocrines induisant la majorité de leurs effets *via* la voie génomique. Il s'agit des tests sur cellules MELN (Balaguer *et al.* 1999) et PC-DR-LUC (Jugan *et al.* 2007) permettant d'évaluer respectivement la perturbation de la transcription dépendante du récepteur ER α à l'estrogène E2 (le 17 β -estradiol) et celle dépendante du récepteur TR α 1 à l'hormone thyroïdienne T3 (la triiodothyronine).

Une large gamme de micropolluants organiques a été extraite et concentrée à partir des deux matrices, eau et sédiment. Les extraits ont ensuite été testés à des concentrations non toxiques et adaptées à la sensibilité des tests cellulaires. Les cellules ont été incubées avec les extraits pendant 18 h :

- soit en absence du ligand hormonal (E2 ou T3) du récepteur nucléaire pour évaluer le potentiel agoniste des extraits vis à vis de l'activité de ER α ou TR α 1 (Figure 13) ;
- soit en présence du ligand hormonal du récepteur nucléaire pour évaluer les effets compétitifs des extraits vis à vis de l'activité transcriptionnelle induite par E2 ou T3 : potentiel surinducteur (effet potentialisateur) ou potentiel antagoniste résultats non illustrés, leur expression restant à valoriser).

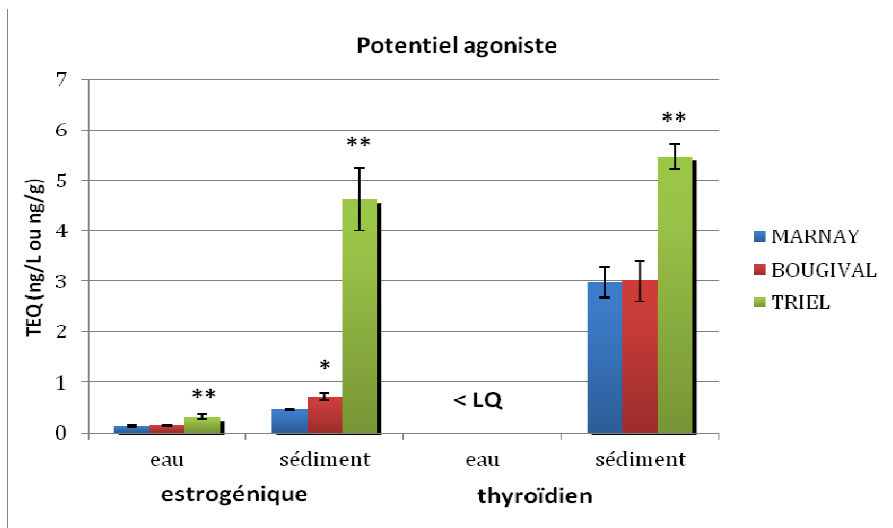


Figure 13 : Potentiel agoniste estrogénique et thyroïdien de l'eau (en ng/L) et des sédiments (en ng/g) pour les sites de Marnay, Bougival et Triel (exprimé en TEQ induits par rapport au contrôle en absence d'hormone). ** $p < 0,01$ et * $p < 0,05$ en test de *t* de Student ; comparaison de Triel / Bougival et de Marnay et Bougival / Marnay ($n = 2$).

Les activités transcriptionnelles ont été mesurées par luminescence. Les activités significativement différentes du contrôle ont été exprimées en Equivalent Toxique (TEQ) par rapport à l'activité du ligand hormonal mesurée en parallèle (quantification à partir des paramètres de l'équation de Hill de la relation dose-réponse pour E2 ou T3). La viabilité cellulaire a été mesurée en parallèle, et aucun extrait n'a engendré de toxicité cellulaire nécessitant une dilution de l'extrait. Pour plus de détails sur les matériels et méthodes, voir Gaspéri *et al.* (2010).

La phase dissoute présente un potentiel perturbateur estrogénique significatif, caractérisé par un effet agoniste de l'activité du récepteur ER α (potentiel estrogénique). A l'inverse, les activités thyroïdiennes mesurées sur cellules PC-DR-LUC sont significativement différentes du contrôle (** $p < 0,01$ pour Triel et * $p < 0,05$ pour Bougival et Marnay en test de *t* de Student), mais sont non quantifiables en TEQ. Néanmoins, ces activités détectées varient dans le même sens que celles quantifiées sur cellules MELN.

Un gradient d'activité estrogénique de l'eau peut être observé d'amont en aval, l'activité étant significativement plus élevée en amont (Triel) qu'en aval (Marnay), celle de Bougival étant similaire à celle de Marnay. Ce gradient d'activité, ainsi que les niveaux de TEQ quantifiés, confirment ce qui a déjà été observé lors de campagnes antérieures sur l'axe Seine (Gaspéri *et al.* 2010). Les estrogènes pourraient être responsables du potentiel estrogénique des eaux de surface en Ile de France (Cargouët *et al.* 2004; Miège *et al.* 2009; Oziol *et al.* 2009), mais l'effet d'autres contaminants reconnus comme PE au niveau des sites les plus impactés par la pollution (cas de Triel-sur-Seine) reste à considérer.

Les activités transcriptionnelles induites en présence de sédiment sont elles toutes quantifiables, quelles que soient les conditions. Les effets perturbateurs estrogénique et thyroïdien des sédiments sont significativement plus élevés pour Triel que pour Marnay et Bougival. Alors qu'un gradient d'activité croissant est observé de Marnay à Triel pour les effets perturbateurs estrogéniques des sédiments, les niveaux d'activité sont similaires entre Marnay et Bougival pour leurs effets perturbateurs thyroïdiens. Les activités PE similaires pour ces deux stations aval sont concordantes avec les niveaux de contaminations observés pour ces sites. Par ailleurs, en raison du log Kow relativement élevé des composés thyroïdiens, il est logique de retrouver des activités significatives au niveau du compartiment sédiment par

comparaison au compartiment eau. Les niveaux d'activité pour les effets estrogéniques de sédiments sont du même ordre de grandeur que ceux déjà observés en France (Kinani *et al.* 2010). A ce jour, aucune étude n'a montré d'effet perturbateur thyroïdien de sédiments sur l'activité transcriptionnelle hormono-dépendante.

Concernant le potentiel de l'eau ou du sédiment à perturber, soit l'activité estrogénique de E2, soit l'activité thyroïdienne de T3, aucun effet antagoniste vis-à-vis de ces activités n'a pu être observé. Par contre, des effets surinducteurs vis-à-vis de ces activités ont pu être mis en évidence. En effet, des extraits d'eau de surface se sont avérés capables de potentialiser l'activité transcriptionnelle induite par E2, fait déjà observé sur l'axe Seine (Gaspéri *et al.*, 2010). Par contre, aucune perturbation de l'activité de T3 par les extraits d'eau n'a pu être identifiée. Les sédiments ont également présenté un potentiel surinducteur, à la fois vis-à-vis de l'activité de E2 et de celle de T3. Le potentiel PE surinducteur de Triel s'avère être significativement supérieur par comparaison aux autres sites.

Les effets surinducteurs observés ainsi que les effets perturbateurs thyroïdiens des sédiments sont en accord avec d'autres études en cours réalisées au sein du LSPE.

Ces résultats pourront être complétés lors de prochaines campagnes sur ces trois sites, en réalisant non seulement les essais sur des extraits issus de prélèvements ponctuels d'eau, mais aussi issus d'échantillonnage passif de type POCIS. Les données sur sédiments pourront être également comparées à celles sur MES.

3. Réponses biologiques à la pression chimique

3.1 Biofilms et acquisition de tolérance (Irstea Antony)

L'acquisition de tolérance à l'échelle de la communauté via la sélection d'espèces résistantes constitue une réponse biologique intéressante à une contamination chimique chronique et non létale. En particulier, la méthode PICT (*Pollution Induced Community Tolerance*), qui permet d'établir un lien entre une exposition à un agent toxique et ses effets sur une communauté exposée, est un outil intéressant. Cette méthode, développée par Blanck (1988), est fondée sur une hypothèse assez intuitive, selon laquelle une communauté biologique donnée est constituée de différents composants plus ou moins sensibles à un agent toxique donné. Les composants peuvent être des génotypes, des phénotypes ou des espèces. Une exposition de cette communauté à un agent chimique se traduit par un accroissement de la tolérance globale de la communauté, que l'on peut quantifier par des tests de toxicité à court terme ou tests de toxicité aiguë. Ils consistent à mesurer l'inhibition d'une activité, en général métabolique (par exemple activité photosynthétique ou activité bactérienne) par le toxique étudié sur des durées courtes (quelques heures d'exposition au laboratoire). Les tests de toxicité aiguë permettent d'obtenir une mesure de la tolérance de la communauté généralement exprimée sous forme de l'EC₅₀ obtenue.

Les biofilms sont des communautés aquatiques complexes composées de bactéries, micro-algues, champignons, protozoaires, etc. se développant naturellement sur les supports immergés dans l'eau. Ces communautés jouent un rôle primordial dans le fonctionnement des écosystèmes aquatiques à la fois en tant que producteurs primaires (présence de microorganismes photosynthétiques) et dans les cycles de nutriments (présence de microorganismes hétérotrophes). Leur réponse biologique à une perturbation peut s'évaluer au

niveau structurel (par exemple une variation de la structure génétique de la communauté) comme au niveau fonctionnel. L'acquisition de tolérance à des contaminants chimiques après exposition a été utilisée dans la littérature scientifique notamment pour détecter les impacts liés à la présence de pesticides sur des communautés algales (périphytiques et/ou planctoniques). Ce type de réponse biologique, mesurée directement à l'échelle de la communauté sur des organismes se développant naturellement dans le milieu et donc exposés *in situ* paraît tout à fait pertinente pour évaluer les impacts des contaminations diffuses observées en Seine. En effet, mesurer une réponse biologique à cette échelle biologique permet d'intégrer les différents niveaux de sensibilité des organismes qui la composent (microalgues, bactéries, champignons, etc.) mais aussi les interactions existant entre ces différents organismes.

L'objectif de ce travail était de mettre en évidence *in situ* l'impact d'un gradient urbain sur des biofilms naturels prélevés en Seine. Pour cela, la tolérance à quatre métaux (Cd, Cu, Ni et Pb) a été mesurée sur les biofilms prélevés les 20 (Pb et Ni) et 27 septembre 2011 (Cu et Zn) sur des supports artificiels immergés dans l'eau sur les trois sites le 30/08/11. Les mesures de tolérance sont obtenues selon une approche PICT grâce à un test de toxicité aiguë fondé sur la mesure enzymatique de l'activité hétérotrophe β -glucosidase (Figure 14) ; il s'agit donc de mesures de la tolérance des communautés hétérotrophes des biofilms.

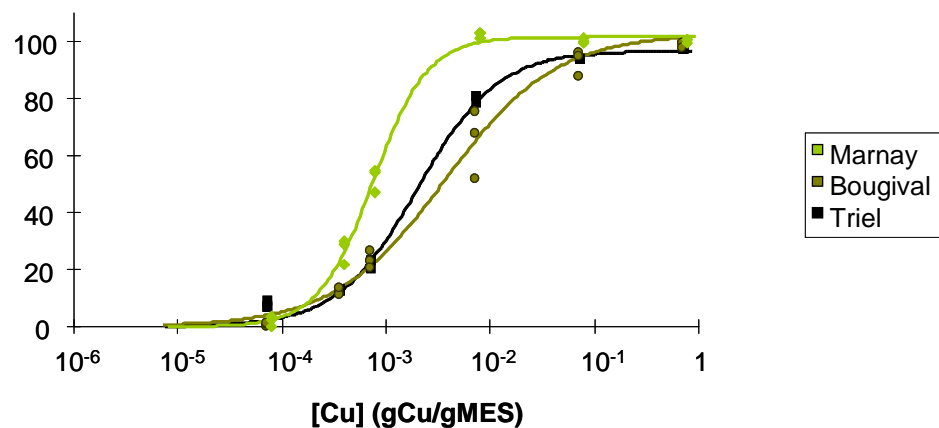


Figure 14 : Courbes dose/effet obtenues avec le test β -glucosidase sur les biofilms de Marnay, Bougival et Triel après exposition au Cu. Le pourcentage d'inhibition de l'activité β -glucosidase est représenté en fonction de la concentration en Cu normalisée (exprimée en $g_{\text{m\u00e9tal}}/g_{\text{MES}}$). Chaque concentration a \u00e9t\u00e9 test\u00e9e en triplicat.

Les r\u00e9sultats obtenus montrent une augmentation de la tol\u00e9rance aux m\u00e9taux des biofilms entre l'amont et l'aval de Paris (Figure 15). Cette augmentation est significative pour le Cu, le Pb et le Zn mais pas forc\u00e9ment pour le Ni (augmentation de l' EC_{50} au Ni le long de la Seine mais chevauchement des intervalles de confiance \u00e0 95%).

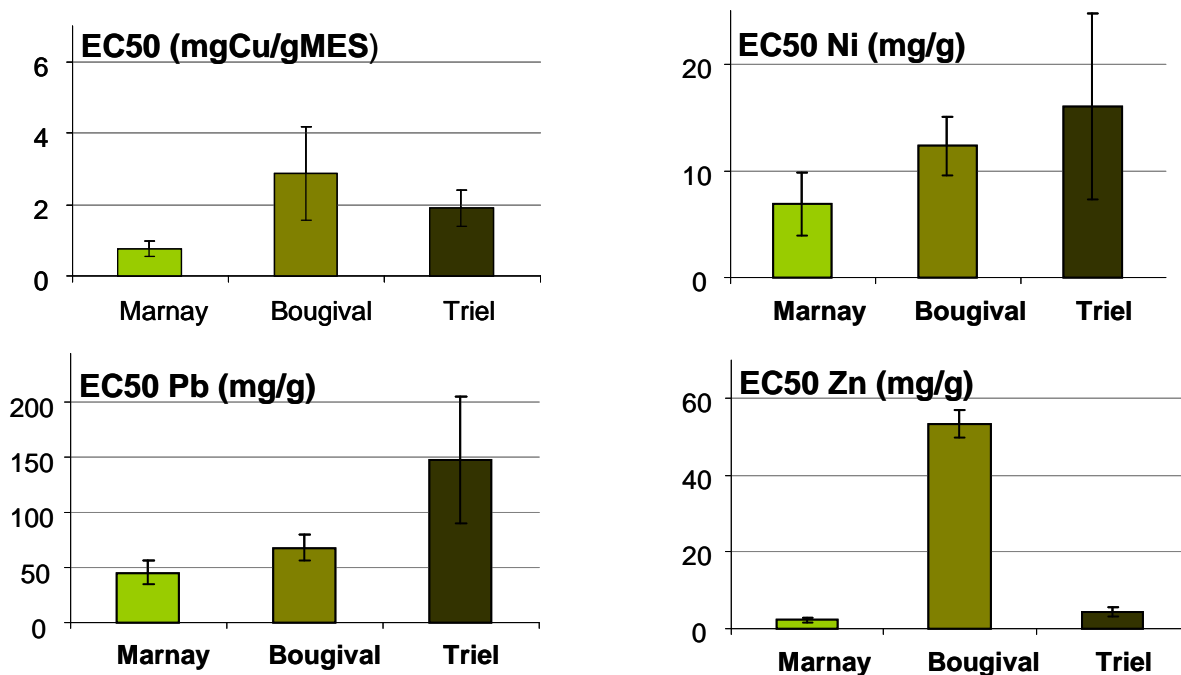


Figure 15 : Histogrammes des niveaux de tolérance (EC_{50} normalisées) au Cu, Ni, Pb et Zn des biofilms de Marnay, Bougival et Triel. Les barres d'erreur représentent les intervalles de confiance à 95% de chaque niveau de tolérance.

Pour les deux sites en aval de Paris, les niveaux de tolérance sont significativement différents pour le Zn (tolérance la plus forte observée à Bougival) et pour le Pb (tolérance la plus forte observée à Triel).

Cette campagne de prélèvement révèle donc un gradient de tolérance aux métaux pour les biofilms naturels prélevés de l'amont à l'aval de Paris en Seine, en lien avec le gradient de contamination métallique mis en évidence simultanément sur les trois sites. Ces résultats confirment une première série de mesures de tolérance sur biofilms réalisées en Seine à l'été 2009 (Fechner *et al.* 2012a; Fechner *et al.* 2012b). Ils suggèrent que la tolérance pourrait être utilisée comme un indicateur écologique de la contamination urbaine. Cette réponse biologique apparaît de plus particulièrement sensible du fait des faibles niveaux de contamination métallique sur les sites en aval de l'agglomération parisienne (par comparaison aux NQE).

3.2 Réponse des communautés microbiennes (ESA-ULB)

L'activité microbienne est responsable des principaux flux de matière régissant les cycles biogéochimiques des éléments biogènes majeurs (C, N, O,...). Depuis des décennies, la majorité des écosystèmes naturels sont touchés par des pollutions chimiques qui bouleversent leur faune et leur flore. On sait aujourd'hui que la contamination des milieux par des polluants « historiques » (par exemple les hydrocarbures) affecte également profondément la structure de la microflore (diversité et abondance relative des différents groupes phylogénétiques) et certains processus-clés dans le cycle du carbone et de l'azote. L'effet de nombreux polluants « émergents » (médicaments, alkylphénols, phtalates, retardateurs de flamme...) sur les communautés microbiennes reste par contre très mal connu. La campagne d'échantillonnage que nous avons réalisée en septembre 2011 avec les autres équipes de l'axe 4 était la première d'une série de campagnes destinées à évaluer l'impact des polluants émergents sur la structure,

la dynamique et l'activité des communautés microbiennes des eaux du bassin de la Seine. Elle a été complétée par une campagne d'échantillonnage de cinq points sur 4 petits rus à priori moins contaminés du bassin de l'Orgeval (Mélarchez amont et aval, la Loge, Moulin des Avenelles, Le Theil). Cette dernière a été réalisée conjointement avec les laboratoires Sisyphe-EPHE (Elodie Moreau-Guigon) et LEESU (Johnny Gasperi) en octobre 2011. Lors de cette campagne, les micropolluants recherchés étaient HAP, PCB, PBDE, Phtalates, Alkylphénols, Parabènes, Bisphénol A et TTBPA. L'objectif de ces mesures de terrain est d'évaluer s'il est possible de mettre en évidence des changements dans l'activité et la structure des communautés bactériennes dus aux micropolluants et l'existence de goupes (mêmes rares) qui soient « bio-indicateurs » de pollution.

Dans cet objectif, des échantillons d'eau et de sédiments des trois sites pilotes de l'axe fluvial ont été prélevés le 27/09/2011, ainsi que des échantillons d'eau de quatre rus du bassin de l'Orgeval le 5/10/2011. Les mesures suivantes ont été effectuées : (1) comptage du nombre de microorganismes dans l'eau et les sédiments par microscopie à épifluorescence après coloration des échantillons au 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI), (2) mesure de la production bactérienne dans la colonne d'eau par incubation des échantillons en présence de thymidine tritiée (Servais & Lavandier 1995) et (3) mesure de l'activité nitrifiante dans la colonne d'eau par incorporation dans les bactéries de $H^{14}CO_3^-$ au noir avec/sans inhibiteur de nitrification (Brion *et al.* 2000).

Nous n'avons pas observé de différence majeure entre les abondances de bactéries des différents sites, ni dans la colonne d'eau ni dans les sédiments (Figure 16). Les abondances de microorganismes dans la colonne d'eau étaient proches de celles mentionnées dans des études antérieures sur le bassin de la Seine (Garnier *et al.* 1992). Comme attendu, les sédiments de rivière contenaient environ 1000 fois plus de microorganismes par unité de volume que la colonne d'eau, et les valeurs étaient de l'ordre de grandeur de celles de la littérature (Fischer *et al.* 2002a; Fischer *et al.* 2002b; Weinbauer *et al.* 1998).

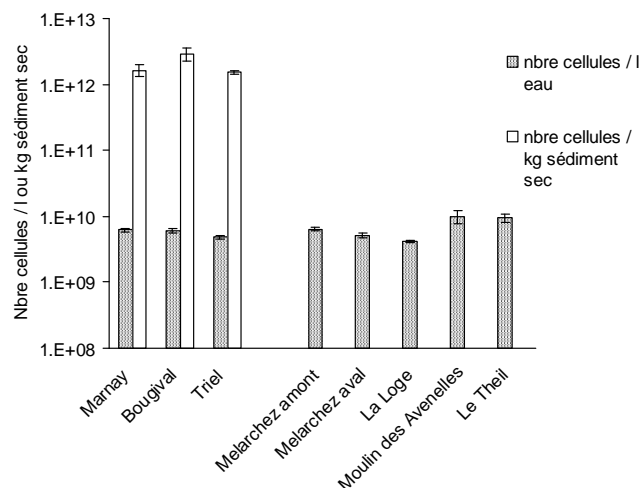


Figure 16 : Nombre de bactéries par litre d'eau et par kg de sédiment sec sur les trois sites. Ces nombres sont comparés au nombre de bactéries dans la colonne d'eau de petites rivières du bassin de l'Orgeval le 05/10/2011 (Mélarchez amont et aval, la Loge, Moulin des Avenelles, Le Theil). Toutes les mesures ont été faites en triplicats.

Les valeurs de production bactérienne estimées par incorporation de thymidine tritiée dans l'axe fluvial de la Seine sont du même ordre de grandeur que celles mesurées antérieurement (Servais & Garnier 1993) ; comme attendu, les valeurs en aval de l'agglomération parisienne sont plus élevées qu'en amont de celle-ci. De manière assez surprenante, les valeurs mesurées dans les petits ruisseaux du bassin de l'Orgeval sont du même ordre de grandeur que celles observées en Seine. L'activité nitrifiante était basse à toutes les stations échantillonnées et comparable aux mesures de Brion et al. (2000) sur la Seine en aval de Paris. Notons cependant que l'activité nitrifiante augmentait 270 fois entre Marnay et Triel. Comme pour la production bactérienne, les activités nitrifiantes sont du même ordre de grandeur dans les petits ruisseaux du bassin de l'Orgeval qu'en Seine à l'aval de Paris.

Tableau III : *Activité hétérotrophe et nitrifiante dans la colonne d'eau des trois sites pilotes de l'axe fluvial (ainsi que dans quatre petits rus du bassin de l'Orgeval).*

| | Production bactérienne | NH ₄ ⁺ | Activité nit |
|----------------------------|------------------------|------------------------------|-------------------------|
| | nmoleThy /l.h | μM | mole N/l.h |
| campagne 26/09/2011 | | | |
| Marnay | 0,203 | 2,7 * | 4,757 10 ⁻¹⁰ |
| Bougival | 0,595 | 16,7 | 3,492 10 ⁻⁸ |
| Triel | 0,405 | 78,1 | 1,291 10 ⁻⁷ |
| campagne 05/10/2011 | | | |
| Melarchez amont | 0,401 | 0,1 * | 9,416 10 ⁻⁸ |
| Melarchez aval | 0,128 | 5,5 | 8,706 10 ⁻⁸ |
| La Loge | 0,632 | 6,4 | 2,012 10 ⁻⁷ |
| Moulin des Avenelles | 0,181 | 9,6 | 1,255 10 ⁻⁷ |
| Le Theil | 0,358 | 2,0 * | 4,523 10 ⁻⁸ |

* en-dessous de la limite de détection.

En conclusion : à partir de résultats aussi préliminaires, il n'a pas été possible d'observer une réponse claire des communautés microbiennes au gradient croissant de pollution entre les trois sites pilotes. La composition des communautés microbiennes de l'eau et des sédiments de ces sites est en cours d'analyse par pyroséquençage (séquençage exhaustif des signatures phylogénétiques des microorganismes). Ce type d'analyse fine devrait permettre d'observer des variations de richesse et d'abondance relative des différents taxons entre les différents sites. Par ailleurs, de nouvelles campagnes sont prévues sur les mêmes sites d'échantillonnage en 2012.

3.3 Réponses biologiques des gammars (Irstea Lyon, URCA)

Le travail de recherche proposé autour du gammare en 2011 dans le cadre du PIREN Seine avait pour principal objectif de mettre en place des transplantations d'organismes contrôlés, provenant d'une population bien connue par le laboratoire d'écotoxicologie d'Irstea Lyon. Le but était de valider la possibilité d'utiliser les outils mis en place par ce laboratoire sur un système aquatique comme la Seine. Sur chacun des trois sites sélectionnés, des gammars ont été exposés entre le 6 et 20 Septembre 2011. Un descriptif du nombre d'organismes exposés sur chacun des sites et des marqueurs étudiés à la suite de l'expérimentation est donné dans le Tableau IV.

Parallèlement, une étude en laboratoire a été menée afin d'évaluer l'impact de facteurs environnementaux (température et conductivité) sur l'activité d'enzymes digestives mesurées

chez le gammare, comme ce qui a précédemment été fait pour le taux d'alimentation (Coulaud *et al.* 2011) et la reproduction. Ces travaux ont pour but d'évaluer la variabilité naturelle des marqueurs biologiques, de définir une référence et ainsi permettre une interprétation fiable de leur niveau en termes d'impact.

La partie 3.3 fait le point sur les données biologiques obtenues au cours de ce travail, regroupant les activités du laboratoire d'écotoxicologie d'Irstea Lyon et le laboratoire d'écotoxicologie de l'université de Reims.

Tableau IV : Description des expositions de gammares mis en place sur les trois sites étudiés de la Seine en septembre 2011. T1 = 7 jours, T2 = 14 jours.

| Nb de réplicats | Organismes exposés/réplicat | Marqueurs |
|-----------------|--|--|
| 10 | 25 mâles <i>G. fossarum</i> | Dosage des perfluorés à T1 et T2 |
| 4 | 20 mâles <i>G. pulex</i> | Dosage métaux à T1 et T2 |
| 2 | 20 mâles <i>G. fossarum</i> | Dosage métaux à T1 |
| 4 | 20 mâles <i>G. fossarum</i> | Dosage : métaux à T2, enzymes digestives à T2 et mesure du taux d'alimentation |
| 3 | 7 couples de <i>G. fossarum</i> avec femelles en stade de mue D2 | Mesure des effets sur la reproduction à T2 |

3.3.a Expérimentations de laboratoire

Suite à l'exposition de 15 jours des organismes mâles aux différentes températures et conductivités sélectionnées, trois activités enzymatiques liées à la digestion ont été mesurées (amylase, cellulase et trypsine). Pour les différentes conditions testées, aucune influence significative de la température et de la conductivité n'a été observée pour chacune des enzymes. La Figure 17 illustre les résultats obtenus pour l'activité amylase. Nous pouvons observer qu'aucune relation avec la température et la conductivité n'existe. Des résultats similaires ont été obtenus pour l'activité cellulase et pour la trypsine (résultats non présentés). A partir de ces données et pour chaque activité enzymatique, une valeur de référence a été définie (moyenne) et des valeurs seuils (haute et basse, correspondant à l'intervalle de confiance à 95%) ont été calculées afin d'intégrer la variabilité naturelle de la mesure de ces activités. Ces valeurs sont présentées dans le Tableau V. Ces valeurs sont toutefois à prendre avec précaution, car elles doivent être très prochainement confirmées et/ou ajustées à l'aide de données obtenues sur le terrain.

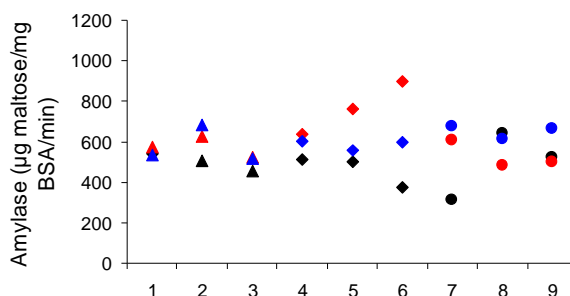


Figure 17 : Représentation des mesures de l'activité amylase (moy, µg maltose/mg BSA/min) obtenue chez les organismes mâles de *G. fossarum* exposés 15 jours aux températures de 7°C (noir), 12°C (rouge) et 16°C (bleu) et à des conductivités de 200 (triangle), 500 (losange) et 800 µS.cm⁻¹ (rond).

Tableau V : Valeurs références (moyenne, $n = 27$) et valeurs seuils (intervalle de confiance à 95%) déterminées pour chaque activité enzymatique chez le mâle de *G. fossarum*.

| Activité | Référence | C.V. | Seuil bas | Seuil haut |
|---|-----------|------|-----------|------------|
| Amylase (μg Maltose/mg BSA/min) | 570 | 15 | 475 | 665 |
| Cellulase (μg Maltose/mg BSA/min) | 50 | 9 | 44 | 54 |
| Trypsine (μg p-Na/mg BSA/min) | 4,1 | 27 | 2,8 | 5,3 |

3.3.b Expérimentations in situ (encagement)

Les taux de survie étaient compris entre 80 et 90% au temps T1 et entre 70 et 80% au temps T2. Aucune différence entre les stations n'a été observée. Ces taux de survie sont légèrement plus faibles qu'aux cours de nos précédentes expérimentations de terrain. Ce faible taux de survie s'explique en partie par les températures élevées observées sur les sites qui incontestablement rendent cette espèce plus sensible.

Biomarqueurs

Concernant l'activité d'enzymes digestives, aucune différence significative n'a été observée pour l'activité cellulase et la trypsine entre les trois sites étudiés, avec des valeurs comprises entre 48 et 54 μg de Maltose/mg BSA/min pour la cellulase et entre 4,4 et 5,6 μg p-Na/mg BSA/min pour la trypsine. Bien que les valeurs seuils précédemment définies doivent être confirmées à l'aide de données de terrain (voir ci-dessus, expérimentation de laboratoire), les résultats obtenus sur les trois sites de la Seine sont parfaitement dans la variabilité naturelle de ces activités avec des valeurs comprises entre les seuils haut et bas.

Les résultats obtenus pour l'activité amylase sont présentés dans la Figure 18. Une différence significative a été observée entre la station amont (Marnay) et les deux stations en aval (Bouguival et Triel). La comparaison de ces valeurs aux seuils définies précédemment et présentés dans le Tableau V, montrent que les activités obtenues pour les sites de Bouguival et Triel sont similaires à ce que l'on peut observer chez des organismes contrôles (non soumis à une contamination). En revanche, pour le site de Marnay, on observe une activité enzymatique anormalement élevée, avec une valeur moyenne de 870 μg de Maltose/mgBSA/min, et significativement supérieure au seuil haut (665 μg de Maltose/mgBSA/min) préalablement défini. Ces résultats montrent clairement que la qualité chimique de ce site perturbe significativement l'activité de cette enzyme digestive. Ces observations sont parfaitement en accord avec celles faites sur le taux d'alimentation (voir ci-dessous).

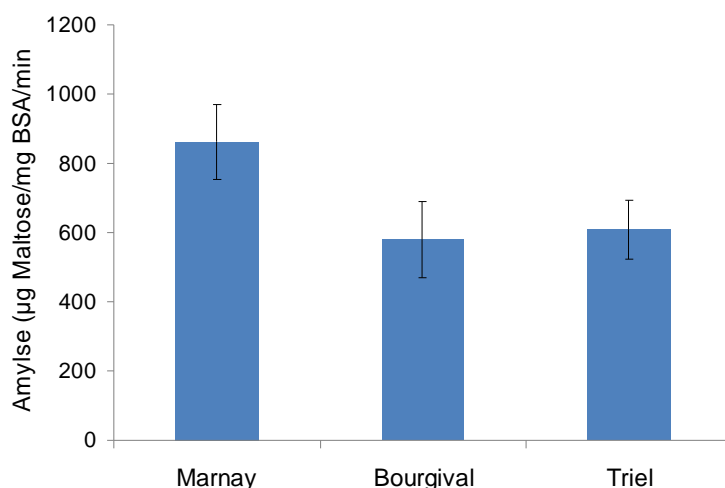


Figure 18 : Activités amylase ($\text{moy} \pm \text{E.T.}$; $n = 3$) obtenues chez les organismes mâles de *G. fossarum* exposés 15 jours aux différents sites étudiés de la Seine.

Traits d'histoire de vie

Les taux d'alimentation observés au cours de cette expérimentation de terrain sont présentés dans la Figure 19. Les résultats montrent une décroissance significative de l'amont (Marnay) vers l'aval (Triel) pouvant laisser penser à un impact de la qualité chimique des sites de Bourgival et Triel. Cependant, si l'on compare les taux d'alimentation observés aux valeurs de références prédites à l'aide du modèle proposé par Coulaud et al. (2011) et développé sur la même espèce, on en déduit pour ces deux stations, qu'aucune inhibition n'a été observée et que l'on a des valeurs similaires à ce qui est attendu chez des organismes contrôles. En effet pour les températures observées sur les sites de Bourgival et Triel, entre 20 et 21°C, les valeurs d'alimentation de référence prédites sont comprises entre 40 et 42 mm²/gam/jour, ce qui correspond aux valeurs obtenues sur ces deux stations. En revanche, pour les températures relevées sur la station de Marnay (18°C en moyenne), la valeur de référence prédite est comprise entre 36 et 38 mm²/gam/jour, soit beaucoup plus faible que les taux observés qui ont atteint des valeurs comprises entre 47 et 50 mm²/gam/jour. Ces résultats montrent d'une part l'importance de disposer de valeurs de référence intégrant la variabilité des conditions environnementales pour interpréter de façon fiable les données obtenues et d'autre part, que c'est sur la station de Marnay que la fonction de l'alimentation chez cette espèce a été perturbée, avec une augmentation de cette dernière. Ces résultats sont en accord avec les observations obtenues pour l'activité amylase sur ce même site et confortent que l'activité d'alimentation sur ce site est anormalement élevée. Il a déjà été montré, notamment pour des expositions à des pesticides, que le taux d'alimentation est tout d'abord induit aux faibles concentrations, puis inhibé pour les concentrations les plus fortes (Xuereb *et al.* 2009). Plus récemment, nous avons fait des observations similaires à l'aide d'un fongicide.

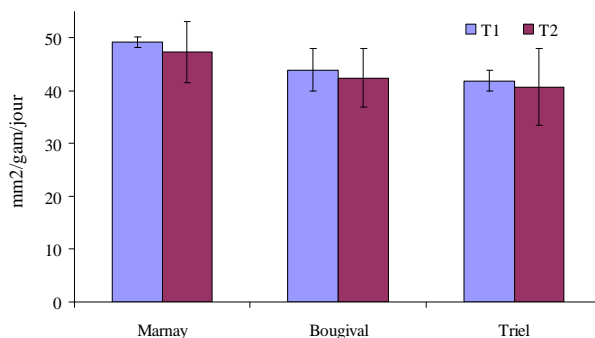


Figure 19 : Taux d'alimentation (moy ± E.T.) exprimés en mm² consommé par gammare et par jour mesuré chez les organismes exposés sur les trois sites étudiés pour une période d'une (T1) et deux semaines (T2).

Les stades de mue observés chez les femelles exposées sur les différents sites sont présentés dans la Figure 20. Pour le site amont (Marnay), la distribution des stades de mue observés est parfaitement en accord avec celle prédite pour la température et la durée d'exposition, avec une majorité de femelles en stades C2 et D1 (80%). En revanche et ceci malgré des températures plus élevées sur les deux autres sites (prédiction de cycle de mue plus avancé), nous avons constaté d'important retards de mue avec une forte augmentation de femelles en stade C1 et en stade B pour la station de Triel. Ces résultats montrent clairement un impact de la qualité chimique des deux stations en aval de Paris, induisant une inhibition du cycle de mue chez les femelles exposées. De la même façon, une inhibition significative de la production d'ovocytes et d'embryons a été observée sur ces deux sites, avec un effet particulièrement marqué pour la production d'embryons sur le site de Triel (Figure 21).

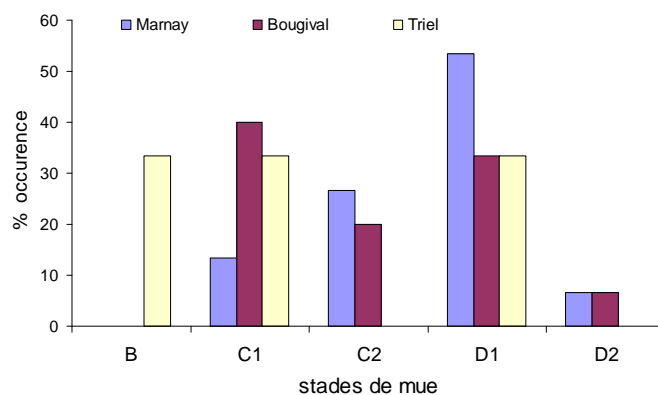


Figure 20 : Distributions des stades de mue (% , n = 15) observées chez les femelles exposées 15 jours sur les trois sites étudiés.

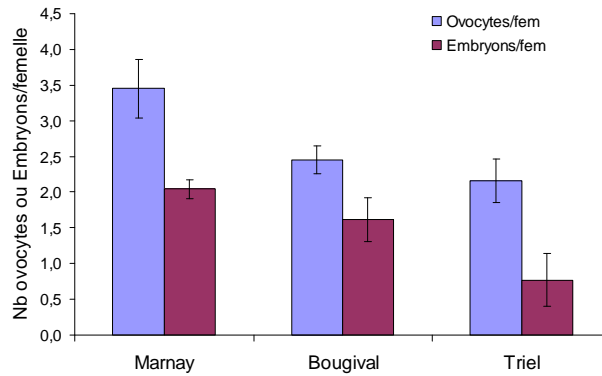


Figure 21 : Nombre d'ovocytes et d'embryons (Moy ± E.T., n = 3, normalisés par la taille de la femelle) produits par les femelles exposées aux trois sites étudiés.

Le dernier marqueur de reproduction étudié est la croissance ovocytaire qui constitue un indicateur de la vitellogénèse chez cette espèce (Jubeaux et al., in press). Pour chaque site et pour chaque stade de mue, la surface moyenne des ovocytes a été déterminée. En effet, la croissance des ovocytes (vitellogénèse) est directement liée au cycle de mue, par conséquent, si l'on souhaite évaluer l'impact des milieux sur cette fonction physiologique, il est indispensable d'interpréter ces résultats en fonction du stade de mue des femelles. Pour le site de Marnay, on constate que la surface moyenne des ovocytes était de 48000, 93000 et 106000 mm²/ovocyte pour les femelles en stade C1 (que 2 femelles), C2 et D2, respectivement. Ces résultats sont parfaitement en accord avec les valeurs obtenues par Geffard et al. (2010) chez des organismes contrôles, montrant aucun impact du site de Marnay sur la vitellogénèse. Pour la station de Bougival et les femelles ayant un stade de mue « normale », c'est à dire en C2 et D1, on peut constater que les surfaces moyennes des ovocytes sont identiques à celles obtenues pour Marnay et aux valeurs observées par Geffard et al. (2010). En revanche, chez les organismes montrant un retard de mue (femelles en stade C1), on observe que la surface moyenne des ovocytes est significativement plus élevée que celle rencontrée pour la station de Marnay et similaire à celle obtenue pour des femelles contrôles en C2. Ces résultats montrent une dé-synchronisation entre le cycle de mue et la vitellogénèse et par conséquent que des composés présents dans le milieu perturbent spécifiquement la mue. Ces observations se confirment sur la station de Triel. En effet, pour les femelles en stade C1, on observe que la variabilité des valeurs observées est plus importante, car sur les 5 femelles étudiées, 3 présentent des ovocytes avec une surface similaire à celle d'organismes contrôles (comprises entre 38000 et 58000 mm²; Geffard et al., 2010), alors que 2 femelles présentent des surfaces similaires à des femelles en stade C2 avec des valeurs de 85000 et 96000 mm². De la même façon, chez les femelles bloquées en stade B pour la mue, la surface moyenne observée pour les ovocytes (35000 mm²) est plus élevée que celle normalement rencontrée chez des organismes contrôles (25000 mm²), même si elles n'atteignent pas les valeurs obtenues pour des femelles contrôles en stade C2.

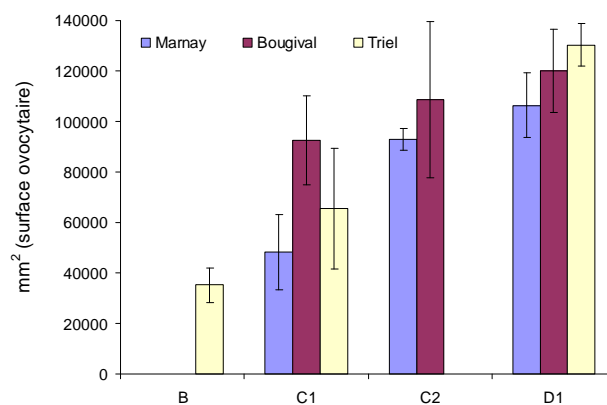


Figure 22 : Surface des ovocytes ($Moy \pm E.T$; $n = \text{minimum } 3$) mesurée chez les femelles exposées aux trois sites étudiés sur la Seine. Pour chaque condition, seules les moyennes obtenues à partir de trois femelles minimum sont représentées.

Cette première expérimentation *in situ* sur la Seine à l'aide du gammare, *G. fossarum*, montre que les outils développés par le laboratoire d'écotoxicologie de Lyon et principalement appliqués sur des petits cours d'eau, sont tout à fait utilisables sur un grand système comme celui-ci. Cette approche permet de caractériser la qualité des milieux à plusieurs échelles en termes de contamination (résultats sur l'accumulation des métaux en cours d'acquisition), au niveau sub-individuel sur des fonction comme la digestion et le système nerveux (acétylcholinestérase) et sur des réponses individuelles, en lien avec la reproduction, qui pourront à terme être interprétées en termes d'impact sur la dynamique des populations à l'aide des modèles actuellement développés dans notre laboratoire (thèse R. Coulaud).

Concernant plus particulièrement les résultats obtenus, ces travaux montrent d'une part l'intérêt de disposer de valeurs de référence et seuils, intégrant la variabilité naturelle des réponses étudiées, afin de permettre une interprétation fiable en termes d'impact des milieux et surtout de se dispenser d'utiliser et de sélectionner *a priori* des stations dites de référence ou contrôle qui par définition devraient présenter des caractéristiques physico-chimiques identiques aux stations définies *a priori* comme étant soumises et/ou impactées par la présence de polluants. D'autre part, les données obtenues montrent la présence de contaminants perturbant l'activité d'alimentation et de digestion des gammares exposés sur le site de Marnay, avec une induction anormale de ces indicateurs. En revanche, sur les sites de Bougival et Triel, les effets observés concernent principalement la fonction de reproduction, comme la production d'ovocytes et d'embryons et très spécifiquement une inhibition spécifique de la mue, mettant en évidence la présence de contaminants pouvant agir directement sur la régulation endocrine de cette fonction.

4. Conclusion

Plusieurs résultats à venir compléteront ce premier jeu de données sur les trois sites en Seine (notamment mesures de la pression chimique en PBDE, OCP, alkylphénols, PFC, médicaments et pesticides et mesure du potentiel toxique de la phase dissoute et particulaire). Ce premier bilan montre une concordance entre les différents paramètres mesurés : la pression chimique, la mesure du potentiel toxique, du potentiel perturbateur endocrinien, et les réponses biologiques mesurées sur les gammarès et les biofilms exposés *in situ*. En effet, toutes ces mesures tendent à distinguer le site amont (Marnay) des deux sites en aval de Paris. La distinction entre les sites de Bougival et Triel est plus délicate que ce soit en termes de niveaux de contamination ou en termes de réponses écotoxiques, au laboratoire comme sur les organismes exposés en Seine.

En 2012, plusieurs campagnes de prélèvement complémentaires ont été prévues pour compléter ces résultats. Réalisées à différentes saisons (printemps, début de l'été et automne). Elles permettront d'évaluer la variabilité saisonnière des différentes réponses écotoxiques mesurées en lien avec la pression chimique.

Références

- Balaguer, P., François, F., Comunale, F., Fenet, H., Boussioux, A.-M., Pons, M., Nicolas, J.-C., and Casellas, C. (1999). Reporter cell lines to study the estrogenic effects of xenoestrogens. *Science of The Total Environment* **233**, 47-56.
- Besse, J., Coquery, M., Lopes, C., Chaumot, A., Budzinski, H., Labadie, P., and Geffard, O. (2012). *Gammarus fossarum* (crustacea) to improve the characterization of contamination levels in continental waters. Toward the determination of threshold values of contamination. *Water Research*, submitted.
- Blanck, H., Wängberg, S.-A., and Molander, S. (1988). Pollution-Induced Community Tolerance - a new ecotoxicological tool. In *Functional Testing of Aquatic Biota for Estimating Hazards of Chemicals* (J. J. Cairns and J. R. Pratt, eds.), pp. 219-30. American Society for Testing and Materials, Philadelphia, PA, USA.
- Brion, N., Billen, G., Guézennec, L., and Ficht, A. (2000). Distribution of nitrifying activity in the Seine River (France) from Paris to the estuary. *Estuaries* **23**, 669-682.
- Cargouët, M., Perdiz, D., Mouatassim-Souali, A., Tamisier-Karolak, S., and Levi, Y. (2004). Assessment of river contamination by estrogenic compounds in Paris area (France). *Science of The Total Environment* **324**, 55-66.
- Coulaud, R., Geffard, O., Xuereb, B., Lacaze, E., Quéau, H., Garric, J., Charles, S., and Chaumot, A. (2011). In situ feeding assay with *Gammarus fossarum* (Crustacea): Modelling the influence of confounding factors to improve water quality biomonitoring. *Water Research* **45**, 6417-6429.
- Fechner, L. C., Gourlay-Francé, C., Bourgeault, A., and Tusseau-Vuillemin, M. H. (2012a). Diffuse urban pollution increases metal tolerance of natural heterotrophic biofilms. *Environmental Pollution* **162**, 311-318.
- Fechner, L. C., Versace, F., Gourlay-Francé, C., and Tusseau-Vuillemin, M. H. (2012b). Adaptation of copper community tolerance levels after biofilm transplantation in an urban river. *Aquatic Toxicology* **106-107**, 32-41.
- Fischer, H., Sachse, A., Steinberg, C. E. W., and Pusch, M. (2002a). Differential retention and utilization of dissolved organic carbon by bacteria in river sediments. *Limnology and Oceanography* **47**, 1702-1711.
- Fischer, H., Wanner, S. C., and Pusch, M. (2002b). Bacterial abundance and production in river sediments as related to the biochemical composition of particulate organic matter (POM). *Biogeochemistry* **61**, 37-55.
- Garnier, J., Servais, P., and Billen, G. (1992). Bacterioplankton in the Seine River (France): Impact of the Parisian urban effluent. *Canadian Journal of Microbiology* **38**, 56-64.
- Gaspéri, J., Moreau-Guigon, E., P., L., Blanchard, M., Teil, M. J., Tlili, K., Quoc Dinh, T., Tran, C., Alliot, F., Desportes, A., Bourges, C., Chevreuil, M., Cladière, M., Lorgeoux, C., Miège, C., Bados, P., Coquery, M., Oziol, L., Bimbot, M., Huteau, V., Karolak, S., and Levi, Y. (2010). Contamination de la Seine par les micropolluants organiques : évolution selon les conditions hydriques et l'urbanisation. PIREN Seine : rapport de synthèse 2007 - 2010.

Geffard, O., Xuereb, B., Chaumot, A., Geffard, A., Biagianti, S., Noël, C., Abbaci, K., Garric, J., Charmantier, G., and Charmantier-Daures, M. (2010). Ovarian cycle and embryonic development in *Gammarus fossarum*: Application for reproductive toxicity assessment. *Environmental Toxicology and Chemistry* **29**, 2249-2259.

Gourlay-Francé, C., Bourgeault, A., Michel, C., Uher, E., Vincent-Hubert, F., Palais, F., Geffard, A., Dedourge-Geffard, O., Pain-Devin, S., Trapp, J., Priadi, C., and Ayrault, S. (2010). Impact des contaminants chimiques sur des dresseines : de la bioaccumulation aux indicateurs d'effet. In PIREN Seine : rapport de synthèse 2007-2010.

Jugan, M. L., Levy-Bimbot, M., Pomerance, M., Tamisier-Karolak, S., Blondeau, J. P., and Levi, Y. (2007). A new bioluminescent cellular assay to measure the transcriptional effects of chemicals that modulate the alpha-1 thyroid hormone receptor. *Toxicology In Vitro* **21**, 1197-1205.

Kinani, S., Bouchonnet, S., Creusot, N., Bourcier, S., Balaguer, P., Porcher, J.-M., and Aït-Aïssa, S. (2010). Bioanalytical characterisation of multiple endocrine- and dioxin-like activities in sediments from reference and impacted small rivers. *Environmental Pollution* **158**, 74-83.

Miège, C., Gabet, V., Coquery, M., Karolak, S., Jugan, M. L., Oziol, L., Levi, Y., and Chevreuil, M. (2009). Evaluation of estrogenic disrupting potency in aquatic environments and urban wastewaters by combining chemical and biological analysis. *TrAC Trends in Analytical Chemistry* **28**, 186-195.

Oziol, L., Miège, C., Bados, P., Bimbot, M., Huteau, V., Schiavone, S., Karolak, S., Coquery, M., and Levi, Y. (2009). Evaluation du potentiel perturbateur endocrinien des eaux de la Seine et en sortie du bassin versant de l'Orge : analyses chimiques et biologiques. PIREN Seine : rapport de synthèse 2007 - 2010.

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

Priadi, C., Bourgeault, A., Ayrault, S., Gourlay-France, C., Tusseau-Vuillemin, M.-H., Bonte, P., and Mouchel, J.-M. (2011). Spatio-temporal variability of solid, total dissolved and labile metal: passive vs. discrete sampling evaluation in river metal monitoring. *Journal of Environmental Monitoring* **13**, 1470-1479.

Servais, P., and Garnier, J. (1993). Contribution of heterotrophic bacterial production to the carbon budget of the river Seine (France). *Microbial Ecology* **25**, 19-33.

Servais, P., and Lavandier, P. (1995). Mesures de production bacterienne par incorporation de thymidine et de leucine marquées: discussion des protocoles experimentaux et exemples d'application. *Océanis* **21**, 161-189.

Weinbauer, M. G., Beckmann, C., and Höfle, M. G. (1998). Utility of green fluorescent nucleic acid dyes and aluminum oxide membrane filters for rapid epifluorescence enumeration of soil and sediment bacteria. *Applied and Environmental Microbiology* **64**, 5000-5003.

Xuereb, B., Lefèvre, E., Garric, J., and Geffard, O. (2009). Acetylcholinesterase activity in *Gammarus fossarum* (Crustacea Amphipoda): Linking AChE inhibition and behavioural alteration. *Aquatic Toxicology* **94**, 114-122.