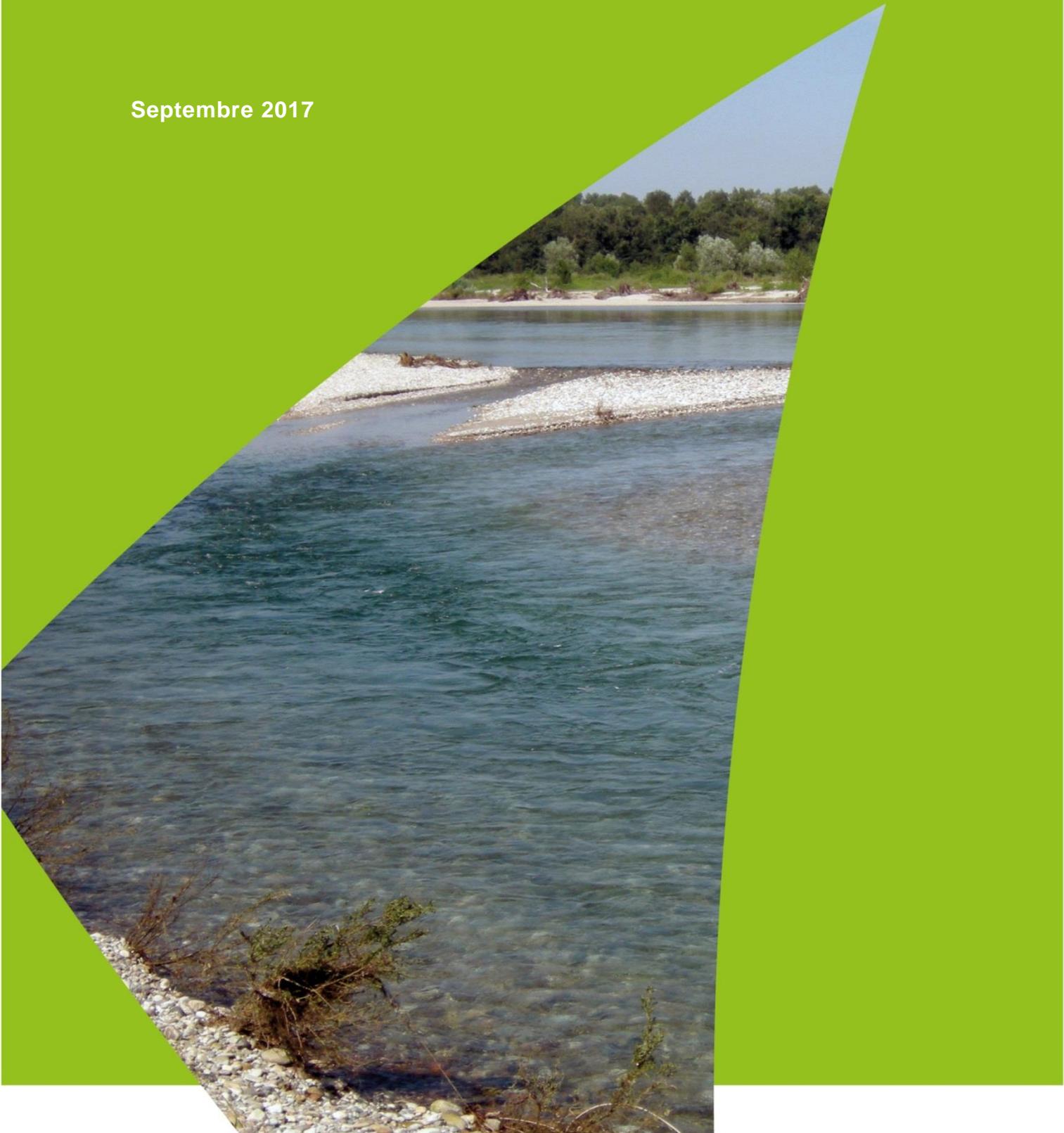


Développement de systèmes in situ et ex-situ d'exposition aux matières en suspension et aux sédiments contaminés aux PCB utilisant la larve de *Chironomus riparius*

Septembre 2017



Mentions légales

Éditeur

Centre Ecotox, Centre suisse d'écotoxicologie appliquée Eawag-EPFL,
8600 Dübendorf

Sur mandat de

LCME Université de Savoie dans le cadre de l'action n°48 du programme 2015 au titre de l'accord-cadre
Agence de l'Eau RMC – ZABR (France).

Auteurs

Benoît J.D. Ferrari	Centre Ecotox, Centre suisse d'écotoxicologie appliquée
Carmen Casado-Martinez	Eawag-EPFL, Lausanne, Suisse
Nathalie Cottin	Université Savoie Mont-Blanc, LCME, Chambéry, France
Emmanuel Naffrechoux	

Remerciements

Philippe Fanget	Université Savoie Mont-Blanc, LCME, Chambéry, France
Sébastien Cachera	CISALB, Chambéry, France
Raphael Mons	Irstea, Villeurbanne, France
Patrice Noury	

Contact

Benoît Ferrari : benoit.ferrari@centrecotox.ch

Citation

Ferrari, B.J.D., Cottin, N., Casado-Martinez, C., Naffrechoux, E., 2017. Développement de systèmes in situ et ex-situ d'exposition aux matières en suspension et aux sédiments contaminés aux PCB utilisant la larve de Chironomus riparius. Etude réalisée sur mandat du LCME Université de Savoie Mont-Blanc. Centre suisse d'écotoxicologie appliquée Eawag-EPFL, Lausanne.

Photo de couverture: Andri Bryner, Eawag

Oekotoxzentrum | Eawag | Überlandstrasse 133 | Postfach 611 | 8600 Dübendorf | Schweiz
T +41 (0)58 765 55 62 | F +41 (0)58 765 58 63 | info@oekotoxzentrum.ch | www.oekotoxzentrum.ch

Centre Ecotox | EPFL-ENAC-IIE-GE | Station 2 | CH-1015 Lausanne | Suisse
T +41 (0)21 693 62 58 | F +41 (0)21 693 80 35 | info@centrecotox.ch | www.centrecotox.ch



Résumé

Dans cette étude, nous avons cherché à suivre la contamination aux PCB dans un système rivière-lac par la mise au point spécifique de bioessais in situ et ex situ. Ces outils ont été développés pour permettre de suivre l'exposition de larves de l'espèce *Chironomus riparius* aux matières en suspension (MES) et aux sédiments contaminés en places. La méthode in situ consistait à exposer les organismes par encagement directement sur le terrain, tandis que la méthode ex-situ permettait d'exposer au laboratoire les organismes aux MES récupérées sur une période intégrative de 4 mois.

Globalement, l'ensemble des résultats obtenus montre la pertinence de l'utilisation des chironomes dans des approches type diagnostic pour le suivi de tendance des pressions de contamination aux PCB dans les sédiments et les MES. Ces méthodes in-situ et ex-situ sont bien complémentaires des analyses chimiques pour caractériser au mieux le degré d'imprégnation du milieu en PCB en tenant compte des variations saisonnières, évaluer leur biodisponibilité et préciser le risque potentiel de transfert le long de la chaîne trophique. Ces outils nécessitent toutefois d'être encore améliorés et validés, notamment en standardisant mieux la variabilité liée aux conditions environnementales fluctuantes pour une meilleure lecture des tests in-situ, ou encore en répondant plus précisément à la question d'ajout ou non de nourriture artificielle au cours des expositions. Ces aspects ont cependant déjà été abordés et les résultats obtenus à ce jour permettent d'aller plus loin dans la réflexion et la mise en place d'expérimentations futures pour permettre une meilleure standardisation des outils.

En ce qui concerne l'encagement sur le terrain, le protocole actuel permet d'ajuster un temps d'exposition au cycle de vie biologique des larves de chironomes pour obtenir un certain poids frais par individu en fonction de la température du site, plutôt que de définir un temps d'exposition fixe quel que soit la campagne de terrain. Bien que les 2 outils soient tout à fait valables pour être utilisés dans le suivi de tendance des pressions de contamination aux PCB dans les sédiments et les MES, le système d'exposition au sédiment de trappe (ExpoSET) permet d'intégrer en plus une plus longue période de récupération des MES (i.e. 4 mois contre 7 jours maximum pour l'encagement). Cette méthode a d'ailleurs permis de souligner l'influence possible de la qualité de la matière organique sur la biodisponibilité des PCB en fonction des saisons. Par ailleurs, le système ExpoSET offre aussi une possibilité de récupérer des organismes autochtones en agissant comme substrat artificiel tout au long de la période d'immersion, organismes qui peuvent également être analysés.

Enfin, quel que soit l'approche méthodologique utilisée (i.e., in-situ ou ex-situ), cette étude montre que le suivi de la dynamique de contamination par l'exposition des chironomes aux MES est mieux adapté pour évaluer l'effet direct de l'assainissement d'un site, alors que le suivi par l'exposition des chironomes aux sédiments est plus pertinent pour rendre compte de l'évolution de la contamination historique dans le temps et pour estimer le niveau de contamination résiduel des proies. Cette approche permet donc de fonctionner à 2 échelles temporelles.



Abréviations

AFNOR	Association Française de Normalisation
ExpoSET	Système d'EXPOsition au SEdiment de Trappe
MES	Matières en suspension
OECD	Organisation de Coopération et de Développement Économiques
PCB	Polychlorobiphényles
PFOS	Acide perfluorooctanesulfonique
TMF	Facteurs d'amplification trophique



Table des matières

Résumé	i
Abréviations	ii
1 Contexte et objectifs.....	1
2 Choix du chironome comme espèce indicatrice de la contamination aux PCB.....	1
3 Exposition des chironomes engagés dans le Tillet et le lac du Bourget	2
3.1 Méthode.....	2
3.2 Résultats et discussion.....	4
4 Exposition au laboratoire des chironomes aux MES récupérées le lac du Bourget	6
4.1 Méthode.....	7
4.2 Résultats et discussion.....	9
5 Considérations pratiques et conclusions	14
6 Références bibliographiques.....	15
7 Listes des figures et tableaux.....	17
7.1 Liste des figures	17
7.2 Liste des tableaux.....	17
ANNEXE 1 Prétraitement et analyse des échantillons.....	18



1 Contexte et objectifs

Le diagnostic de la qualité des milieux aquatiques et l'évaluation de l'impact de l'émission de contaminants sur l'état écologique de ces milieux, mais également le suivi des effets de la restauration des écosystèmes imposent de caractériser les milieux sur la base de mesures chimiques et de critères biologiques. En complément aux approches chimiques (i.e. identification des sources et devenir de contaminants) et biocénétiques utilisées dans un cadre réglementaire, l'écotoxicologie propose de nombreux outils sous la forme de biotests, le plus souvent à l'échelle sub-individuel et individuel, permettant dans une approche intégrée de renforcer le diagnostic de la qualité chimique des milieux aquatiques (Schmitt-Janssen et al., 2008). Les biotests permettent d'évaluer le potentiel de bioaccumulation des contaminants présents dans les milieux ainsi que le potentiel toxique de compartiments environnementaux (i.e. eaux et sédiments). Cette évaluation peut se faire soit dans des conditions contrôlées ex situ au laboratoire (i.e. identiques pour tous les échantillons prélevés), soit lors d'expérimentations in-situ à l'aide de systèmes permettant d'exposer les organismes directement sur le terrain dans des conditions semi-contrôlées (i.e. exposition en fonction des conditions environnementales ambiantes fluctuantes). L'utilisation de ces différentes approches doit permettre au final de garantir que les effets observés résultent uniquement de la présence de contaminants biodisponibles. Ces approches doivent aussi permettre de suivre l'évolution des contaminations dans l'espace et dans le temps tout en permettant une comparaison simple et répétable des résultats.

Dans le cadre du programme de recherche RESTOLAC (action n°48 du programme 2015 au titre de l'accord-cadre Agence de l'Eau RMC – ZABR, France), nous avons cherché à mieux préciser la relation entre la pollution du milieu par les PCB et la contamination des organismes aquatiques. Par ailleurs, nous avons cherché à suivre les effets de la restauration du Tillet sur la contamination aux PCB dans le lac du Bourget par la mise au point spécifique d'approches utilisant des outils in situ et ex situ. Ces approches ont été développées pour permettre de suivre l'exposition d'organismes benthiques représentatifs du bol alimentaire des poissons du lac aux matières en suspension et aux sédiments contaminés en places. L'organisme utilisé dans cette étude était la larve de l'espèce *Chironomus riparius*.

2 Choix du chironome comme espèce indicatrice de la contamination aux PCB

De par leurs propriétés physico-chimiques, les PCB sont connus pour se concentrer dans les matières en suspension et les sédiments et peuvent donc affecter les communautés d'invertébrés benthiques. Ces derniers fournissent des fonctions écologiques essentielles telles que la décomposition et le recyclage des nutriments et par ailleurs constituent une source importante de nourriture pour des niveaux trophiques supérieurs tels que les poissons (Covichet al., 1999).

Parmi les différents organismes représentatifs de la diversité des communautés naturelles d'invertébrés benthiques dans les lacs, les espèces de la famille des Chironomidae (insecte, diptère) constituent des modèles de choix pour l'étude de la qualité des sédiments et des liens avec les niveaux trophiques supérieurs (Armitage et al., 1995). En effet, organismes ubiquistes et généralement en abondance élevée, leur cycle de vie holométabole se caractérise par trois phases aquatiques de développement (l'œuf, la larve, la puppe) suivi d'une émergence bimodale vers le compartiment aérien où les adultes se reproduisent. C'est au cours de leur stade larvaire, représentant la majeure partie de leur cycle de vie, que les chironomes seront directement en contact avec le sédiment et les matières fraîches en suspension qui sédimentent. Se nourrissant de la matière organique présente dans ce système particulière, et pouvant représenter une forte proportion du bol alimentaire pour certaines espèces de poissons lacustres, ils peuvent donc constituer un vecteur de contamination important en PCB pour les poissons (Babut et al., 2017).



Certaines espèces comme *Chironomus riparius* ou *Chironomus dilutus* sont déjà largement utilisés dans des approches écotoxicologiques (Diepens et al., 2014). Les méthodes d'élevage sont bien connues. Les traits de vie caractérisant leur cycle sont facilement mesurables et peuvent être modélisés (Péry et al., 2002 ; Ferrari et al., 2017). Ces espèces font parties des organismes recommandées pour être utilisés au laboratoire dans des biotests standardisés pour évaluer les impacts potentiels des contaminants associés aux sédiments sur les écosystèmes aquatiques à la fois dans des approches d'évaluation rétrospective (e.g. AFNOR, 2010) et prospective des risques (e.g. OECD, 2010). Par ailleurs, bien que les approches ne soient pas standardisées, ces espèces sont également utilisées pour évaluer la biodisponibilité et la bioaccumulation des métaux (Dabrin et al., 2012) et des substances organiques comme par exemple les composés perfluorés (Bertin et al., 2014) et les PCB (Sidney et al., 2016). L'intérêt porté pour ce modèle au laboratoire a également suscité son utilisation dans des approches d'engagement in situ pour évaluer la qualité des sédiments. Des tests ont été développées pour mesurer différents traits biologiques comme par exemple la survie (Crane et al., 2000), l'activité comportementale (de Bisthoven et al., 2004), les déformation du mentum (Meregalli et al., 2000), la croissance (Sibley et al., 1999 ; Ferrari et al., 2014), l'alimentation (Soares et al., 2005) et l'émergence (Leppänen et al., 2006 ; Ferrari et al., 2017), mais également pour mesurer la bioaccumulation des métaux (Bervoets et al., 2004 ; Ferrari et al., 2014) et des contaminants organiques (e.g. PFOS, Babut et al., 2016 ; PCB, Casado-Martinez et al., 2016). Par ailleurs, des larves de *C. riparius* engagées in situ ont été également utilisées avec succès pour prédire la concentration de substances prioritaires de la directive 2013/39/UE dans les poissons à l'aide de facteurs d'amplification trophique (TMF) (Babut et al., 2016).

3 Exposition des chironomes engagés dans le Tillet et le lac du Bourget

3.1 Méthode

L'intégration d'outils écotoxicologiques *in situ* pour suivre l'impact du compartiment particulaire dans l'évaluation de la qualité des écosystèmes lentiques reste encore peu explorée (Ferrari et al., 2014). Dans cette partie, l'objectif était de tester une approche permettant de mesurer la bioaccumulation des PCB dans les chironomes exposés soit uniquement à la matière en suspension (MES) qui transitait dans l'écosystème, soit à l'ensemble « MES plus sédiment ». Les deux types d'exposition devaient renseigner sur le fonctionnement du système et permettre le suivi dans le temps des concentrations bioaccumulables de PCB au lac. Au cours de l'année 2012, avant la restauration du Tillet, la méthodologie a été répétée totalement (exposition aux MES et aux sédiments) ou partiellement (exposition aux MES) sur plusieurs sites dans le lac (Figure 1, sites Delta sous influence du Tillet et Rowing hors influence du Tillet) et le Tillet lui-même dans sa partie aval (Figure 1, site Dreal) en fonction des saisons afin de prendre en compte l'influence de la température. Par la suite, après la restauration du Tillet qui s'est déroulé d'avril 2013 à mai 2014, un suivi a été réalisé sur les MES uniquement dans le nouveau Tillet.

Le protocole utilisé était inspiré de celui décrit par Ferrari et al. (2014) et repris en partie dans Babut et al. (2016). Brièvement, des larves de chironomes provenant d'un élevage sont élevées jusqu'au début du stade IV. Vingt-quatre heures avant l'obtention de la bonne taille des chironomes et avant le début de leur exposition sur le terrain, 8 chambres d'exposition (cages) sécurisées dans une caisse ajourée sont déployées sur le site investigué afin qu'elles puissent s'équilibrer préalablement avec le milieu. Chacune des cages correspondent à des récipients en PP de contenance 1000 ml avec 2 ouvertures, sur le côté et sur le couvercle, fermées par un tamis de maille 0.3 mm. Pour l'exposition uniquement à la matière en suspension, 4 cages sont remplies avec du sable de Fontainebleau (diamètre 150-200 μm) sur ≈ 1 cm d'épaisseur. De cette manière, chacune des cages joue le rôle d'une petite trappe à MES qui transite dans cha-



cune des cages et vient sédimenter à la surface du sable. Cette MES est alors disponible comme nourriture pour les chironomes. Pour l'exposition au sédiment et à la MES, les 4 autres cages sont remplies sur ≈ 1 cm d'épaisseur avec le sédiment du site préalablement échantillonné à l'aide d'une benne de type Van Veen et tamisé à 2 mm. De cette manière, l'encagement des chironomes au contact du sable non-contaminé permettra de déterminer la part de la bioaccumulation dû à l'adsorption/absorption de PCB dans la colonne d'eau (matières en suspension et dissous) par rapport à celle du sédiment (cage contenant le sédiment).



Figure 1 : Stations investiguées avant la restauration du Tillet pour évaluer la bioaccumulation des PCB dans les larves de *Chironomus riparius* exposés aux MES et aux sédiments

Le jour du début de l'exposition, environ 800 chironomes sont répartis dans 8 piluliers et transportés sur le site en glacière réfrigérée. A ce stade, 4 piluliers sont utilisés pour implanter les chironomes dans les 4 cages contenant le sable, et les 4 autres dans les cages contenant le sédiment. Après ajout de nourriture *ad libitum* (1 mg.jr^{-1} par larve de Tetramin[®] broyée), les caisses sont disposées au fond de la rivière du Tillet ou bien à mi-hauteur dans la colonne d'eau du lac (Figure 2). La température de l'eau est relevée, afin d'estimer la durée de l'encagement (≤ 1 semaine). Une visite à J+2 est opérée pour nourrir les chironomes en fonction du temps d'exposition restant (Ferrari *et al.*, 2014). Le temps d'exposition varie entre 5 et 7 jours en fonction de la température du site. Ces temps d'exposition ont été choisis en fonction de l'influence de la température sur le cycle de vie (Péry et Garric, 2006) afin que les chironomes exposés soient toujours dans une phase de croissance avant la pupation et que la masse finale par individu soit du même ordre de grandeur. Idéalement, au jour de déploiement des caisses, si la température du site est supérieure à 17°C , le temps d'exposition est ajusté au maximum à 5 jours. Pour une température inférieure à 17°C , le temps d'exposition est alors ajusté à 7 jours. Au terme de la période d'exposition, les caisses sont retirées, et les dispositifs ramenés au laboratoire, où les chironomes sont récupérés par tamisage à 0.5 mm, comptés, rassemblés par condition (exposition MES ou exposition sédiment), pesés et congelés, avant de suivre la procédure d'extraction et d'analyse des PCB (Annexe 1). Parallèlement un lot d'environ 400 chironomes témoin (T0) est préparé selon le même protocole que les chironomes encagés au début de chaque exposition.



A) Cages contenant du sable et les larves de chironomes



B) Immersion sur le site DELTA

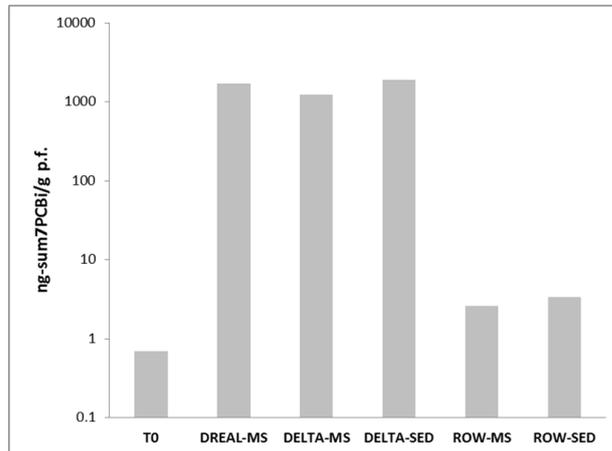


Figure 2 : Exemple de cage (A) et disposition des systèmes dans le lac du Bourget (B)

3.2 Résultats et discussion

Deux campagnes d'encagement ont eu lieu en juillet et en novembre 2012. Ces campagnes devaient permettre d'une part de faire le point sur le degré d'imprégnation du lac et du Tillet en PCB avant la restauration du lit du Tillet à l'aide d'encagement de larves de *C. riparius* et la transformation de l'embouchure du Tillet en port à barque à différentes saisons, et d'autre part de comparer les modes d'exposition aux MES et aux sédiments.

A) Période estivale (21°C / exposition 7 jours)



B) Période hivernale (14°C / exposition 5 jours)

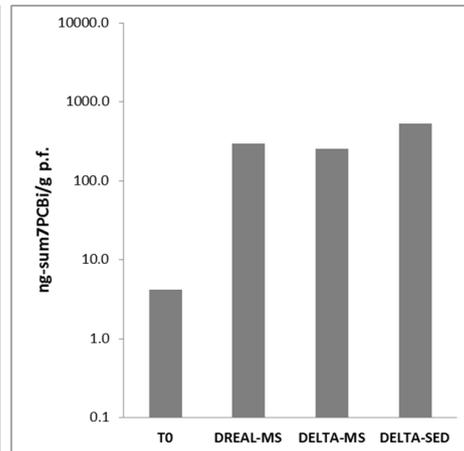


Figure 3 : Exposition des systèmes d'encagement dans le Tillet et dans le lac du Bourget pendant la période estivale (A) et la période hivernale (B). Les différents sites sont identifiables dans la figure 1. Les T0 correspondent aux concentrations de la somme des 7 PCBi dans les larves de chironomes avant exposition

La figure 3 compare les résultats obtenus pour les 2 modes d'exposition lors des encagements réalisés en juillet (Figure 3A) et en novembre (Figure 3B) lorsque les températures correspondaient respectivement en moyenne à $21 \pm 1^\circ\text{C}$ et $14 \pm 1^\circ\text{C}$ sur l'ensemble des sites investigués. La comparaison des concentrations de la somme des 7 PCBi dans les larves de chironomes avant exposition (T0) et après exposition montrent que les chironomes se sont enrichis en PCB



lors des expositions. De plus, la moyenne du poids frais (p.f.) par larve de chironome obtenue en fin d'exposition pour l'ensemble des conditions testées était de 5.1 ± 0.8 mg, soit correspondant à un coefficient de variation d'environ 15%. La prise en compte de la biologie de *C. riparius* pour élaborer un protocole d'ajustement du temps d'exposition en fonction de la température du site (5 jours si $T > 17^\circ\text{C}$ et 7 jours si $T < 17^\circ\text{C}$) a donc permis d'obtenir des masses fraîches individuelles homogènes et comparable entre les différentes saisons et les différents sites. Ce protocole est donc robuste et permet de faciliter les comparaisons entre les sites et les saisons d'un point de vue de la concentration en PCB dans les larves.

Le site DELTA sous influence du Tillet montre des concentrations de la somme des 7 PCB_i dans les chironomes très supérieures (450 à 550 fois) à celles observés sur le site ROW hors influence du Tillet. Les concentrations obtenues sur le site ROW montre par ailleurs une très faible contamination puisqu'elles sont équivalentes à celle du T0. Cette comparaison permet de mettre en évidence l'intérêt de la méthode d'encagement pour le traçage de la contamination en PCB biodisponibles pour les chironomes, et cela quel que soit le mode d'exposition (MES seules vs. Sédiments). Les résultats montrent également l'intérêt du système d'exposition aux MES seules. Il apparaît d'un point de vue dynamique que les chironomes s'enrichissent de manière importante en PCB liés aux MES fraîches transportées dans la rivière et qui viennent sédimenter dans les cages. En effet, les concentrations de la somme des 7 PCB_i dans les chironomes exposés aux MES seules, bien qu'inférieures, sont du même ordre de grandeur que celles dans les chironomes exposés également aux sédiments, quel que soit le site (par ex., 1238 ng-7PCBi/g p.f. pour DELTA-MS vs. 1910 ng-7PCBi/g p.f. pour DELTA-SED). Ces résultats sont à relier au mode d'alimentation de *C. riparius* qui se nourrit principalement des matières en suspension fraîchement déposées sur une couche pouvant atteindre 2 mm d'épaisseur (Ferrari et al., 2017 et références citées). Au contraire, l'exposition aux sédiments en même temps que les MES rends compte de la contamination historique du site considéré. Dans ce cas, puisque les concentrations sont à chaque fois supérieures à celles des chironomes exposés uniquement aux MES, les larves se contaminent à la fois par les MES qui se déposent et aux sédiments du site déjà contaminés.

Par ailleurs, compte tenu des niveaux équivalents de concentrations observés sur le site DREAL et le site DELTA, les MES qui transitent dans le Tillet (site DREAL-MS) se retrouvent au niveau de l'embouchure du Tillet dans le lac (DELTA-MS) ainsi que dans les sédiments (DELTA-SED). Ce patron d'exposition peut s'observer pour les 2 saisons testées mais dans des niveaux de concentrations plus faibles lorsque les températures des sites chutes d'environ 7°C . Ces résultats témoignent de l'importance de la température d'exposition sur la physiologie des organismes et donc sur les processus de bioaccumulation des PCB dans les organismes (Lan drum et al., 2001). L'influence de la température sur la bioaccumulation est difficile à prendre en compte dans de telles approches utilisant l'encagement d'organismes. Même si le temps d'exposition biologique est privilégié pour permettre de meilleures comparaisons entre les différents sites, dans le cas des PCB et du système Tillet-Lac de Bourget, il est recommandé de pouvoir faire des suivis saisonniers à différentes températures afin de pouvoir améliorer le diagnostic sur l'évolution des tendances de la contamination.

La figure 4 résume l'évolution des concentrations de la somme des 7 PCB_i dans les larves de chironomes encagées dans les systèmes d'exposition aux MES seules sur le site DREAL au cours du temps. Deux périodes peuvent être distinguées et concernent les expositions avant et après la période de restauration du Tillet qui s'étendait d'avril 2013 à mai 2014. Le suivi des concentrations en PCB dans les chironomes encagés après la restauration du Tillet n'a été réalisé qu'en novembre 2014 afin que les analyses ne soient pas influencées par les travaux et la période de stabilisation du nouvel écosystème qui en suivait. Le choix de suivre la contamination des MES au point DREAL en aval du Tillet devait permettre de renseigner sur ce qui pouvait sortir du système restauré et éventuellement rejoindre le lac, bien que le nouveau port à barques fasse office de véritable bassin de décantation en amont du lac.

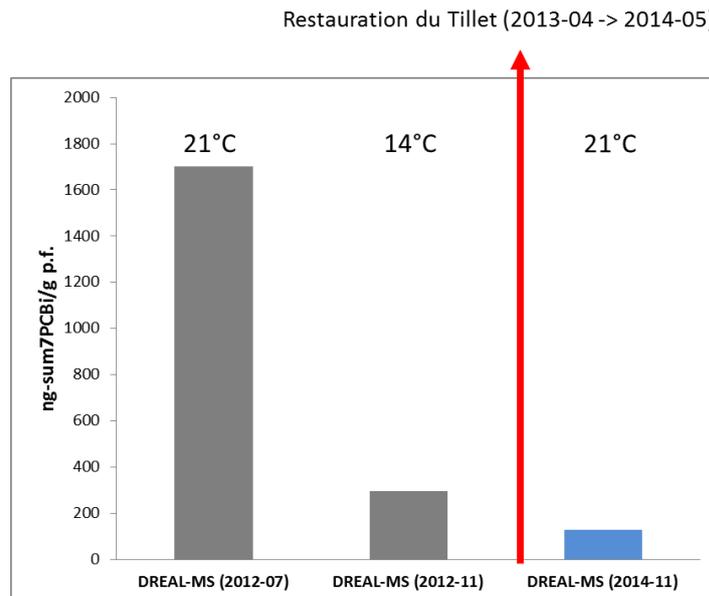


Figure 4 : Evolution des concentrations de la somme des 7 PCBi dans les larves de chironomes engagées dans les systèmes d'exposition aux MES seules sur le site DREAL avant et après restauration du Tillet

Pour la période post-restauration, les concentrations de la somme des 7 PCBi dans les chironomes étaient plus faibles que celles dans les chironomes exposés aux MES au cours de la période avant la restauration pour la même saison. Ces résultats suggèrent que les flux de PCB biodisponibles ont diminué. Ce constat est d'autant plus convainquant du fait 1) que la température du Tillet au cours de l'exposition post-restauration était plus élevée (et donc physiologiquement plus apte à bioaccumuler) que celle de novembre 2012 pour des régimes hydrauliques équivalents et 2) qu'à température équivalente entre juillet 2012 et novembre 2014, la diminution des concentrations est sans équivoque. Toutefois, le niveau de contamination résiduelle des chironomes engagés reste élevé par rapport au niveau de contamination basale observé sur le site ROW hors influence du Tillet (2.6 ng-7PCBi/g p.f. pour ROW-MS en 2012 vs. 127 ng-7PCBi/g p.f. pour DREAL-MS en 2014).

4 Exposition au laboratoire des chironomes aux MES récupérées dans le lac du Bourget

Bien que représentant qu'une partie des voies d'exposition de *C. riparius* aux PCB comme cela a été démontré au cours des expérimentations *in situ*, les MES demeurent néanmoins un bon moyen de tracer l'évolution des niveaux de contamination au cours du temps et donc la dynamique d'exposition du biote aux PCB dans le lac. Tout comme un échantillonnage ponctuel d'une matrice environnementale, l'engagement de larves de chironome se fait sur une période d'exposition relativement courte (<7 jours) en lien avec leur cycle de vie et donc ne permet pas d'intégrer une période plus longue de la dynamique de contamination du lac, à moins de réitérer l'exposition avec une fréquence plus élevée. Dans ce contexte, une nouvelle approche écotoxicologique a été imaginée. Des trappes à MES ont été développés spécifiquement dans le cadre du projet RESTOLAC pour permettre d'intégrer des périodes plus longues de suivi des MES et de pouvoir par ailleurs exposer les chironomes à celles-ci dans des conditions stables de laboratoire. Ce système, nommé par la suite ExpoSET (système d'EXPOSITION au SEDiment de Trappe), permet également la colonisation par les organismes autochtones au cours de la période d'immersion, et donc de pouvoir récupérer ceux-ci pour être analysés. Ce système a été testé sur 2 périodes d'environ 4 mois au cours de l'année 2016.



4.1 Méthode

Le système ExpoSET (voir figure 5) est constitué d'une plaque en Inox (500x650 mm) possédant 4 pieds sur laquelle peut être visée une tige (longueur 600 mm) également en Inox surmontée d'un anneau. Les pieds servent à empêcher la plaque de se déplacer sous l'influence des courants ou de la pente du fond du lac, tandis que la tige doit servir à la fixation d'un treuil pour faciliter son déploiement et sa récupération sur le terrain à partir d'un bateau. Cette plaque en Inox doit recevoir 12 cylindres gradués standards de 2 L en PP ayant une ouverture d'environ 90 mm de diamètre. Ces cylindres sont fixés à l'aide d'une contre-plaque en PP percée de 12 trous alignés par rapport à la disposition des cylindres. Cette contre-plaque permet, une fois installée et vissée sur la plaque en Inox, de coincer le pied de chacun des cylindres entre celle-ci et la plaque en Inox.

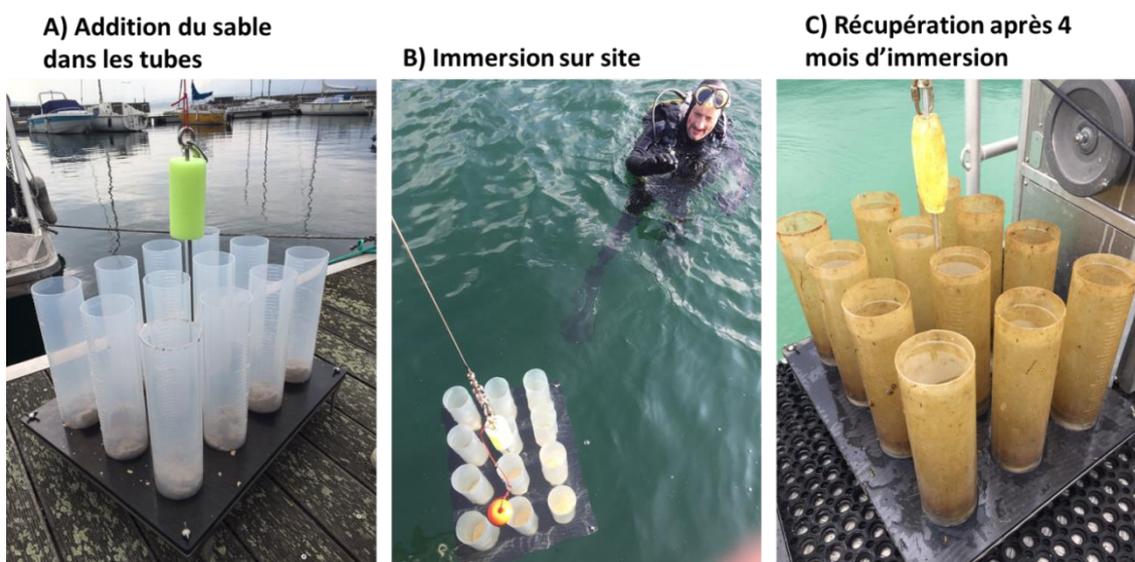


Figure 5 : Design, installation et récupération du système ExpoSET

Ce système a été testé sur le site DELTA anciennement sous l'influence direct du Tillet en 2016 sur une période de 4 mois du 1^{er} mars au 30 juin, puis sur une deuxième période consécutive d'un peu plus de 3 mois du 30 juin au 10 octobre. Ces 2 périodes ont été choisies pour intégrer les apports des MES au cours du printemps, puis de l'été jusqu'au début de l'automne. Parallèlement, un autre système ExpoSET a été également déployé sur un site de référence (SUD) hors influence majeure de source de PCB au sud du lac proche des roselières.

D'un point de vue méthodologique, le jour du déploiement sur les sites, 12 cylindres gradués ont été installés et fixés à l'aide de la contre-plaque en PP sur chacun des systèmes ExpoSET. Puis, du sable de Fontainebleau (diamètre 150-200 μm) a été ajouté dans chacun des cylindres sur une épaisseur d'environ 1 cm (Figure 5A). Ce sable joue le rôle d'un substrat non contaminé favorable à la croissance des larves de *C. riparius* au laboratoire sur lequel les MES viennent se déposer au cours de la période immergée sur le terrain. Les cylindres ont été ensuite préalablement remplis avec l'eau du site afin de stabiliser le sable pour la manœuvre d'immersion. Enfin, le système a été immergé à l'aide d'un treuil (Figure 5B) et placé avec l'aide d'un plongeur sur le fond du lac de manière à ce que les cylindres soient orientés le plus verticalement possible pour maximiser la récupération des MES au cours du temps.

Lors du jour de la récupération sur les sites DELTA et SUD, chacun des systèmes ExpoSET a été retrouvé et ramené sur le bateau (Figure 5C). Les cylindres ont alors été bouchés à l'aide de bouchon de diamètre adapté pour ne pas perdre d'eau lors du transport vers le laboratoire. Par ailleurs, lors de la récupération des systèmes au fond du lac, 4 carottes de sédiment correspondant à des tubes en PVC transparent de même diamètre que les cylindres utilisés pour le système ExpoSET ont été réalisées à la main par le plongeur sur chacun des sites. Ces ca-



rottes étaient réalisées de façon à avoir au moins un quart du volume total occupé par l'eau du site au-dessus du sédiment. De plus, l'eau du site a également été échantillonnée dans 2 récipients en Inox de 20 L.

De retour au laboratoire, pour chacun des sites, 4 cylindres ont été sacrifiés pour analyser les PCB dans les MES. Les 8 autres cylindres, ainsi que les 4 carottes contenant chacune le sédiment et l'eau surnageante du site ont été placés dans une chambre climatique. Par ailleurs, pour chacun des sites, 4 cylindres contenant environ 1 cm d'épaisseur de sable de fontainebleau (même que celui utilisé pour le système ExpoSET) enrichi en Tetramin® (Ferrari et al. 2014) et 1.6 L d'eau du site préalablement filtrée à 100 µm ont été également installés dans la chambre climatique, ainsi que 4 derniers cylindres contenant 1 cm d'épaisseur de sable de fontainebleau également enrichi en Tetramin® et 1.6 L d'eau utilisée dans les élevages de *C. riparius* au laboratoire. Un échantillon d'eau de chacun des sites ainsi qu'un échantillon d'eau d'élevage ont également été gardés pour déterminer les concentrations en PCB. L'ensemble des systèmes d'exposition aux différentes conditions était soumis à une aération par bullage en continu, exposé sous environ 300 à 500 lux de lumière uniquement pendant 16 heures par jour et laissé stabiliser à une température comprise entre 14 et 16°C pendant une semaine avant l'addition des larves de chironomes. La figure 6 montre l'installation. Globalement, pour chacun des sites (DELTA et SUD), les différentes conditions réalisées devaient permettre d'exposer les larves de *C. riparius* 1) à l'eau du site et aux MES intégrées sur la période immergée du système ExpoSET, 2) au sédiment du site et son eau surnageante, 3) uniquement à l'eau du site, et 4) à un témoin constituer de l'eau d'élevage. De cette manière, les différentes voies d'exposition des larves de chironomes aux PCB pouvaient être différenciées dans l'interprétation des résultats.

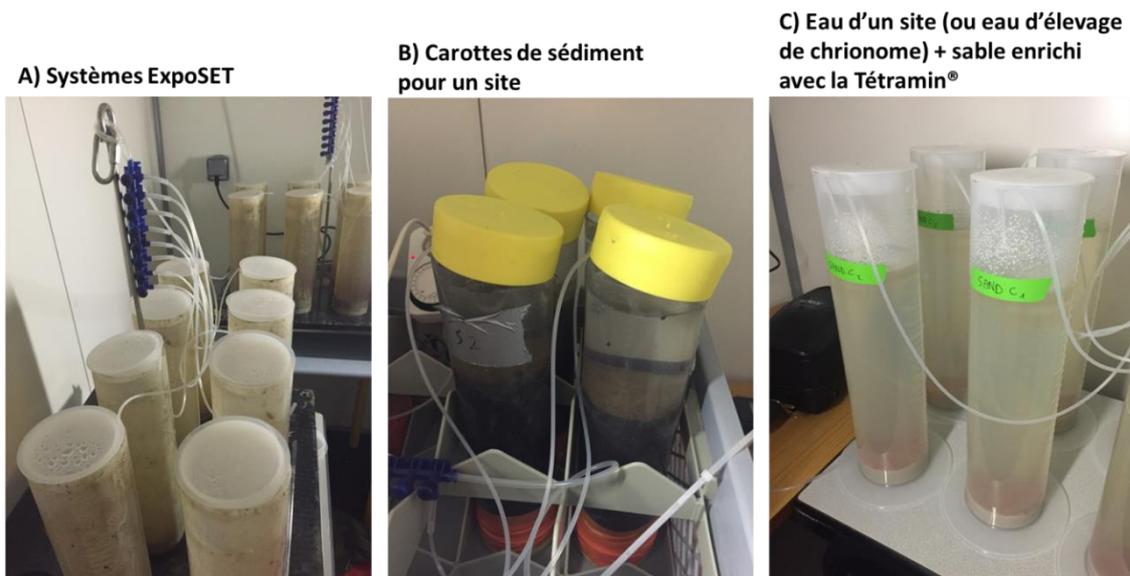


Figure 6 : Visualisation des systèmes d'exposition au laboratoire dans la chambre climatique (température entre 14 et 16°C, photopériode de 16h de lumière par jour d'intensité entre 300 et 500 lux, bullage en continu)

Le jour du début de l'exposition, c'est-à-dire 7 jours après la période de stabilisation, 100 larves de *C. riparius* préalablement amenées en début de stade IV ont été introduites dans chacun des cylindres et chacune des carottes, quelle que soit la condition testée (ce qui représentait un total de 3800 larves utilisées). Par ailleurs, un lot d'environ 400 chironomes témoin (T0) a en plus été prélevé pour analyser les PCB en début d'exposition. Les organismes étaient ensuite nourris *ad libitum* (1 mg.jr⁻¹ par larve de Tetramin® broyée) puis encore 4 fois au cours des 7 jours d'exposition, sauf pour ceux exposés aux sédiments des 2 sites et ceux exposés aux MES pour 4 cylindres sur 8 par sites. Les conditions de température, d'aération et de lumière étaient les mêmes que pour la période de stabilisation. Après 7 jours d'exposition, l'eau surnageante



dans chaque système d'exposition (cylindres ou carottes) a été éliminée par siphonage jusqu'à la surface du substrat (MES, sédiment ou sable) et passée sur un tamis de 0.5 mm de vide de maille afin de récupérer les larves qui pouvaient s'échapper du sédiment, mais également les organismes autochtones qui auraient pu coloniser les systèmes ExpoSET ou le sédiment sur le terrain. Un échantillon composite de la surface du sédiment (couche 0-0.5 cm) des 4 carottes a ensuite été prélevé pour chaque site. Enfin, les chironomes ont été récupérés par tamisage à 0.5 mm, comptés, rassemblés par condition (ce qui permettait d'obtenir des échantillons de 300 et 400 larves par condition pour les analyses). Lorsque des organismes autochtones étaient présents dans les MES ou les sédiments, ceux-ci ont été également prélevés. Puis, les échantillons ont été pesés et congelés, avant de suivre la procédure d'extraction et d'analyse des PCB (Annexe 1).

4.2 Résultats et discussion

Quelle que soit la période d'immersion, les systèmes ExpoSET ont pu être retrouvés et transporté sans difficultés majeures au laboratoire et les échantillonnages de sédiment et d'eau ont pu être réalisés presque entièrement. Seules les carottes de sédiment du site SUD n'ont pas été réalisées lors de la récupération des systèmes à la fin de la 2^{ème} période d'immersion. D'un point de vue quantitatif, quels que soient la période et le site investigué, l'épaisseur de la couche de MES dans chacun des cylindres variait entre 0.5 et 1 cm.

Tableau 1 : Concentration des 7 PCBi dans les MES récupérées dans les systèmes ExpoSET et dans le sédiment de surface des carottes (couche 0-0.5 cm) sur les 2 périodes d'immersion sur les sites DELTA et SUD (n.d. : non déterminé)

Campagne	PCB#	Site DELTA		Site SUD	
		MES (ng/g m.s.)	Séd. (ng/g m.s.)	MES (ng/g m.s.)	Séd. (ng/g m.s.)
#1 (01/03 -> 30/06/16)	28	5.4	18.7	2.6	5.5
	52	3.6	15.2	1.5	<0.0247
	101	19.4	166.5	2.5	1.1
	118	7.1	59.8	0.7	1.9
	153	42.5	301.7	6.5	8.7
	138	28.1	213.8	2.8	5.4
	180	33.1	241.2	6.4	7.3
	somme	139.0	1016.9	23.1	30.0
#2 (30/06 -> 10/10/2016)	28	6.2	28.5	5.2	n.d.
	52	1.8	82.9	0.3	
	101	9.7	307.2	0.0	
	118	3.6	252.7	0.3	
	153	17.0	419.3	2.5	
	138	12.3	301.1	0.8	
	180	20.3	33.3	2.3	
	Somme	70.9	1425.0	11.3	

Le tableau 1 présente les concentrations des 7 PCBi ainsi que leurs sommes obtenues dans les MES récupérées dans les systèmes ExpoSET et dans le sédiment de surface des carottes (couche 0-0.5 cm) sur les 2 périodes d'immersion sur les sites DELTA et SUD. Les résultats des analyses montrent que le site DELTA est plus contaminé en PCB dans les MES et dans les sédiments que le site SUD pour les mêmes périodes d'immersion. Bien que le Tillet ne soit plus connecté directement, il semble que des MES contaminées soient encore capable de sédimenter sur le site DELTA. Par ailleurs, le sédiment sur ce site reste fortement contaminé montrant



que la contamination historique persiste encore 2 ans après les transformations faites sur l'embouchure du Tillet (création d'un port à barques).

Les concentrations de la somme des 7 PCBi analysées dans l'eau filtrée des sites prélevées lors de la récupération des systèmes expoSET pour les 2 campagnes étaient comprises entre 0.6 et 1.7 ng/L. Lorsque les larves de chironomes étaient exposées au sable enrichi en Tetramin® et à l'eau filtrée à 100 µm provenant des 2 sites pour les 2 campagnes (Figure 7), les concentrations de la somme des 7 PCBi obtenues ne dépassaient pas 1.7 ng/g (p.f.). Ces concentrations étaient du même ordre de grandeur que celles des larves de chironomes avant et après exposition dans le sable et l'eau d'élevage (T0 et T7, Figure 7). Seule la concentration dans les larves exposées à l'eau du site SUD pour la campagne #2 atteignait 7 ng/g (p.f.). Cette concentration dans les larves ne s'explique pas compte-tenu que la concentration dans l'eau était la plus basse et correspondait à 0.6 ng/L.

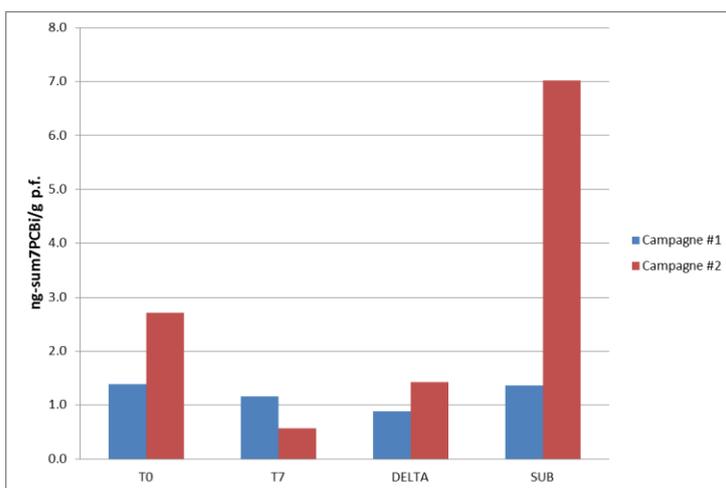


Figure 7 : Concentrations des 7 PCBi dans les larves de chironomes exposées au sable enrichi en Tetramin® et à l'eau filtrée à 100 µm d'élevage (T7), du site DELTA (DELTA) et du site SUD (SUD) pour les 2 campagnes. Les T0 correspondent aux concentrations de la somme des 7 PCBi dans les larves de chironomes avant exposition

Le tableau 2 présente les concentrations de la somme des 7 PCBi obtenues après analyse des chironomes récupérés dans les systèmes ExpoSET avec et sans ajout de nourriture (Tetramin®) et dans le sédiment des carottes sur les 2 périodes d'immersion sur les sites DELTA et SUD.

Tableau 2 : Concentration des 7 PCBi dans les larves de *C. riparius* exposés aux MES (avec et sans ajout de nourriture) et au sédiment de surface sur les 2 périodes d'immersion sur les sites DELTA et SUD (n.d. : non déterminé)

Campagne	Substrat testé	Site DELTA	Site SUD
		Somme des 7PCBi ng/g p.f.	
#1 (01/03 -> 30/06/16)	MES	24.3	22.9
	MES+Tetramin®	56.5	12.9
	SED	292.1	15.7
#2 (30/06 -> 10/10/2016)	MES	53.6	8.5
	MES+Tetramin®	67.5	10.8
	SED	257.1	n.d.



Comparativement aux niveaux de concentrations obtenues dans les larves uniquement exposées à l'eau des sites (Figure 7), les concentrations sont globalement plus élevées. Les rapports entre les concentrations de larves exposées aux sédiments ou aux MES et les concentrations des larves exposées uniquement à l'eau des sites variaient de 9.5 à 329 (hors rapports utilisant la concentration dans les larves exposées à l'eau du site SUD pour la campagne #2). Ces rapports montrent que le sédiment et les MES représentent des voies d'exposition aux PCB importantes pour les larves de chironomes.

Globalement le niveau de contaminations des chironomes exposés aux MES est plus élevé sur le site DELTA que sur le site SUD. Ces résultats confirment que les flux de PCB biodisponibles via le transport de MES contribuent toujours à la contamination proche de l'ancienne embouchure du Tillet. Cependant, les niveaux de concentrations dans les chironomes exposés aux MES intégrées sur une période d'environ 4 mois sont moins importants que les niveaux mesurés avant ou après la restauration du Tillet dans les chironomes encagés (voir figure 4), même si ceux-ci ont été exposés aux MES intégrées seulement sur une période de 7 jours directement sur le site. Bien qu'un flux de contamination non négligeable existe sur ce site, une amélioration de la qualité des MES est donc constatée. Pour ce qui concerne les sédiments, les niveaux de contaminations des chironomes restent assez élevés par rapport à ceux obtenus dans les chironomes encagés sur le site DELTA avant restauration (voir figure 3B ; 533 ng-7PCBi/g p.f. pour DELTA-SED en 2012-11). Les concentrations mesurées dans les larves de chironomes montrent que la contamination historique est toujours potentiellement biodisponible pour la faune benthique, représentant donc une source de nourriture toujours contaminée à un niveau non négligeable pour les poissons.

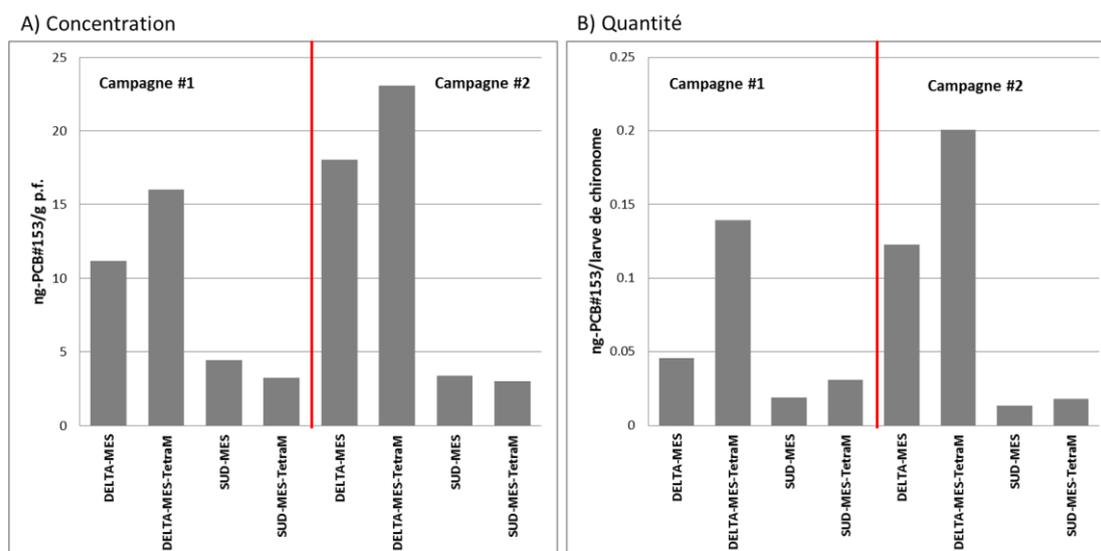


Figure 8 : Concentration (A) et quantité par individu (B) en PCB#153 dans les larves de chironomes exposées aux MES des sites DELTA et SUD avec et sans ajout de Tetramin® (TetraM) pour les 2 campagnes

Concernant l'influence de la nourriture artificielle dans le protocole d'exposition, l'ajout de nourriture au cours des expositions des larves de chironomes aux MES accroît le poids individuel des larves d'un facteur 1.7 par rapport au poids individuel des chironomes qui n'ont pas été nourris. En effet, la moyenne du poids d'une larve (toutes conditions confondues) en fin d'expérimentation sans ajout de Tetramin® était de 4.8 ± 1.3 mg (p.f.), alors que celui d'une larve avec ajout de nourriture était de 8.3 ± 1.5 mg (p.f.). Cette différence de croissance liée à l'apport de nourriture peut avoir un impact sur la concentration des PCB dans les chironomes. Cependant les résultats ne montrent pas de tendances claires sur les concentrations obtenues au regard de la somme des 7 PCBi (Tableau 2). En effet, dans 3 cas sur 4, les concentrations en PCB dans les larves ayant également profitées de la nourriture ajoutée sont plus élevées que les concentrations en PCB dans les larves exposées seulement aux MES. Ces concentra-



tions peuvent varier du simple au double. Dans un seul cas, l'inverse est observé. Le PCB#153 étant le plus abondant dans la majorité des conditions testées, la prise en compte uniquement de ce congénère permet de donner une vision plus claire de l'influence de l'ajout de nourriture (Figure 8).

En effet, dans ce cas, la concentration en PCB#153 augmente d'un facteur 1.3 environ dans les larves ayant bénéficiés de nourriture artificielle en plus des MES provenant du site DELTA quelle que soit la campagne (Figure 8A). En revanche, cette concentration diminue d'un facteur 1.2 environ dans les larves ayant bénéficiés de nourriture artificielle en plus des MES provenant du site SUD quelle que soit la campagne (Figure 8A). Il semble qu'en fonction du degré de contamination des MES, l'influence de la nourriture ne soit pas la même. Dans ce cas, lorsqu'un apport de nourriture est réalisé, les concentrations dans les larves sur les sites peu contaminés pourraient être sous-estimées, et à l'inverse, surestimées sur les sites contaminés significativement. Par ailleurs, lorsque les résultats sont interprétés à partir des données en quantité de PCB#153 par larve de chironome, quelle que soit la condition testée, la quantité en PCB#153 augmente dans les larves qui sont nourries en plus avec de la Tetramin® (Figure 8B). Dans ce cas, l'addition de nourriture provoque une surestimation de la quantité de PCB#153 présente dans les larves en fin d'exposition aux MES, ce qui pourrait avoir des conséquences sur le calcul de transfert de masse de PCB dans le réseau trophique.

L'influence de la nourriture artificielle peut être également observée du point de vu de la répartition des congénères. En effet, dans la figure 9, la répartition des 7 PCBi dans les larves de chironomes exposées aux MES des sites DELTA et SUD avec et sans ajout de Tetramin® (TetraM) pour les 2 campagnes montre des différences de profile notable. Cette différence est plus flagrante pour la première campagne (Figure 9A). Dans ce cas, l'ajout de nourriture aux MES augmente le pourcentage du PCB#101 pour les sites DELTA et SUD au détriment du PCB#28. Lors de la deuxième campagne, cette tendance est toutefois moins perceptible pour le site DELTA. Par ailleurs, à condition égale sans ajout de nourriture entre les 2 campagnes (c'est-à-dire DELTA-MES et SUD-MES), les profils des congénères sont différents, ce qui pourrait dénoter une différence de biodisponibilité des congénères liée à une différence de qualité des MES entre les 2 périodes d'immersion.

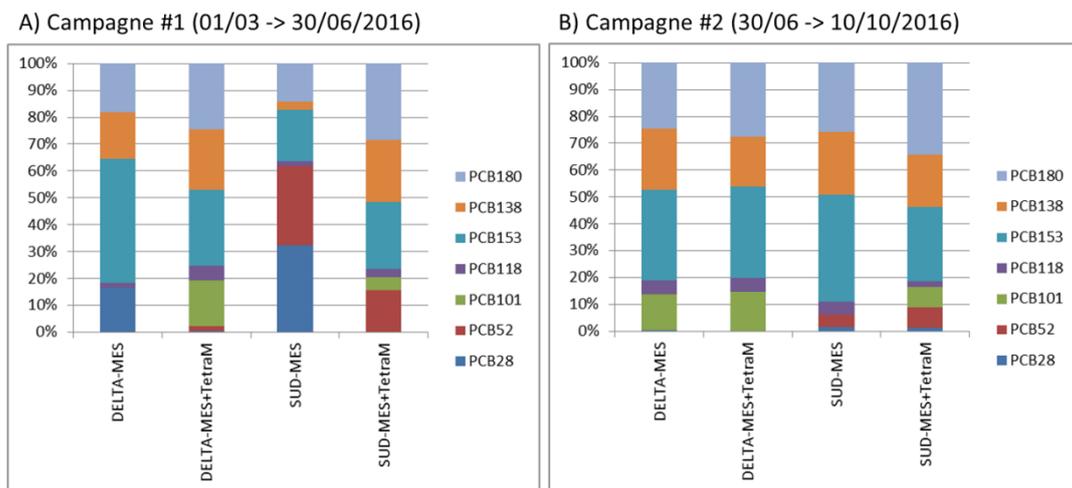


Figure 9 : Répartition des 7 PCB indicateurs dans les larves de chironomes exposées aux MES des sites DELTA et SUD avec et sans ajout de Tetramin® (TetraM) pour la campagne #1 (A) et la campagne #2 (B)

Biens que certaines tendances se dessinent, d'autres expérimentations doivent être menées afin de pouvoir conclure sur l'effet de l'ajout de la nourriture sur la bioaccumulation des PCB



dans les larves. D'ailleurs, d'autres échantillons de larves de chironomes ont été prévus pour analyser les rapports isotopiques du carbone et de l'azote (δC^{13} et δN^{15}) afin de mieux évaluer si les organismes ont eu recours aux ressources trophiques apportées par les MES et les sédiments.

Les résultats d'analyses des sédiments, MES et larves de chironomes permettent de calculer un facteur d'accumulation du compartiment considéré (sédiment ou MES) au biote (BSAF). Ce BSAF est un quotient dont le numérateur est la concentration du contaminant considéré dans le biote, et le dénominateur celle dans le sédiment ou les MES. Normalement dans sa version la plus utilisée, les deux éléments du quotient sont normalisés par rapport au taux de lipides pour le biote et au taux de COT pour le sédiment (ou MES) pour faciliter la comparaison entre des sites très différents. Dans notre étude, nous n'avons pas pu à ce stade des analyses normaliser les données. Par ailleurs, afin de faciliter les comparaisons, les BSAF ont été calculés pour le PCB#153 qui était le plus abondant dans la majorité des conditions testées (tableau 3). Les résultats montrent qu'il existe une bonne cohérence entre les BSAF calculés à partir des concentrations dans les MES et les sédiments en PCB#153 pour un même site pour la première campagne. Lorsque les 2 campagnes sont comparées pour le site DELTA, seules les BSAF calculés à partir des concentrations dans les sédiments sont du même ordre de grandeur. En revanche, le BSAF obtenus à partir de la concentration dans les MES lors de la 2^{ème} campagne est environ 4 fois supérieur à celui de la première campagne. Ce résultat pourrait souligner une différence de biodisponibilité des PCB liée à une différence de qualité des MES entre les 2 périodes d'immersion. Cette tendance n'est pas visible dans les sédiments puisque ceux-ci intègrent les MES anciennes et nouvelles. Afin de renforcer cette hypothèse, des échantillons de MES ont été collectés spécifiquement pour déterminer leur composition en matière organique par fluorimétrie.

Tableau 3 : BSAF non normalisés calculés pour le PCB#153 sur les 2 périodes d'immersion sur les sites DELTA et SUD (n.d. : non déterminé)

Campagne	Substrat testé	Site DELTA	Site SUD
		BSAF PCB#153	
#1 (01/03 -> 30/06/16)	MES	0.262	0.680
	SED	0.270	0.651
#2 (30/06 -> 10/10/2016)	MES	1.062	1.376
	SED	0.201	n.d.

Chacun des systèmes ExpoSET a été laissé sur les sites pendant une période d'environ 4 mois. Ces systèmes ont montré qu'ils étaient bien conçus pour la récupération des MES. Ils ont pu montrer également qu'ils pouvaient constituer un habitat artificiel pouvant être colonisé par des organismes autochtones. Lors de la première campagne, des larves de chironomes (espèces non identifiées mais différentes de *C. riparius*) ont été retrouvées dans les MES piégées dans les systèmes ExposSET, mais également dans les carottes de sédiment. La concentration de la somme des 7 PCBi dans ces larves autochtones retrouvées dans les MES et dans le sédiment sur le site DELTA correspondait respectivement à 64 ng/g (p.f.) et 612 ng/g (p.f.). Ces concentrations étaient supérieures à celles obtenues dans les larves de *C. riparius* utilisées dans cette étude (voir tableau 2). Cependant le rapport entre les concentrations dans les larves de laboratoire exposées aux MES et au sédiment est du même ordre de grandeur que celui obtenu à partir des concentrations dans les larves autochtones qui ont colonisé les différents substrats (i.e., 0.10 pour les larves autochtones et 0.08 pour les larves de laboratoire). L'approche utilisée semble donc refléter une certaine réalité du terrain.



5 Considérations pratiques et conclusions

Globalement, l'ensemble des résultats obtenus montre la pertinence de l'utilisation des chironomes dans des approches type diagnostic pour le suivi de tendance des pressions de contamination aux PCB dans les sédiments et les MES avant et après remédiation des sites contaminés. Ces méthodes in-situ et ex-situ sont bien complémentaires des analyses chimiques pour caractériser au mieux le degré d'imprégnation du milieu en PCB, évaluer leur biodisponibilité, préciser le risque potentiel de transfert le long de la chaîne trophique, définir l'importance des effets de la remédiation sur le lac en tenant compte des variations saisonnières.

Ces outils nécessitent toutefois d'être encore améliorés et validés, notamment en standardisant mieux la variabilité liée aux conditions environnementales fluctuantes pour une meilleure lecture des tests in-situ, ou encore en répondant plus précisément à la question d'ajout ou non de nourriture artificielle au cours des expositions. Ces aspects ont cependant déjà été abordés et les résultats obtenus à ce jour permettent d'aller plus loin dans la réflexion et la mise en place d'expérimentations futures pour permettre une meilleure standardisation des outils.

En ce qui concerne l'encagement sur le terrain, le protocole actuel permet d'ajuster un temps d'exposition au cycle de vie biologique des larves de chironomes pour obtenir un certain poids frais par individu en fonction de la température du site, plutôt que de définir un temps d'exposition fixe quel que soit la campagne de terrain. En procédant de cette manière, les poids frais par individu obtenus en fin d'exposition sont équivalents entre les sites aux différentes saisons, ce qui permet une meilleure comparaison des résultats en gommant l'effet possible du poids sur les concentrations en PCB dans les larves. Cependant, cette manière de procéder n'a été testée qu'avec ajout de nourriture. Cet ajout pourrait amener un biais dans les estimations des concentrations en PCB dans les larves, comme révélé dans les expérimentations ex-situ à l'aide du système ExpoSET. Pour rappel, en terme de concentrations en PCB#153 mesurées dans les larves, les tendances à la sur- ou sous-estimation sont liées à l'ajout de nourriture et pourraient également être fonction du degré de contamination des MES. Lorsque les quantités de PCB#153 dans les larves sont prises en compte, les tendances étaient plutôt à la sur-estimation, quelle que soit la condition testée. Par ailleurs, Babut et al. (2016) ont montré que les organismes encagés, quoique nourris de manière contrôlée pendant leur étude, ont également eu recours aux ressources trophiques locales, en proportion variable selon le site étudié, l'organisme, et la saison. De ce fait, les auteurs militeraient plutôt pour ne pas nourrir les organismes pendant le déploiement des cages, afin de se rapprocher des conditions d'exposition des organismes autochtones. Dans notre étude, une première recommandation serait donc de ne pas nourrir, quel que soit le système utilisé (i.e. encagement ou ExpoSET) tout en continuant à maîtriser les temps d'exposition en fonction du cycle de vie des larves. Une étude complémentaire devrait être faite sur des échantillons stockés en prévision pour la mesure des isotopes stables afin d'aider à clarifier la question du bénéfice ou non d'ajouter de la nourriture artificielle.

Bien que les 2 outils soient tout à fait valables pour être utilisés dans le suivi de tendance des pressions de contamination aux PCB dans les sédiments et les MES, le système ExpoSET permet d'intégrer en plus une plus longue période de récupération des MES (i.e. 4 mois contre 7 jours maximum pour l'encagement). Cette méthode a d'ailleurs permis de souligner l'influence possible de la qualité de la matière organique sur la biodisponibilité des PCB en fonction des saisons. La nature de la matière organique influence probablement l'enrichissement des chironomes en PCB et donc peut contribuer à la variabilité de la contamination de la nourriture disponible pour les organismes de niveau trophique supérieur. Des analyses complémentaires ont été prévues pour vérifier si il existe une différence de qualité de la matière organique sur les deux périodes d'intégration des MES. Des expérimentations complémentaires seront à prévoir par la suite pour étayer ces observations. Par ailleurs, le système ExpoSET offre aussi une possibilité de récupérer des organismes autochtones en agissant comme substrat artificiel tout au long de la période d'immersion. Au cours de cette étude, il a été possible de récupérer des chironomes autochtones, des amphipodes, des bivalves et même des plantes aquatiques. La



récupération du biofilm présent sur les tubes est également envisageable (voir photo C dans le Figure 5).

Cette étude a permis d'une part d'exposer des chironomes aux MES et d'autre part aux sédiments en place. Quel que soit l'approche méthodologique utilisée (i.e., in-situ ou ex-situ), cette étude montre que le suivi de la dynamique de contamination par l'exposition des chironomes aux MES est mieux adapté pour évaluer l'effet direct de la restauration sur le site, alors que le suivi par l'exposition des chironomes aux sédiments est plus pertinent pour rendre compte de l'évolution de la contamination historique dans le temps et pour estimer le niveau de contamination résiduel des proies. Cette approche permet donc de fonctionner à 2 échelles temporelles. En effet, bien qu'il puisse y avoir une diminution de la contamination qui entre dans le lac, la concentration historique présente dans les sédiments du lac est potentiellement toujours assez élevée et biodisponible pour contribuer à un transfert important tout au long de la chaîne trophique.

6 Références bibliographiques

AFNOR (2010). Qualité de l'eau – Détermination de la toxicité des sédiments d'eau douce vis-à-vis de *Chironomus riparius*. Norme NF T 90-339-1.

Armitage, P.D., Cranston, P.S., Pinder, L.C.V., 1995. *The Chironomidae: Biology and Ecology of Non-Biting Midges*, first ed. Chapman and Hall, London, p. 572.

Babut, M., Ferrari, B., Lauzent, M., Simonnet-Laprade, C., Labadie, P., Budzinski, H. (2016). Accumulation de contaminants prioritaires par des invertébrés et poisons d'eau douce: Facteurs d'amplification trophique pour l'hexabromocyclododécane, le perfluorooctane sulfonate et les polybromodiphényléthers. Rapport pour l'Action n°38 du programme 2013-2015, ONEMA, Paris, France, p.90.

Babut, M., Labadie, P., Simonnet-Laprade, C., Munoz, G., Roger, M.-C., Ferrari, B.J.D., Budzinski, H., Sivade, E. (2017). Per- and poly-fluoroalkyl compounds in freshwater fish from the Rhône River: influence of fish size, diet, prey contamination and biotransformation. *The Science of Total Environment*, 605-606: 38-47.

Bertin, D., Ferrari, B.J.D., Labadie, P., Sapin, A., Garric, G., Budzinski, H., Houde, M., Babut, M. (2014). Bioaccumulation of perfluoroalkyl compounds in midge (*Chironomus riparius*) larvae exposed to sediment. *Environmental Pollution*, 189: 27-34.

Bervoets, L., Meregalli, G., De Cooman, W., Goddeeris, B., Blust, R. (2004). Caged midge larvae (*Chironomus riparius*) for assessment of metal bioaccumulation from sediments in situ. *Environ. Toxicol. Chem.*, 23: 443–454.

Casado-Martinez, C., Molano-Leno, L., Grandjean, D., De Alencastro, L.F., Werner, I., Ferrari, B.J.D. (2016). Impacts des sédiments sur la qualité de l'eau : Surveillance écotoxicologique de la qualité de la rivière Venoge (VD). *Aqua&Gas*, 96(4): 56-63.

Covich, A.P., Palmer, M.A., Crowl, T.A. (1999). The role of benthic invertebrate species in freshwater ecosystems: Zoobenthic species influence energy flows and nutrient cycling. *BioScience*, 49(2): 119–127.

Crane, M., Higman, M., Olsen, T., Simpson, P., Callaghan, A., Fisher, T. and Kheir, R. (2000). An in situ system for exposing aquatic invertebrates to contaminated sediments. *Environ. Toxicol. Chem.*, 19: 2715–2719.

Dabrin, A., Durand, C.L., Garric, J., Geffard, O., Ferrari, B.J.D., Coquery, M. (2012). Coupling geochemical and biological approaches to assess availability of cadmium in freshwater sediment. *Science of the Total Environment*, 424: 308-315.



de Bisthoven, L.J., Gerhardt, A. and Soares, A.M.V.M. (2004). Effects of acid mine drainage on larval *Chironomus* (Diptera, Chironomidae) measured with the Multispecies Freshwater Biomonitor. *Environ. Toxicol. Chem.*, 23: 1123–1128.

Diepens, N.J., Arts, G.H.P., Brock, T.C.M., Smidt, H., Van Den Brink, P.J., Van Den Heuvel-Greve, M.J., Koelmans, A.A. (2014). Sediment toxicity testing of organic chemicals in the context of prospective risk assessment : a review. *Crit. Rev. Environ. Sci. Technol.*, 44(3): 255–302.

Ferrari, B.J.D., Faburé, J. (2017). Field assessment of reproduction-related traits of chironomids using a newly developed Emergence platform (E-Board). *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 137: 186-193.

Ferrari, B.J.D., Vignati, D.A.L., Dominik, J. (2014). Bioaccumulation kinetics and effects of sediment-bound contaminants on chironomids in deep waters: new insights using a low-disturbance in situ system. *Environmental Technology*, 35(4): 456-469

Landrum, P.F., Tigue, E.A., Driscoll, S.K., Gossiaux, D.C., Van Hoof, P.L., Gedeon, M.L., Adler, M. (2001). Bioaccumulation of PCB congeners by *Diporeia* spp.: kinetics and factors affecting bioavailability. *J. Great Lakes Res.* 27(2): 117–133.

Leppänen, M.T., Ristola, T., Johnson, J., Burton, G.A. (2006). Applying adult emergence as an endpoint in a post-exposure laboratory test using two midge species (Diptera: Chironomidae). *Chemosphere*, 64: 1667-1674.

Meregalli, G., Vermeulen, A.C. and Ollevier, F. (2000). The use of chironomid deformation in an in situ test for sediment toxicity. *Ecotox. Environ. Safety*, 47: 231-238.

OECD (2010) Test guideline 233 Sediment-water Chironomid life-cycle toxicity test using spiked water or spiked sediment.

Péry, A.R.R., Garric, J., (2006). Modelling effects of temperature and feeding level on the life cycle of the midge *Chironomus riparius*: an energy-based modelling approach. *Hydrobiologia* 553: 59–66.

Péry, A.R.R., Mons, R., Flammarion, P., Lagadic, L. and Garric, J. (2002). A modelling approach to link food availability, growth, emergence, and reproduction for the midge *Chironomus riparius*. *Environ. Toxicol. Chem.*, 21: 2507–2513.

Schmitt-Jansen, M., Veit, U., Dudel, G. and Altenburger, R. (2008). An ecological perspective in aquatic ecotoxicology: Approaches and challenges. *Basic and Applied Ecology*, 9: 337–345.

Sibley, P.K., Benoit, D.A., Balcer, M.D., Phipps, G.L., West, C.W., Hoke, R.A., Ankley, G.T. (1999). In situ bioassay chamber for assessment of sediment toxicity and bioaccumulation using benthic invertebrates. *Environ. Toxicol. Chem.*, 18: 2325–2336.

Sidney, L.A., Diepens, N.J., Guo, X., Koelmans, A.A. (2016). Trait-based modelling of bioaccumulation by freshwater benthic invertebrates. *Aquatic Toxicology*, 176: 88-96.

Soares, S., Cativa, I., Moreira-Santos, M., Soares, A.M.V.M. and Ribeiro, R. (2005). A short-term sublethal in situ sediment assay with *Chironomus riparius* based on postexposure feeding. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, 49: 163-172.



7 Listes des figures et tableaux

7.1 Liste des figures

<i>Figure 1 : Stations investiguées avant la restauration du Tillet pour évaluer la bioaccumulation des PCB dans les larves de Chironomus riparius exposés aux MES et aux sédiments</i>	3
<i>Figure 2 : Exemple de cage (A) et disposition des systèmes dans le lac du Bourget (B)</i>	4
<i>Figure 3 : Exposition des systèmes d'encagement dans le Tillet et dans le lac du Bourget pendant la période estivale (A) et la période hivernale (B). Les différents sites sont identifiables dans la figure 1. Les T0 correspondent aux concentrations de la somme des 7 PCBi dans les larves de chironomes avant exposition</i>	4
<i>Figure 4 : Evolution des concentrations de la somme des 7 PCBi dans les larves de chironomes engagées dans les systèmes d'exposition aux MES seules sur le site DREAL avant et après restauration du Tillet</i>	6
<i>Figure 5 : Design, installation et récupération du système ExpoSET</i>	7
<i>Figure 6 : Visualisation des systèmes d'exposition au laboratoire dans la chambre climatique (température entre 14 et 16°C, photopériode de 16h de lumière par jour d'intensité entre 300 et 500 lux, bullage en continu)</i>	8
<i>Figure 7 : Concentrations des 7 PCBi dans les larves de chironomes exposées au sable enrichi en Tetramin® et à l'eau filtrée à 100 µm d'élevage (T7), du site DELTA (DELTA) et du site SUD (SUD) pour les 2 campagnes. Les T0 correspondent aux concentrations de la somme des 7 PCBi dans les larves de chironomes avant exposition</i>	10
<i>Figure 8 : Concentration (A) et quantité par individu (B) en PCB#153 dans les larves de chironomes exposées aux MES des sites DELTA et SUD avec et sans ajout de Tetramin® (TetraM) pour les 2 campagnes</i>	11
<i>Figure 9 : Répartition des 7 PCB indicateurs dans les larves de chironomes exposées aux MES des sites DELTA et SUD avec et sans ajout de Tetramin® (TetraM) pour la campagne #1 (A) et la campagne #2 (B)</i>	12

7.2 Liste des tableaux

<i>Tableau 1 : Concentration des 7 PCBi dans les MES récupérées dans les systèmes ExpoSET et dans le sédiment de surface des carottes (couche 0-0.5 cm) sur les 2 périodes d'immersion sur les sites DELTA et SUD (n.d. : non déterminé)</i>	9
<i>Tableau 2 : Concentration des 7 PCBi dans les larves de C. riparius exposés aux MES (avec et sans ajout de nourriture) et au sédiment de surface sur les 2 périodes d'immersion sur les sites DELTA et SUD (n.d. : non déterminé)</i>	10
<i>Tableau 3 : BSAF non normalisés calculés pour le PCB#153 sur les 2 périodes d'immersion sur les sites DELTA et SUD (n.d. : non déterminé)</i>	13



ANNEXE 1 Prétraitement et analyse des échantillons

Extraction et purification des sédiments

Le sédiment humide est tamisé à 2mm avant extraction afin d'éliminer les éventuels végétaux et/ou graviers.

La teneur en eau et la perte au feu sont alors réalisés sur un aliquot.

Teneur en eau

1g de sédiment pesé précisément est placé durant 24h dans une étuve thermostatée à 105°C ; le sédiment préalablement refroidit au dessiccateur est alors pesé (balance Mettler Toledo new classic ML)

Perte au feu

L'échantillon sec est alors placé 2h à 525°C puis placé au dessiccateur jusqu'à refroidissement complet ; la masse de sédiment est alors pesée précisément (balance Mettler Toledo new classic ML)

Extraction au solvant

Les sédiments sont extraits au solvant sous pression à chaud en utilisant le système Dionex ASE 200 ;

3g de sédiment humide tamisé à 2mm sont séchés par ajout de sulfate de sodium anhydre (préalablement chauffé à 400°C/2 heures puis refroidit au dessiccateur) et broyé au mortier jusqu'à l'obtention d'une poudre fine

Le sédiment sec est alors placé dans une cellule d'extraction ASE de 33 ml ; 20 µL d'étalon interne (PCB-116 d5) d'une concentration de 0.5 µg/ml est ajouté à l'échantillon sec à l'aide d'une seringue Hamilton de 100µL.

L'extraction ASE est alors réalisée durant 3 cycles (100°C – 100 bars) à l'aide d'un solvant acétone/dichlorométhane (50 :50)

L'extrait obtenu est évaporé sous azote en utilisant un système de concentration TurboVap II jusqu'à un volume de 1 ml environ puis évaporé jusqu'à 100µL sous flux d'azote ultra-pur et repris par 1 ml d'heptane.

Purification de l'extrait

2.2 g de silice (purifié par passage à 525°C/2 heures) est placé dans une colonne en verre munie d'un fritté en verre. L'extrait obtenu est alors placé sur la silice. L'élution se fait par un mélange heptane/dichlorométhane :

- une 1^{ère} élution avec 20ml du mélange en proportion (98 :2)
- une 2^{ème} élution avec 10ml du mélange en proportion (80 :20)

Les deux fractions sont réunies et concentré au TurboVap jusqu'à un volume de 1mL ;

Le soufre potentiellement présent dans le sédiment est éliminé par complexation avec du cuivre préalablement activé à l'acide sulfurique. L'échantillon est alors filtré sur PTFE 0.2µm puis évaporé jusqu'à 100µL environ sous flux d'azote ultra-pur. Le volume d'échantillon restant est mesuré précisément à l'aide d'une seringue Hamilton de 100µL et complété à 200µL avec de l'heptane avant l'analyse par chromatographie gazeuse.

Extraction et purification des chironomes

Conservation du matériel biologique :

Les chironomes sont conservés au congélateur à -18°C jusqu'à leur analyse.

Extraction aux ultra-sons

5g de poisson ou 1g de chironome sont pesés précisément (balance Mettler Toledo new classic ML) et ajouté à 25ml d'un mélange heptane/acétone (75 :25) ainsi que 20µl d'une solution de PCB116-d5 à 0.5µg/ml utilisée comme étalon interne.

Le mélange est placé 1h dans un bain ultra-sons à 40°C. L'extrait obtenu est récupéré après décantation. Une deuxième extraction est alors réalisée sur le décantat avec 25ml du même



mélange et placé 1h dans un bain ultra-sons à 40°C. Les deux fractions organiques sont mélangées.

Purification de l'extrait

3 g de silice acide précédemment obtenue sont placés dans une colonne en verre munie d'un fritté en verre. L'extrait obtenu est alors placé en tête de colonne.

L'élution se fait par un mélange heptane/dichlorométhane :

- une 1^{ère} élution avec 20ml du mélange en proportion (98 :2)
- une 2^{ème} élution avec 10ml du mélange en proportion (80 :20)

Les deux fractions sont réunies et concentré au TurboVap jusqu'à un volume de 1ml ;

L'échantillon est alors filtré sur PTFE 0.2µm puis évaporé jusqu'à 100µL environ sous flux d'azote ultra-pur. Le volume d'échantillon restant est mesuré précisément à l'aide d'une seringue Hamilton de 100µL et complété à 200µL avec de l'heptane avant l'analyse par chromatographie gazeuse.

Dosage des PCB par chromatographie gazeuse

Les 7 PCB indicateurs (CB28, 52, 101, 118, 138, 153, 180) sont analysés par chromatographie gazeuse (Clarus 580 Perkin Elmer) couplé à un détecteur par ionisation à décharge pulsée (VICI, PDID mode ECD).

Les PCB sont séparés sur une colonne Optima5 30m, 0.25µm MACHEREY NAGEL avec le programme de température suivant 60°C/1min ; rampe de 10°C/min jusqu'à 240°C, puis de 5°C/min jusqu'à 320°C, puis 320°C durant 5 min.

Les PCB sont identifiés par leur temps de rétention.

L'étalonnage interne pour quantification utilise l'étalon interne PCB-116 d5 c.