



Lien entre la toxicité, la contamination des milieux aquatiques mesurés chez *Gammarus fossarum* et la perturbation des communautés biologiques

Calibration des marqueurs de toxicité chez le gammare encagé à l'aide de la bio-indication.

Rapport final

Olivier Geffard, Benjamin Alric, André Chandesris, Martial Ferréol Adeline François, Jeremy Piffady, Bertrand Villeneuve, Arnaud Chaumot (Irstea Lyon)

février 2019

- **AUTEURS**

Laboratoire d'écotoxicologie, UR RiverLy, Irstea Lyon-Villeurbanne

Olivier Geffard, directeur de recherche (Irstea), olivier.geffard@irstea.fr

Benjamin Alric, post-doctorant (Irstea), benjamin.alric@irstea.fr

Adeline François, Ingénieur d'étude (Irstea), adeline.francois@irstea.fr

Arnaud Chaumot, chargé de recherche (Irstea), arnaud.chaumot@irstea.fr

Laboratoire d'hydroécologie quantitative, UR RiverLy, Irstea Lyon-Villeurbanne

André Chandesris, IAE (Irstea), andré.chandesris@irstea.fr

Jeremy Piffady, IPEF (Irstea), jeremy.piffady@irstea.fr

Bertrand Villeneuve, Ingénieur de recherche (Irstea), martial.ferreol@irstea.fr

Martial Ferréol, Ingénieur d'étude (Irstea), martial.ferreol@irstea.fr

- **CORRESPONDANTS**

AFB : Olivier Perceval, DAST (AFB), olivier.perceval@afb.fr

Partenaire : Olivier Geffard, Directeur de recherche (Irstea), olivier.geffard@irstea.fr

Droits d'usage : [par ex. accès libre ou accès réservé à XXX]

Niveau géographique : [un seul choix entre : mondial, national, régional, départemental, communal]

Couverture géographique : [administrative : indiquer le ou les pays, région, département ou commune ; citations locales : indiquer les noms de cours d'eau, plan d'eau, masse d'eau, bassin hydrographique]

Niveau de lecture : [plusieurs choix possibles entre : scolaires, citoyens, professionnels, experts]

[Les rubriques propres au partenaire (visa par ex.) peuvent être insérer dans cette page ou ajouter sur une page supplémentaire]



- **RESUME**

Le biomonitoring actif par encagement de gammarès est reconnue comme un outil de choix pour le suivi de la contamination chimique et l'évaluation de la toxicité des milieux aquatiques. Les travaux menés dans cette partie de la fiche 48 avait pour objectif de calibrer la réponse de marqueurs de toxicité à l'aide de données de bio-indication comme l'abondance de populations chez des familles d'intérêt. Pour ceci, une campagne d'expérimentation sur une soixantaine de sites du réseau de surveillance a été menée dans le but d'acquérir des données de toxicité sur la survie, l'activité acétylcholinestérase et le taux d'alimentation. Peu d'impacts ont été observés sur la survie et l'activité acétylcholinestérase, ne permettant pas d'établir de liens avec les abondances observées sur ces stations pour les 6 familles retenues. En revanche, des effets marqués ont été obtenus avec la mesure du taux d'alimentation. Les résultats obtenus ont montré une relation entre le pourcentage d'inhibition du taux d'alimentation et l'abondance des populations pour chacune des familles étudiées. Ces travaux montrent qu'il est possible de définir un niveau d'inhibition pour lequel un impact sur les populations du milieu est attendu, avec des réponses plus ou moins marquées selon la sensibilité de la famille considérée.

- **MOTS CLES (CONTAMINATION CHIMIQUE, TOXICITE, BIOMONITORING ACTIF, IMPACTS SUR POPULATIONS ET COMMUNAUTES, NATIONAL)**



- **RELATIONSHIP BETWEEN TOXICITY, BIOAVAILABLE METALS CONTAMINATION MEASURED IN CAGED *GAMMARUS FOSSARUM* AND DISTURBANCE OF COMMUNITIES**

- **ABSTRACT**

Active biomonitoring using caged gammarids is now recognized as a relevant tool for chemical and ecotoxicological survey of aquatic systems. The aim of this study is to establish relationships between toxicity data, obtained from biomarkers measurement for example, and ecological data such as population abundances. For this, a field study was performed on more than 60 sites from the national network, in order to acquire toxicity data (survival, acetylcholinesterase activity and feeding rate). Few impacts were observed for survival rate and acetylcholinesterase activity, and consequently no relationship with ecological data could be established. Conversely, strong effects were observed with feeding rate measurement. In this context, relationship between percentages of feeding inhibition and population abundances of the 6 studied families was established. The present study show that a feeding rate level could be defined and proposed, below which an impact on native populations should be expected.

- **KEY WORDS (CONTAMINATION, TOXICITE, ACTIVE BIOMONITORING, IMPACTS ON POPULATION AND COMMUNITIES, NATIONAL)**



LIEN ENTRE LA TOXICITE, LA CONTAMINATION DES MILIEUX AQUATIQUES MESURES CHEZ *GAMMARUS FOSSARUM* ET LA PERTURBATION DES COMMUNAUTES BIOLOGIQUES

CALIBRATION DES MARQUEURS DE TOXICITE CHEZ LE GAMMARE ENCAGE A L'AIDE DE LA BIO- INDICATION.

- **SYNTHESE POUR L'ACTION OPERATIONNELLE**

Contexte général

La nécessité de devoir identifier l'origine d'une perturbation et de discriminer un stress d'origine physique (habitat) ou chimique (polluant) impose d'établir et de quantifier les liens existants entre cause et effet et par conséquent de revenir à des « systèmes biologiques » simplifiés (niveau biologique moins élevé) que sont la cellule ou l'organisme. Les bio-tests de laboratoire permettent d'évaluer la toxicité de compartiments environnementaux (eaux et sédiments) dans des conditions contrôlées (identiques pour tous les échantillons), mais l'interprétation de ces résultats au regard de la complexité du milieu naturel se révèlent difficile, voire impossible car ces tests ne permettent pas de mimer les fluctuations naturelles de nombreuses paramètres physico-chimiques (température, pH, dureté, salinité, etc.) pouvant jouer un rôle primordial aussi bien au niveau de la sensibilité de l'organisme que de la mobilité, de la bio-disponibilité et donc de la toxicité des polluants. Dans ce contexte, la mise en place d'approches *in situ* a reçu une attention toute particulière car elles permettent de limiter les artéfacts liés au prélèvement et à la manipulation des échantillons environnementaux et intègrent les fluctuations des caractéristiques physico-chimiques des milieux, mais également des apports en contaminants. Cette approche par encagement a été développée sur l'espèce sentinelle *Gammarus fossarum* par le laboratoire d'écotoxicologie et ceci dans le but de proposer des outils de surveillance pour le suivi de la contamination chimique et de la toxicité des milieux aquatiques. Ces travaux ont notamment reposé sur l'étude et la formalisation de l'effet des facteurs environnementaux (i.e. température, dureté) sur les réponses étudiées et leur intégration pour la définition de valeurs de référence et seuil, au-delà desquelles une contamination ou un effet toxique est avéré.

Dans le cadre de nos réflexions visant à mieux comprendre et décrire l'impact de la pression chimique sur les communautés aquatiques, nous avons très récemment étudié la possibilité d'établir un lien entre les niveaux de contamination biodisponible et des données de bio-indication, notamment l'abondance des populations de gammarus. Les travaux développés dans la première partie de cette fiche action (n°48 ; Ciliberti *et al.*, 2017 ; Geffard *et al.*, 2018) ont démontré qu'il était possible d'établir une relation entre les niveaux de contamination observés dans les gammarus encagés, pour 3 métaux (Cd, Ni et Pb), et les abondances en gammarus sur les sites étudiés, ceci à partir d'une étude à large échelle sur plus de 90 stations. Récemment et dans le cadre de cette même fiche action, cette réflexion a été menée sur un jeu de données plus important, avec plus de 400 stations expérimentées et à l'aide d'un indicateur permettant d'intégrer l'ensemble des 19 métaux mesurés chez le gammare encagé (Alric *et al.*, Soumis ; voir partie résultats – discussion).

Objectifs

Dans la continuité de ce que nous avons développé à partir des données d'accumulation, l'objectif de ce travail était d'établir des relations entre les réponses toxiques mesurées chez les organismes encagés et des données de bio-indication (l'abondance d'espèces), c'est-à-dire de calibrer les données de toxicité à partir de données de bio-indication obtenues dans le cadre des réseaux de surveillance. Pour ceci, nous avons conduit une campagne d'expérimentation *in situ* sur plus de soixante stations afin d'acquérir de la données d'écotoxicité à l'échelle nationale.

Méthodologie

Sites étudiés : Pour cette étude, soixante-quatre stations réparties à l'échelle nationale ont été sélectionnées (Figure A). La base de données ainsi formée repose sur un travail expérimental de terrain (encagement de gammares) mené entre septembre 2017 et avril 2018. Toutes les stations ont été expérimentées dans le cadre de la fiche-action 48, quarante-huit stations en 2017 et seize stations au cours de l'année 2018. Ces stations font partie, des réseaux de contrôle de surveillance (RCS) et/ou des réseaux de contrôle opérationnel (RCO).

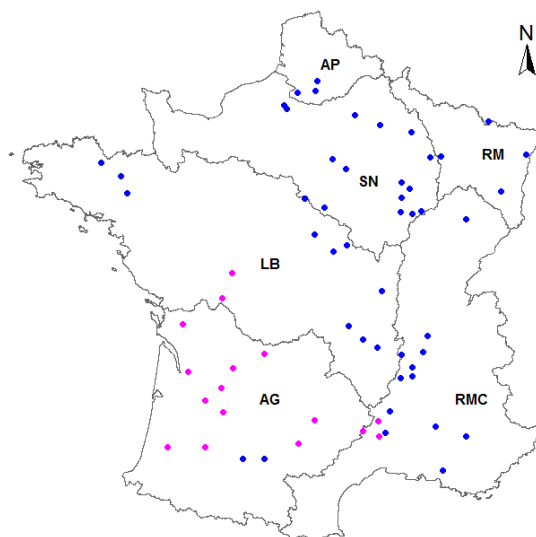


Figure A : Localisation géographique des sites étudiés. Les points bleus et roses correspondent aux stations expérimentées respectivement en 2017 et 2018 dans le cadre de la fiche-action 48.

Abondances des espèces ciblées : six familles de macro-invertébrés : Baetidés, Chironomidés, Ephemeridés, Gammaridés, Hydrobiidés et Hydropsychidés ont été retenues. Les abondances des populations de ces six familles de macro-invertébrés ont été déterminées à l'aide des données de bio-indication obtenues lors de la surveillance réglementaire imposée par la DCE pour les années allant de 2011 à 2017. Evaluer une dégradation possible de l'abondance des populations de macro-invertébrés locales est basée sur la définition de niveaux de référence, correspondant aux niveaux d'abondances observées sur divers bassins versants non impactés. Les abondances des six familles de macro-invertébrés enregistrées dans les 64 stations sont alors pondérées par ces niveaux de références, suivant la procédure développée par Ciliberti *et al.* (2017).

Mise en place des expérimentations in situ : Les gammares sont encagés dans des cylindres en polypropylène (hauteur : 11 cm ; diamètre : 5 cm) percés au laser de trous de 500 µm de diamètre pour garantir une libre circulation de l'eau. **Erreur ! Source du renvoi introuvable.** Dans la rivière, les cages sont protégées par un système d'immersion, celui-ci est placé dans le cours d'eau, face au courant, sans distinction de rives. Il est déposé directement sur le fond du cours d'eau ou à 30 cm maximum, au bout d'un câble relié à la rive en veillant à ce qu'il n'y ait pas de risque d'exondation. Les gammares sont transplantés en rivière pendant 7 jours. Ils ont été nourris durant toute la durée des expérimentations *in situ* en plaçant dans chaque système des feuilles d'aulne (*A. glutinosa*, les mêmes que celles utilisées en laboratoire). La température de l'eau, la conductivité, la concentration en oxygène et le pH ont été mesurés *in situ* à chaque intervention sur site (pose et récupérations des cages).

Réponses biologiques mesurées : La mesure de l'alimentation est basée sur l'étude de la consommation sur 20 disques de feuilles d'aulnes par les gammares sur les 7 jours d'exposition. Le taux d'alimentation est calculé à partir de la surface totale de disques consommée en mm². La valeur moyenne est comparée à la valeur seuil de référence, correspondant à la consommation attendue en milieu non contaminé et pour les conditions de température observées sur la station de mesure (Coulaud *et al.*, 2011). Cette différence est exprimée en pourcentage d'inhibition (FI). L'activité acétylcholinestérase est mesurée chez des gammares mâles de taille calibrée exposés pendant 7 jours. Le dosage de l'activité AChE a été réalisé selon une méthode colorimétrique décrite par Xuereb

et al. (2007). Elle est exprimée en nmol/min et correspond à la moyenne des valeurs obtenues pour chaque réplicat. Elle est ensuite comparée à la valeur de référence, qui correspond à l'activité attendue en milieu non contaminé (Xuereb et al., 2007)

Principaux résultats acquis

Les survies obtenues ont montré aucune toxicité aigüe, avec des taux compris entre 75 et 98 %. Ainsi le jeu de données construit pour cette réponse n'a pas permis de calibrer ces résultats à l'aide de données de bio-indication. Comme pour la survie, très peu d'effets ont été observés avec la mesure de l'activité acétylcholinestérase, ne permettant pas d'établir de relation entre les données obtenues à l'aide de ce marqueur et les abondances observées pour les populations des 6 familles retenues dans ce travail.

La dernière réponse étudiée est le taux d'alimentation qui est un marqueur de toxicité dit « global », c'est-à-dire qui répond ou est modulé par une large gamme de contaminants, inorganiques et organiques. Contrairement aux autres réponses étudiées, ces résultats montrent une très large gamme d'inhibitions du taux d'alimentation, comprise entre 0 et 80%. Quinze pourcents des sites présentent un niveau de contamination très fortement toxique. La figure B montre qu'il existe une relation entre l'abondance de chacune des familles choisie et le taux d'inhibition de l'alimentation. Pour chacune des familles, il est possible d'observer un taux d'inhibition de l'alimentation en-dessous duquel l'abondance est anormalement réduite. Bien que ces observations devront être confortées et affinées à partir de jeux de données plus importants, ces travaux montrent clairement qu'il est possible de calibrer une réponse écotoxicologique à partir de données écologiques et ainsi de pouvoir interpréter les réponses individuelles, obtenues par encagement, en terme de danger pour les populations présentes. Ce type de résultats et travaux offre de nouvelles perspectives et de nouveaux intérêts dans l'utilisation des outils écotoxicologiques pour le diagnostic et la gestion des milieux. De façon complémentaire au approche *a priori*, comme la SSD (Species Sensitivity Distribution), ce travail montre l'intérêt et la possibilité d'utiliser / exploiter les études de diagnostic (*a posteriori*), menées par biomonitoring actif, pour mieux qualifier et évaluer le danger de la contamination chimique sur les communautés. La figure B montre également qu'il est possible d'observer une réponse plus ou moins précoce selon la famille considérée. Par exemple, pour les familles de gammaridés, hydrobidés et epheméridés, connues pour être plus sensibles, notamment à la contamination métallique, aucune abondance normale a été observée pour les stations se trouvant dans la gamme de réponse rouge, alors que pour les trois autres familles (baetidés, chironomidés et ydropsychidés), des abondances normales sont observées pour des taux d'inhibition alimentaire compris entre 50 et 60%, même si ensuite elles s'écroulent. Ces résultats montrent qu'il sera possible de traduire les réponses toxiques obtenues au travers d'organismes encagés en pourcentage de familles en danger/vulnérables vis-à-vis de la contamination d'un milieu considéré.

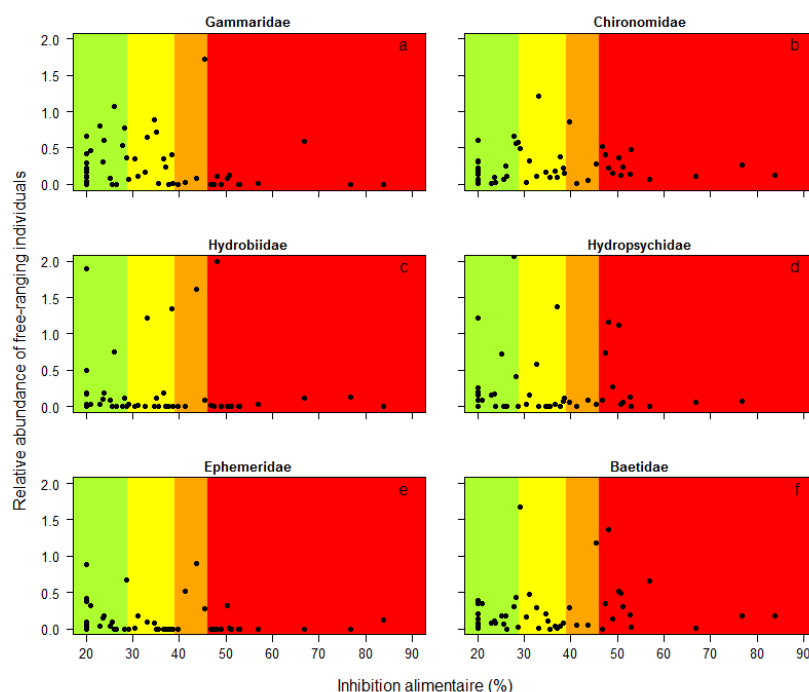


Figure B : Relation entre l'abondance de macro-invertébrés (corrigée selon la typologie physico-chimique) et les inhibitions d'alimentation observées chez les organismes encagés pour les six familles de macro-invertébrés a) Gammaridés, b) Chironomidés, c) Hydrobiidés, d) Hydropsychidés, e) Ephemeridés et f) Baetidés. Les couleurs correspondent aux seuils de gravité définis pour ce marqueur de toxicité. Zone verte : l'eau présente une contamination très faiblement toxique ; zone jaune : l'eau présente une contamination modérément toxique ; zone orange : l'eau présente une contamination fortement toxique et zone rouge : l'eau présente une contamination très fortement toxique. Pour cette calibration, seules les stations pour lesquelles une inhibition significative du taux d'alimentation a été observée, ont été utilisées

Pour en savoir plus

- Alric, B., Geffard, O., Chandesris, A., Ferreol, M., François, A., Perceval, O., Piffady, J., Villeneuve, B., Chaumot, A. Proposal of multi-substance indicators of aquatic bioavailable contamination: relevance of bioaccumulation data in caged sentinel organisms for chemical and ecological survey at large geographical scale. *Environmental Science & Technology*, soumis
- Besse, J.P., Coquery, M., Lopes, C., Chaumot, A., Budzinski, H., Labadie, P., Geffard O. 2013. Caged *Gammarus fossarum* (crustacea) as a robust tool for the characterization of bioavailable contamination levels in continental waters. Toward the determination of threshold values. *Water Research*, 47: 650-660.
- Chabanne, Q., Chaumot, A., Coquery, M., François, A., Geffard, O., Lebrun, J.D., Noury, P., Queau, H., Recoura-Massaquant, R., Urien, N., Vigneron, A. 2015. Développement d'une méthodologie pour l'amélioration du suivi chimique des eaux continentales - Proposition d'indicateurs chimiques et toxicologiques utilisant le gammare : importance de l'espèce et de la population utilisée. 41 p.
- Chaumot A., Coulaud R. Lopes C., Queau H., François A., Geffard O. 2013. Modélisation pour l'interprétation des réponses individuelles mesurées lors de tests de toxicité *in situ*. 29 p.
- Coulaud R., Geffard O., Xuereb B., Lacaze E., Quéau H., Garric J., Charles S., 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(19): 6417-6429

Remerciements

La réalisation de ce travail a bénéficié de la précieuse collaboration de plusieurs personnes, que nous remercions pour leur grande disponibilité :

Patrice Noury, Laura Garnerio, Nicolas Delorme et Hervé Quéau (Ecotox, Irstea Lyon)

Les agences de l'eau Artois-Picardie (Jean Prygiel), Rhône-Méditerranée & Corse (Thomas Pelte) et Rhin Meuse (Miguel Nicolăi) pour l'accès aux données acquises à l'aide d'encagement de gammare et leur participation au comité de pilotage avec également Marina Coquery (Irstea), Dorothee Bolzan (AEAP), Maïa Akopian (AESN), Lionel Navarro (AERM&C), Xavier Bourrain (AELB) et Yorick Reyjol et Olivier Perceval de l'AFB.

- **SOMMAIRE**

1. Introduction	12
2. Matériel et méthodes	13
2.1. Prélèvement et stabulation des organismes	13
2.1.1. Site de prélèvement des gammares	13
2.1.2. Méthodes de prélèvement et stabulation des gammares	13
2.2. Sites d'étude et données de bio-indication	14
2.2.1. Stations étudiées	14
2.2.2. Abondances des espèces ciblées	14
2.3. Protocole d'exposition et suivi des expérimentations in situ	15
2.3.1. Mise en place des expérimentations in situ	15
2.3.2. Test d'alimentation	16
2.3.3. Test de neurotoxicité (acétylcholinestérase, AChE)	17
3. Résultats et Discussion	17
3.1. Sites d'étude et données de bio-indication	17
3.2. Toxicité	18
3.2.1. Survie	18
3.2.2. Activité acétylcholinestérase	19
3.2.3. Taux d'alimentation	19
4. Bibliographie	23
5. Table des illustrations	26
6. Annexe A : Liste des stations expérimentées	27
7. Annexe B : Conditions physico-chimiques des stations expérimentées lors des interventions à J0 et J7. La température moyenne est calculée à partir des chroniques de température des sondes immergées tout au long des expérimentations.	29

- **LIEN ENTRE LA TOXICITE, LA CONTAMINATION DES MILIEUX AQUATIQUES MESURES CHEZ *GAMMARUS FOSSARUM* ET LA PERTURBATION DES COMMUNAUTES BIOLOGIQUES – CALIBRATION DES MARQUEURS DE TOXICITE CHEZ LE GAMMARE ENCASE A L'AIDE DE LA BIO-INDICATION.**

1. Introduction

La mise en œuvre de la Directive Cadre sur l'Eau (DCE) impose de caractériser les milieux sur la base de mesures chimiques, dont les substances prioritaires, et de critères biologiques. Dans ce contexte, diverses métriques biologiques basées sur les communautés et utilisant les invertébrés, les poissons, les algues ont été développées. La surveillance des populations et des communautés aquatiques a constitué la principale démarche de l'évaluation des écosystèmes. Ces mesures ont prouvé leur utilité pour décrire l'état d'un écosystème et mettre en évidence leur perturbation, mais se montrent moins pertinentes pour identifier les causes de cette perturbation, condition nécessaire pour tous processus d'aménagement et de restauration. En effet, la structure d'une communauté est influencée par de nombreux facteurs et processus qui opèrent à différentes échelles de temps et d'espace.

La nécessité de devoir identifier l'origine d'une perturbation et de discriminer un stress d'origine physique (habitat) ou chimique (polluant) impose d'établir et de quantifier les liens existants entre cause et effet et par conséquent de revenir à des « systèmes biologiques » simplifiés (niveau biologique moins élevé) que sont la cellule ou l'organisme. Les bio-tests de laboratoire permettent d'évaluer la toxicité de compartiments environnementaux (eaux et sédiments) dans des conditions contrôlées (identiques pour tous les échantillons) et ainsi de garantir que les effets observés résultent uniquement de la présence de contaminants biodisponibles. Cependant, si les conditions contrôlées, l'emploi d'espèces modèles avec un cycle de vie bien connu et l'utilisation de méthodes standardisées sont des atouts incontestables pour une comparaison des effets observés entre échantillons, en revanche l'extrapolation et l'interprétation de ces résultats au regard de la complexité du milieu naturel se révèlent difficile, voire impossible. En effet, ces tests ne permettent pas de mimer les fluctuations naturelles de nombreuses paramètres physico-chimiques (température, pH, dureté, salinité, etc.) pouvant jouer un rôle primordial aussi bien au niveau de la sensibilité de l'organisme que de la mobilité, de la biodisponibilité et donc de la toxicité des polluants. De plus, la mise en place de méthodologies standardisées en écotoxicologie a poussé à l'utilisation d'organismes pouvant être facilement maintenus en laboratoire et donc peu exigeant, ce qui, pour certaines espèces, se traduit par une faible sensibilité aux contaminants et une forte plasticité. Enfin, la nécessité de prélever et travailler sur des échantillons environnementaux, pose des problèmes en termes de représentativité et d'intégration de possible fluctuations temporelles des apports en contaminants (pour l'eau) ou d'artéfacts liés au prélèvement et au stockage des échantillons.

Dans ce contexte et il y a une dizaine d'année, la mise en place d'approches *in situ* a reçu une attention toute particulière (Baird et al. 2007a et b; Crane et al. 2007; Liber et al. 2007; Wharfe et al. 2007). Elles permettent de limiter les artéfacts liés au prélèvement et à la manipulation des échantillons environnementaux et intègrent les fluctuations des caractéristiques physico-chimiques des milieux, mais également des apports en contaminants. Enfin, les tests *in situ* permettent de disposer d'organismes tests sur l'ensemble des sites d'intérêt et de maîtriser parfaitement le temps d'exposition et les caractéristiques biologiques de ces organismes tests, limitant ainsi la variabilité de l'accumulation et des réponses biologiques utilisées comme marqueurs de toxicité au regard de facteurs biologiques, comme le sexe, la taille, le statut reproducteur, état physiologique etc.

Cette approche par encagement a été développée il y a quelques années sur l'espèce sentinelle *Gammarus fossarum* par le laboratoire d'écotoxicologie et ceci dans le but de proposer des outils de surveillance pour le suivi de la contamination chimique (Besse et al., 2011, 2012) et de la toxicité (Xuereb et al., 2007 ; Dedourge-Geffard et al., 2009 ; Chabanne et al., 2015) des milieux aquatiques. Ces travaux ont notamment reposé sur l'étude et la formalisation de l'effet des facteurs environnementaux (i.e. température, dureté) sur les réponses étudiées et leur intégration pour la définition de valeurs de référence et seuil, au-delà desquelles une contamination ou un effet toxique est avéré (Xuereb et al., 2009 ; Coulaud et al., 2011 ; Besse et al., 2013 ; Chaumot et al., 2013 ; Geffard et al., 2014 ; Recour-Massaquant et al., 2014). La proposition de ces référentiels a permis de déployer ces outils à large échelle et de les inscrire comme méthode d'aide pour la surveillance des milieux.

Dans le cadre de nos réflexions visant à mieux comprendre et décrire l'impact de la pression chimique

sur les communautés aquatiques, nous avons très récemment étudié la possibilité d'établir de tel lien en calibrant les niveaux de contamination biodisponible à l'aide de données de bio-indication et notamment l'abondance des populations de gammares. Les travaux développés dans la première partie de cette fiche action (n°48 ; Ciliberti *et al.*, 2017 ; Geffard *et al.*, 2018) ont démontré qu'il était possible d'établir une relation entre le niveau de contamination en 3 métaux (Cd, Ni et Pb) et les abondances en gammares, ceci à partir d'une étude à large échelle sur plus de 90 stations. Récemment et dans le cadre de cette même fiche action, cette réflexion a été menée sur un jeu de données plus important, avec plus de 400 stations expérimentées et à l'aide d'un indicateur permettant d'intégrer l'ensemble des 19 métaux mesurés chez le gammaré encagé (Alric *et al.*, Soumis ; voir partie résultats – discussion).

Dans la continuité de ce que nous avons développé à partir des données d'accumulation, l'objectif de ce travail était d'établir des relations entre les réponses toxiques mesurées chez les organismes encagés et des données de bio-indication (l'abondance d'espèces), c'est-à-dire de calibrer les données de toxicité à partir de données de bio-indication obtenues dans le cadre des réseaux de surveillance. Pour ceci, nous avons conduit une campagne d'expérimentation *in situ* sur plus de soixante stations afin d'acquérir de la données d'écotoxicité à l'échelle nationale. Cette campagne de mesures a été soustraite à la société Biomae, spin off d'Irstea qui commercialise et met en place des bioessais de terrain à partir du savoir-faire et des méthodes transférées d'Irstea.

2. Matériel et méthodes

2.1. Prélèvement et stabulation des organismes

2.1.1. Site de prélèvement des gammares

Les gammares ont été prélevés dans le site de production extensif (élevage de la population de référence GAMMAREF®) de BIOMÆ. Cet élevage est situé à Saint Maurice-de-Rémens dans le département de l'Ain (Coordonnées GPS : N 45°57'27.6120", E 5°15'43.6392")(Figure 1). Les gammares sont élevés en méthode semi-extensif dans de grands bassins, alimentés par une eau de source. La source est alimentée par la nappe de la basse vallée de l'Ain.

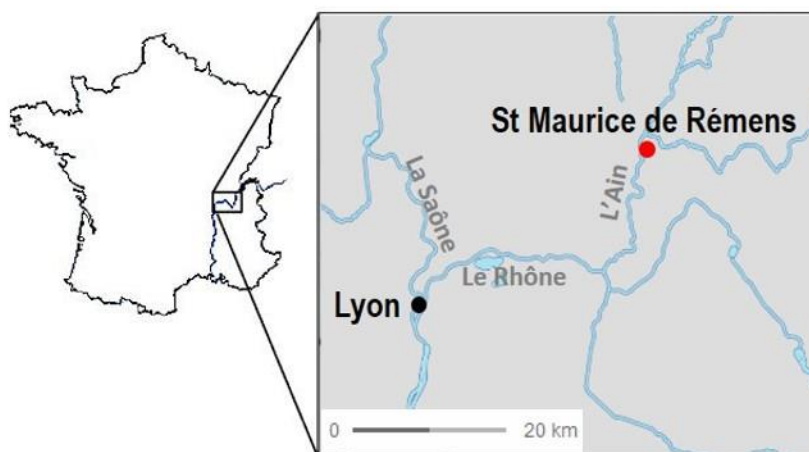


Figure 1 : Localisation du site de production à St Maurice de Rémens

2.1.2. Méthodes de prélèvement et stabulation des gammares

Les gammares ont été prélevés à l'aide d'un filet de type troubleau, puis tamisés (mailles de 2,0 et de 2,5 mm) afin de présélectionner les individus adultes à la taille souhaitée. Ils ont ensuite été rapidement transportés dans des glacières au laboratoire de BIOMÆ. Les organismes ont ensuite été maintenus en stabulation en conditions contrôlées pendant 13 jours +/- 2 dans des aquariums de 30 L, sous aération constante, une eau maintenue à une température de $12,0 \pm 0,5^{\circ}\text{C}$ et à une photopériode de 14 h de jour / 10 h de nuit.

Les organismes ont été acclimatés à différentes conductivités (entre 200 et 500 $\mu\text{S}/\text{cm}$). Le choix de la conductivité dépend de celle des sites d'étude sélectionnés, en fonction des prospections sur les

données physico-chimiques qui ont été réalisées en amont des expérimentations (base de données [Naiades](#)).

Les gammares ont été nourris à l'aide de feuilles d'aulne (*Alnus glutinosa*) récoltées sur un site de référence dans le Nord Isère. Une fois par semaine, les organismes ont reçu comme supplément protéique 500 mg par aquarium de vers lyophilisés de *Tubifex* sp.

2.2. Sites d'étude et données de bio-indication

2.2.1. Stations étudiées

Pour cette étude, soixante-quatre stations réparties à l'échelle nationale ont été sélectionnées (Figure 2). La base de données ainsi formée repose sur un travail expérimental de terrain (encagement de gammares) mené entre septembre 2017 et avril 2018. Toutes les stations ont été expérimentées dans le cadre de la fiche-action 48, quarante-huit stations en 2017 et seize stations au cours de l'année 2018. Ces stations font partie, des réseaux de contrôle de surveillance (RCS) et/ou des réseaux de contrôle opérationnel (RCO). La dénomination et la localisation des stations sont synthétisées en annexe A. Les caractéristiques physico-chimiques des eaux sur ces diverses stations sont présentées en annexe B.

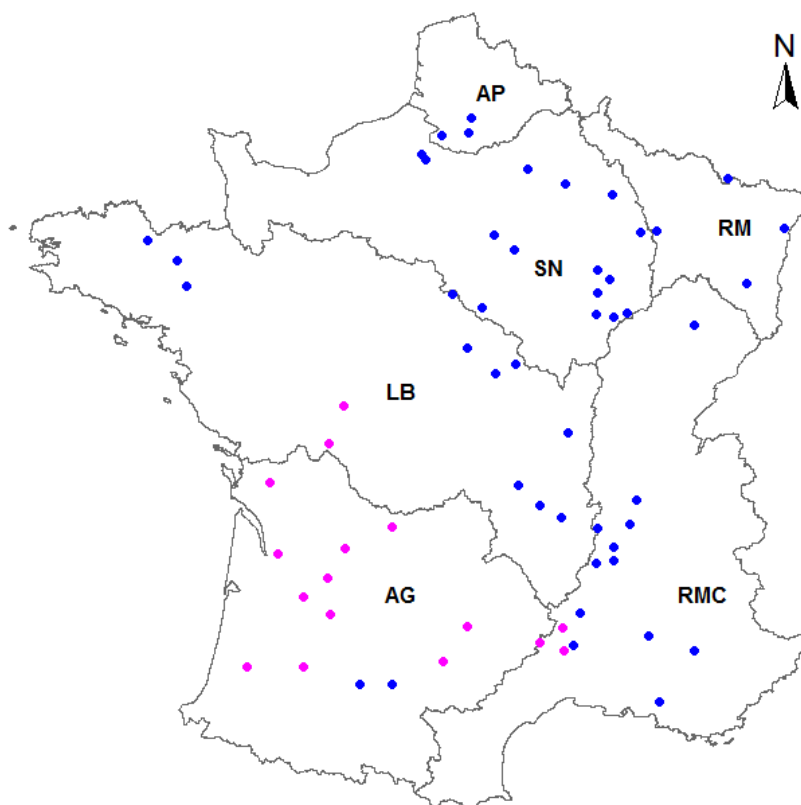


Figure 2 : Localisation géographique des sites étudiés. Les points bleus et roses correspondent aux stations expérimentées respectivement en 2017 et 2018 dans le cadre de la fiche-action 48. Les délimitations géographiques sur la carte représentent les limites de six agences régionales françaises de l'environnement : Adour-Garonne (AG), Artois-Picardie (AP), Loire-Bretagne (LB), Rhin-Meuse (RM), Rhône-Méditerranée-Corse (RMC).

2.2.2. Abondances des espèces ciblées

Pour calibrer les mesures de toxicité, la survie, l'activité AchE et le taux d'alimentation, à l'aide de données d'abondance de populations, nous avons focalisés notre approche sur six familles de macro-invertébrés : Baetidés, Chironomidés, Ephemeridés, Gammaridés, Hydrobiidés et Hydropsychidés. Ces familles de macroinvertébrés largement réparties, à l'échelle nationale, ont été sélectionnées parce qu'elles ont montré des sensibilités toxicologiques contrastées dans la littérature.

d'écotoxicologie (Wogram et Liess, 2001, Von der Ohe et Liess, 2004, Malaj *et al.*, 2012). Les abondances des populations de ces six familles de macro-invertébrés ont été déterminées à l'aide des données de bio-indication obtenues lors de la surveillance réglementaire imposée par la DCE pour les années allant de 2011 à 2017. Un protocole de prélèvement normalisé (XP T 90-333 AFNOR, 2009) est utilisé pour échantillonner les communautés de macro-invertébrés. Brièvement, en conditions de faibles débits, 12 prélèvements sont réalisés sur des mésohabitats prédéfinis à l'aide d'un Surber normalisé (surface de 0.05 m², ouverture de maille de 500 µm). Ces échantillons sont répartis uniformément en trois groupes selon leurs habitats associés. Le groupe A comprend les 4 échantillons réalisés sur les « habitats marginaux » ayant une capacité d'accueil élevée. Les 8 autres échantillons sont réalisés sur les « habitats majeurs ». Quatre d'entre eux, les plus biogènes sont regroupés pour constituer le groupe B, alors que les 4 derniers constituent le groupe C. A partir de ces échantillons, les macro-invertébrés ont été classés, comptés et identifiés au niveau taxonomique normalisé (XP T 90-388 AFNOR, 2010).

Evaluer une dégradation possible de l'abondance des populations de macro-invertébrés locales est basée sur la définition de niveaux de référence, correspondant aux niveaux d'abondances observées sur divers bassins versants non impactés. Les abondances des six familles de macro-invertébrés enregistrées dans les 64 stations sont alors pondérées par ces niveaux de références. Suivant la procédure appliquée par Ciliberti *et al.* (2017), les stations ont été regroupées selon la typologie physico-chimique utilisée sur le territoire Français pour classer les cours d'eaux en tenant compte de l'alcalinité, de l'altitude et la quantité en nutriments (Bougon et Ferréol, 2011). Six classes composent cette typologie et se regroupent selon les eaux à fortes dureté (H1, H2 et H3) et les eaux à faible dureté (S1, S2 et S3). Les niveaux de référence des valeurs d'abondance pour une famille donnée ont été déterminés comme le 95^{ème} percentile de l'abondance de chaque population de macro-invertébrés calculé sur les 3127 opérations réalisées entre 2005 et 2013 sur les 392 sites constituant le réseau national français de référence. Ensuite, les abondances ont été exprimées à l'échelle de la famille, en faisant la somme des abondances des genres constituant chaque famille de macro-invertébré.

2.3. Protocole d'exposition et suivi des expérimentations *in situ*

2.3.1. Mise en place des expérimentations in situ

Les organismes ont été triés de manière à sélectionner les organismes tests pour chaque bioessai en fonction de leur taille et de leur sexe. Seuls des gammares matures ont été utilisés pour les expérimentations (poids moyen compris entre 3,6 à 4,8 mg de poids sec). Le Tableau 1 présente les organismes et les conditions de nourriture utilisés pour chaque bioessai.

Tableau 1 : Contenu des cages pour les différents bioessais

Bioessais	Nourriture	Organismes d'essai
neurotoxicité	feuilles d'Aulne	mâles de taille homogène
alimentation	disques de feuilles d'Aulne	mâles de taille homogène

Les gammares sont encagés dans des cylindres en polypropylène (hauteur : 11 cm ; diamètre : 5 cm) percés au laser de trous de 500 µm de diamètre pour garantir une libre circulation de l'eau (Figure 3 **Erreur ! Source du renvoi introuvable.** **Erreur ! Source du renvoi introuvable.** **Erreur ! Source du renvoi introuvable.**). Les cages sont conditionnées dans des fûts contenant de l'eau de forage (Figure 4 **Erreur ! Source du renvoi introuvable.**). Ces fûts sont transportés en glacière sur les sites d'étude et les gammares sont maintenus à une température égale à 10 ± 4°C et oxygénés avec des pompes autonomes d'aération (Figure 5).



Figure 3: Cylindres en polypropylène utilisés pour l'encagement de gammares



Figure 4 : Cages conditionnées en fûts de transport prêtes à l'envoi sur les sites d'étude



Figure 5 : Fûts de transport oxygénés et thermorégulés en glacière

Dans la rivière, les cages sont protégées par un système d'immersion (Figure 6). Celui-ci est placé dans le cours d'eau, face au courant, sans distinction de rives. Il est déposé directement sur le fond du cours d'eau ou à 30 cm maximum, au bout d'un câble relié à la rive en veillant à ce qu'il n'y ait pas de risque d'exondation. Le système d'immersion posé est exposé dans une zone à courant et est lesté pour éviter qu'il ne se retrouve hors d'eau (Figure 7).



Figure 6 : Transplantation *in situ* des cages sur site d'étude



Figure 7 : Système d'immersion contenant les cages de gammares

Les gammares sont transplantées en rivière pendant 7 jours. Ils ont été nourris durant toute la durée des expérimentations *in situ* en plaçant dans chaque système des feuilles d'aulne (*A. glutinosa*, les mêmes que celles utilisées en laboratoire). Pour le bioessai d'alimentation, la quantité de nourriture est calibrée en plaçant des disques de feuilles d'aulne de surface précise.

Des sondes (Tinytag Aquatic 2 Logger®) fixées aux systèmes d'immersion ont assuré la mesure de la température toutes les heures, durant toute l'expérimentation, de la mise en cage jusqu'à l'échantillonnage des organismes, après retour au laboratoire.

Enfin, la température de l'eau, la conductivité, la concentration en oxygène et le pH ont été mesurés *in situ* à chaque intervention sur site (pose et récupérations des cages).

2.3.2. Test d'alimentation

La mesure de l'alimentation est basée sur l'étude de la consommation sur 20 disques de feuilles d'aulnes (*A. glutinosa*) pendant 7 jours par des gammares mâles de taille calibrée. Suite à l'exposition et la récupération des organismes, les individus vivants ont été comptés au laboratoire et les résidus de disques de feuille ont été échantillonnés et stockés dans un réfrigérateur pendant 6 mois maximum. La surface des résidus a ensuite été photographiée, scannée et mesurée à l'aide d'un logiciel d'analyse d'image. Le taux d'alimentation est calculé à partir de la surface totale de disques consommée en mm², du taux de survie et de la température moyenne d'exposition. Le taux d'alimentation est exprimé en mm² consommés par jour et par gammare (mm²/j/individu) (Coulaud et al., 2011).

Le taux d'alimentation est calculé à partir de 4 réplicats. La valeur moyenne est comparée à la valeur seuil de référence, correspondant à la consommation attendue en milieu non contaminé et pour les conditions de température observées sur la station de mesure (Coulaud *et al.*, 2011). Cette différence est exprimée en pourcentage d'inhibition (FI).

2.3.3. Test de neurotoxicité (acétylcholinestérase, AChE)

Le test de neurotoxicité est basé sur la mesure de l'activité acétylcholinestérase chez des gammarus mâles de taille calibrée exposés pendant 7 jours. Suite à l'exposition, les organismes ont été poolés, disposés dans des cryotubes par lot de 5, pesés, puis congelés à l'azote liquide et stockés dans un congélateur -80°C. Les échantillons ont ensuite été broyés dans du tampon d'extraction. Les homogénats obtenus sont centrifugés à 9 000 x g durant 15 min, à 4 °C et le surnageant a été récupéré (i.e., fraction S9). Le dosage de l'activité AChE a été réalisé selon une méthode colorimétrique (Xuereb *et al.*, 2007). Les mesures d'activité ont été réalisées en microplaques de 96 puits. L'absorption du TNB formé au cours de la réaction est enregistrée toutes les 30 s durant 6 min à 25 °C à l'aide d'un spectrophotomètre. Seules les valeurs situées dans la phase d'augmentation linéaire de DO sont utilisées pour calculer la cinétique d'absorption (i.e., Δ absorbance). Des triplicats de mesures ont été effectués pour chaque échantillon testé. Lorsque le coefficient de variation entre triplicats est supérieur à 20 %, l'échantillon est analysé une nouvelle fois. La présence, dans la fraction S9, de composés possédant des groupements thiols est également systématiquement évaluée au moyen de blancs sans ester de thiocholine. Dans le cadre de cette étude, l'activité enregistrée dans les blancs a toujours été inférieure à 0.03 nmol.min⁻¹. La limite de détection des activités AChE chez *Gammarus*, selon la méthode décrite, est de 0.1 nmol.min⁻¹.

L'activité AChE est exprimée en nmol/min et correspond à la moyenne des valeurs obtenues pour chaque réplicat. Elle est ensuite comparée à la valeur de référence, qui correspond à l'activité attendue en milieu non contaminé (Xuereb *et al.*, 2007)

3. Résultats et Discussion

3.1. Sites d'étude et données de bio-indication

Les 64 sites retenus dans cette étude ont été caractérisés par leur typologie. La Figure 8 montre que les sites étudiés présentent une très grande diversité de contextes et que toutes les classes des variables descriptives retenues sont représentées, c'est-à-dire avec une occurrence supérieure à 5%, excepté le groupe des grands cours d'eau. Les proportions des sites dans les diverses classes du groupe « occupation des sols » et du groupe « état écologique » sont similaires à celles observées sur le réseau de surveillance national. Le type « grand cours d'eau » a été sous représenté dans cette étude, alors que le type « petit » cours d'eau est surreprésenté.

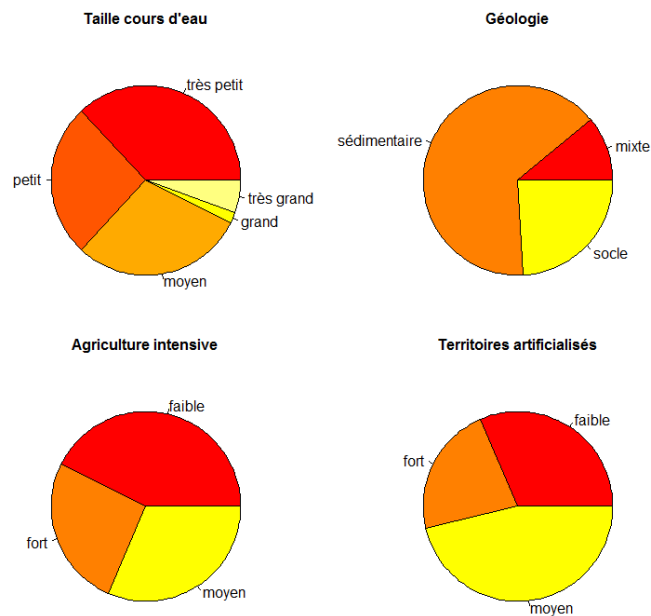


Figure 8 : Distribution des 64 sites étudiés dans les différentes classes des 4 variables descriptives retenues.

3.2. Toxicité

3.2.1. Survie

Les taux de survie obtenus dans le cadre de ce travail sont présentés dans la Figure 9. Aucune toxicité aigüe a été observée, avec des taux compris entre 75 et 98 %. Ainsi le jeu de données construit à partir de ce travail ne permet pas d'obtenir une gamme de toxicité suffisamment large pour calibrer ces résultats à l'aide de données de bio-indication et notamment des abondances observées pour les 6 familles retenues. Pour ceci, il sera nécessaire d'ouvrir et d'enrichir cette base et d'y intégrer des stations pour lesquelles les taux de survie seront clairement impactés. Ceci pourra être fait en intégrant les données qui seront prochainement disponibles au travers des marchés réalisés par les agences de l'eau.

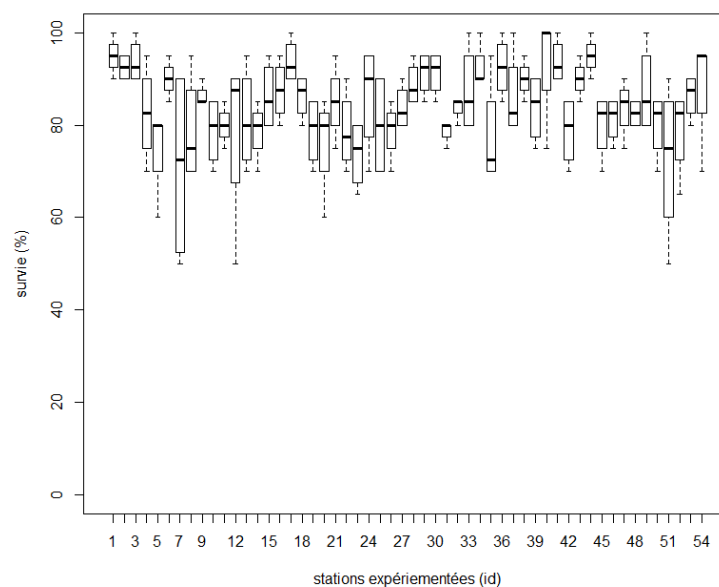


Figure 9 : Taux de survie (exprimé en pourcentage, n=4) observé sur les 64 sites expérimentés dans le cadre de ce travail.

3.2.2. Activité acétylcholinestérase

La Figure 10 présente les activités AChE mesurées sur les gammares encagés. Comme pour la survie, très peu d'effets ont été observés, avec seulement une station présentant une activité inférieure à la valeur seuil. Ces travaux sont en accord avec les résultats observés dans divers projets, comme dans le cadre d'écophyto, où le pourcentage de sites pour lesquels une inhibition significative de l'activité AChE est observée, reste très faible. Ainsi et dans ces conditions, il ne sera pas possible de calibrer les données à l'aide de données de bio-indication et de rechercher s'il peut exister un lien entre une exposition aux insecticides et un impact sur les populations du milieu. Pour ceci, il sera nécessaire d'introduire plus de stations sur lesquels une pression avérée par les insecticides est présente.

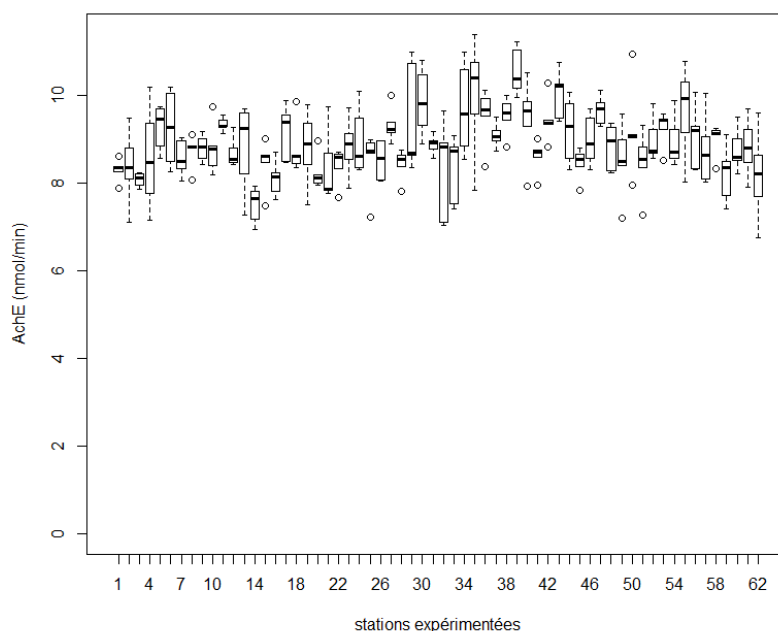


Figure 10 : Activité acétylcholinestérase (AChE, exprimée en nmol/min, n=4) mesurée chez les gammares encagés sur les 64 sites retenus dans le cadre de ce travail.

3.2.3. Taux d'alimentation

La dernière réponse étudiée dans le cadre ce travail est le taux d'alimentation, qui est un marqueur de toxicité dit « global », c'est-à-dire qui répond ou est modulé par une large gamme de contaminants, inorganiques et organiques. Les pourcentages d'inhibition du taux d'alimentation observés chez les organismes exposés sur les 64 sites d'intérêt sont présentés dans la Figure 11. Contrairement aux autres réponses étudiées, ces résultats montrent une très large gamme d'inhibition du taux d'alimentation, comprises entre 0 et 80%. Ces résultats sont en accord avec les observations que l'on a pu faire dans le cadre d'autres projets comme écophyto et de résultats précédemment publiés (Coulaud *et al.*, 2011). Les données se répartissent dans les 5 gammes de toxicité (couleurs). Quinze pourcents des sites présentent un niveau de contamination très fortement toxique. Ces travaux confirment que la mesure du taux d'alimentation chez cette espèce est une réponse sensible et qui permet facilement de discriminer les sites selon leur niveau de toxicité.

Les données obtenues ont pu être utilisées pour construire une relation avec l'abondance des populations pour les 6 familles sélectionnées. Les résultats, présentés dans la Figure 12, montrent qu'il existe une relation entre l'abondance des populations pour chacune des familles et le taux d'inhibition de l'alimentation. Il est possible d'observer un taux d'inhibition de l'alimentation au-delà duquel l'abondance est anormalement réduite. Bien que ces observations devront être confortées et affinées à partir de jeux de données plus importants, ce qui sera normalement bientôt possible à l'aide des données obtenues via les marchés réalisés par les agences de l'eau, ces travaux montrent clairement qu'il est possible de calibrer une réponse écotoxicologique à partir de données écologiques et ainsi de pouvoir interpréter les réponses individuelles, obtenues par encagement, en terme de danger pour les populations présentes. Ce type de résultats et travaux offre de nouvelles perspectives

et de nouveaux intérêts dans l'utilisation des outils écotoxicologiques pour le diagnostic et la gestion des milieux. De façon complémentaire à l'approche *a priori*, comme la SSD (Species Sensitivity Distribution), ce travail montre l'intérêt et la possibilité d'utiliser / exploiter les outils de diagnostic (*a posteriori*) menés dans les milieux par biomonitoring actif pour mieux qualifier et évaluer le danger de la contamination chimique sur les communautés.

La Figure 12 montre également qu'il est possible d'observer une réponse plus ou moins précoce selon la famille considérée. Par exemple, pour les familles des gammaridés, hydrobidés et epheméridés, connues pour être plus sensibles, notamment à la contamination métallique, aucune abondance normale a été observée pour les stations se trouvant dans la gamme de réponse rouge, alors que pour les trois autres familles (baetidés, chironomidés et ydropsychidés), des abondances normales sont observées pour des taux d'inhibition alimentaires compris entre 50 et 60%, même si ensuite elles s'écroulent. Ces résultats montrent qu'il sera possible de traduire les réponses toxiques, obtenues au travers d'organismes encagés, en pourcentage de familles en danger vis-à-vis de la contamination d'un milieu considéré.

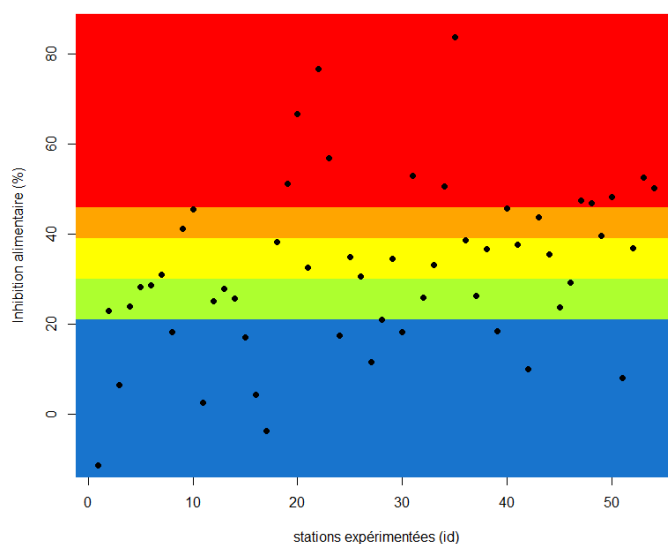


Figure 11 : Inhibition du taux d'alimentation (exprimée en %, $n = 4$) observée chez les gammares encagés sur les 64 stations étudiées dans le cadre de ce projet. Les taux d'inhibition sont représentés au regard des seuils de gravité définis dans notre précédent rapport de la fiche 48 (Geffard et al., 2009b). Zone bleue : l'eau est non toxique ; zone verte : l'eau présente une contamination très faiblement toxique ; zone jaune : l'eau présente une contamination modérément toxique ; zone orange : l'eau présente une contamination fortement toxique et zone rouge : l'eau présente une contamination très fortement toxique

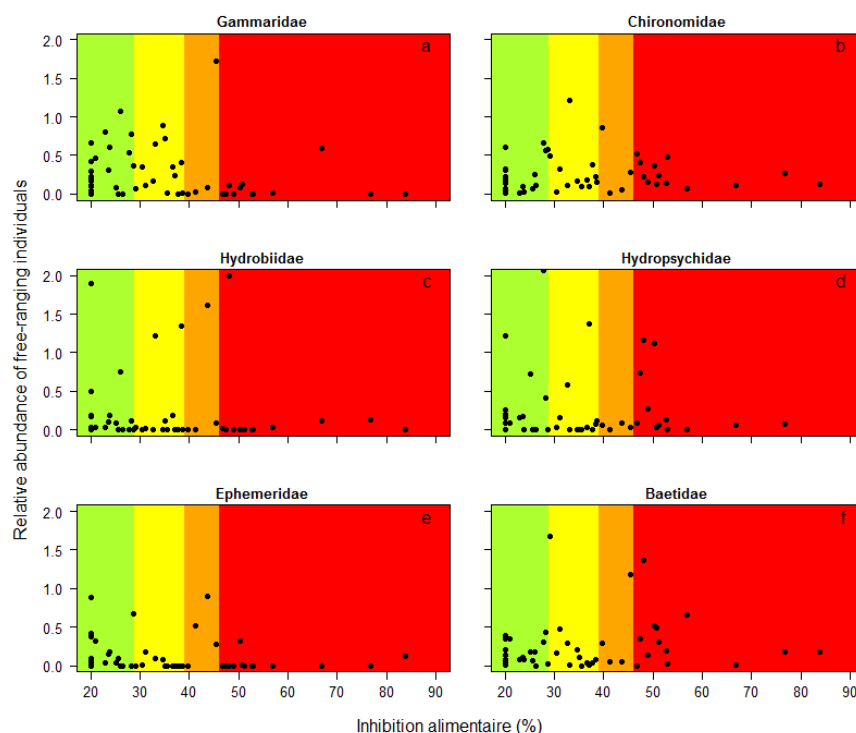


Figure 12 : Relation entre l'abondance de macro-invertébrés (corrigée selon la typologie physico-chimique) et les inhibitions d'alimentation observées chez les organismes encagés pour les six familles de macro-invertébrés a) Gammaridés, b) Chironomidés, c) Hydrobiidés, d) Hydropsychidés, e) Ephemeridés et f) Baetidés. Les couleurs correspondent aux seuils de gravité définis pour ce marqueur de toxicité. Zone verte : l'eau présente une contamination très faiblement toxique ; zone jaune : l'eau présente une contamination modérément toxique ; zone orange : l'eau présente une contamination fortement toxique et zone rouge : l'eau présente une contamination très fortement toxique. Pour cette calibration, seules les stations pour lesquelles une inhibition significative du taux d'alimentation a été observée, ont été utilisées

Cette démonstration de différence de sensibilité entre familles a également été faite dans le cadre des travaux de Alric *et al.*, (soumis) en considérant le niveau de contamination métallique des milieux au travers des teneurs accumulées dans les gammars encagés. La Figure 13 présente la distribution des abondances des populations des 6 familles retenues en fonction du niveau de contamination des milieux. Comme pour l'inhibition alimentaire et de façon plus marquée, ces résultats montrent qu'il existe une relation entre l'abondance et le niveau de contamination métallique des milieux, c'est-à-dire un niveau de contamination biodisponible au-delà duquel les abondances observées sont anormalement faibles. De la même façon, on observe que les profils de ces relations sont différents selon les familles, permettant, à partir d'une approche de diagnostic *a posteriori*, d'établir ou de confirmer des différences de sensibilité aux métaux. Les résultats montrent que les familles de Gammaridés, Ephemeridés et dans une moindre mesure Hydrobiidés sont plus sensibles à la pression métallique que les familles de Chironomidés, Hydropsychidés et Baetidés.

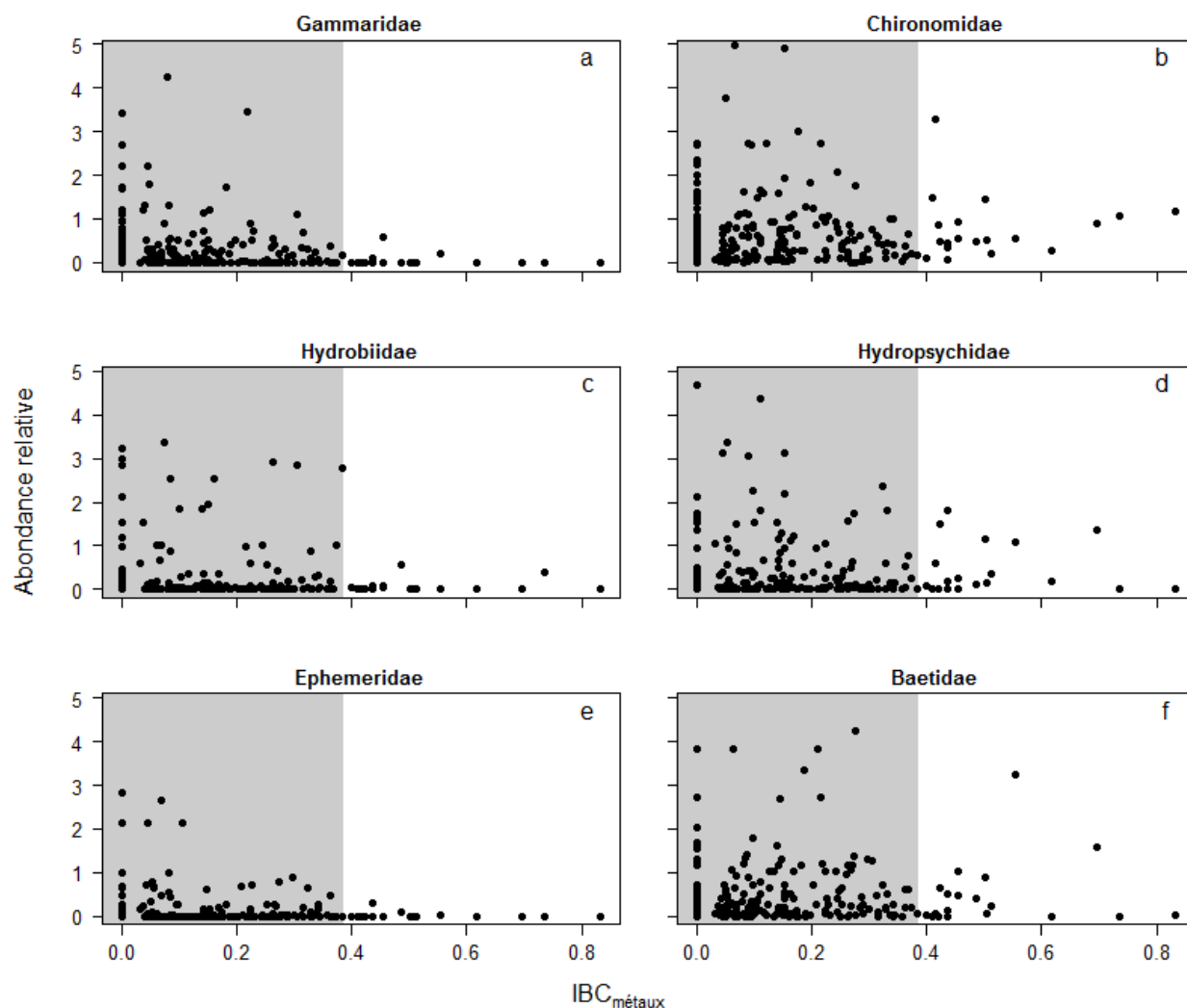


Figure 13 : Relation entre l'abondance de macro-invertébrés (corrigée selon la typologie physico-chimique) et la contamination métallique biodisponible exprimée à partir du calcul de l'IBC_{métaux} –(Geffard et al., 2019c) pour les six familles de macro-invertébrés a) Gammaridae, b) Chironomidae, c) Hydrobiidae, d) Hydropsychidae, e) Ephemeridae et f) Baetidae. Les points dans la partie blanche du graphique présentent une valeur de contamination par les métaux supérieures au 90^{ème} percentile de la distribution des valeurs obtenues avec l'IBC_{métaux}. IBC_{métaux} correspond à l'indicateur multi-contaminants défini dans nos précédents travaux (Geffard et al., 2019c).

4. Bibliographie

- Alric, B., Geffard, O., Chandesris, A., Ferreol, M., François, A., Perceval, O., Piffady, J., Villeneuve, B., Chaumot, A. Proposal of multi-substance indicators of aquatic bioavailable contamination: relevance of bioaccumulation data in caged sentinel organisms for chemical and ecological survey at large geographical scale. *Environmental Science & Technology*, soumis.
- Baird DJ, Brown SS, Lagadic L et al (2007a) *In situ*-based effects measures: determining the ecological relevance of measured responses. *Int Environ Assess Manag* 3: 259–267
- Baird DJ, Burton AG, Culp JM et al (2007b) Summary and recommendations from a SETAC Pellston workshop on *in situ* measures of ecological effects. *Int Environ Assess Manag* 3: 275–278.
- Besse, J.P., Geffard, O., Coquery, M. 2011. Développement d'une méthodologie pour l'amélioration du suivi chimique des eaux continentales - Etat de l'art sur les approches de biosurveillance et application dans le cadre de la DCE. Cemagref-Irstea, 100 p.
- Besse, J.P., Geffard, O., Coquery, M. 2012. Relevance and applicability of active biomonitoring in continental waters under the Water Framework Directive. *Trends in Analytical Chemistry*, 36: 113-127.
- Besse, J.P., Coquery, M., Lopes, C., Chaumot, A., Budzinski, H., Labadie, P., Geffard O. 2013. Caged *Gammarus fossarum* (crustacea) as a robust tool for the characterization of bioavailable contamination levels in continental waters. Toward the determination of threshold values. *Water Research*, 47: 650-660.
- Bougon, N, & Ferréol, M. (2011). Physico-Chimie soutenant la biologie. Typologie chimique nationale des cours d'eau. Irstea, 39 pp
- Chabanne, Q., Chaumot, A., Coquery, M., François, A., Geffard, O., Lebrun, J.D., Noury, P., Queau, H., Recoura-Massaquant, R., Urien, N., Vigneron, A. 2015. Développement d'une méthodologie pour l'amélioration du suivi chimique des eaux continentales - Proposition d'indicateurs chimiques et toxicologiques utilisant le gammare : importance de l'espèce et de la population utilisée. 41 p.
- Chaumot A., Coulaud R. Lopes C., Queau H, François A., Geffard O. 2013. Modélisation pour l'interprétation des réponses individuelles mesurées lors de tests de toxicité *in situ*. 29 p.
- Coulaud R., Geffard O., Xuereb B., Lacaze E., Quéau H., Garric J., Charles S., 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(19): 6417-6429
- Crane M, Burton GA, Culp JM et al (2007) Review of aquatic *in situ* approaches for stressor and effect diagnosis. *Int Environ Assess Manag* 3: 234–245.
- Dedourge-Geffard O., Palais F., Biagianti-Risbourg S., Geffard O., Geffard A. 2009. Effects of metals on feeding rate and digestive enzymes in *Gammarus fossarum* : an *in situ* experiment. *Chemosphere* 11: 1569-1576.
- Geffard, O., Besse, J.P., A. Chaumot, A. François, R. Recoura-Massaquant, C. Lopes, J. Gahou, G. Grisot, M. Coquery (2014). Rapport de synthèse de l'étude pilote : déploiement de l'outil gammare encagé au niveau national, résultats pour les métaux ciblés. Rapport IRSTEA-ONEMA, 60p.
- Liber K, Goodfellow W, den Besten P et al (2007) *In situ*-based effects measures: considerations for improving methods and approaches. *Int Environ Assess Manag* 3: 246–258.
- Malaj, E., Grote, M., Schäfer, R. B., Brack, W., & Von der Ohe, P. C. (2012). Physiological sensitivity of freshwater macroinvertebrates to heavy metals. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 31, 1754–1764.

- Recour-Massaquent, R., Geffard, O., Besse, J.P., Chaumot, A., Francois, A., Lopes, C., Miede, C., Roussel-Galle, A., Serveto, F., Coquery, M. 2014. Développement d'une méthodologie pour l'amélioration du suivi chimique des eaux continentales. Rapport de synthèse de l'étude pilote : déploiement de l'outil gammare encagé au niveau national, résultats pour les substances organiques ciblées. 66 p.
- Von der Ohe, P. C., & Liess, M. (2004). Relative sensitivity distribution of aquatic invertebrates to organic and metal compounds. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 23, 150–156.
- Wharfe J, Adams W, Apitz SE et al (2007) *In situ* methods of measurement – An important line of evidence in the environmental risk framework. *Int Environ Assess Manag* 3: 268–274.
- Wogram, J., & Liess, M. (2001). Rank ordering of macroinvertebrate species sensitivity to toxic compounds by comparison with that of *Daphnia magna*. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 67, 360–367.
- Xuereb B, Noury P, Felten V, Garric J, Geffard O. 2007. Cholinesterase activity in *Gammarus pulex* (Crustacea Amphipoda): Characterization and effects of chlorpyrifos. *Toxicology*, 236: 178-189.
- Xuereb B, Chaumot A, Mons R, Garric J, Geffard O. 2009. Acetylcholinesterase activity in *Gammarus fossarum* (Crustacea Amphipoda): Intrinsic variability, reference levels, and a reliable tool for field surveys. *Aquatic Toxicology*, 93: 225-233.

5. Table des illustrations

Figure 1 : Localisation du site de production à St Maurice de Rémens.....	13
Figure 2 : Localisation géographique des sites étudiés. Les points bleus et roses correspondent aux stations expérimentées respectivement en 2017 et 2018 dans le cadre de la fiche-action 48. Les délimitations géographiques sur la carte représentent les limites de six agences régionales françaises de l'environnement : Adour-Garonne (AG), Artois-Picardie (AP), Loire-Bretagne (LB), Rhin-Meuse (RM), Rhône-Méditerranée-Corse (RMC).....	14
Figure 3: Cylindres en polypropylène utilisées pour l'encagement de gammares.....	16
Figure 4 : Cages conditionnées en fûts de transport prêtes à l'envoi sur les sites d'étude	16
Figure 5 : Fûts de transport oxygénés et thermorégulés en glacière.....	16
Figure 6 : Transplantation in situ des cages sur site d'étude	16
Figure 7 : Système d'immersion contenant les cages de gammares	16
Figure 8 : Distribution des 64 sites étudiés dans les différentes classes des 4 variables descriptives retenues.	18
Figure 9 : Taux de survie (exprimé en pourcentage, n=4) observé sur les 64 sites expérimentés dans le cadre de ce travail.	18
Figure 10 : Activité acétylcholinestérase (AChE, exprimée en nmol/min, n=4) mesurée chez les gammares encagés sur les 64 sites retenus dans le cadre de ce travail.	19
Figure 11 : Inhibition du taux d'alimentation (exprimée en %, n = 4) observée chez les gammares encagés sur les 64 stations étudiées dans le cadre de ce projet. Les taux d'inhibition sont représentés au regard des seuils de gravité définis dans notre précédent rapport de la fiche 48 (Geffard et al., 2009b). Zone bleue : l'eau est non toxique ; zone verte : l'eau présente une contamination très faiblement toxique ; zonejaune: l'eau présente une contamination modérément toxique ; zone orange : l'eau présente une contamination fortement toxique et zone rouge : l'eau présente une contamination très fortement toxique	20
Figure 12 : Relation entre l'abondance de macro-invertébrés (corrigée selon la typologie physico-chimique) et les inhibitions d'alimentation observées chez les organismes encagés pour les six familles de macro-invertébrés a) Gammaridés, b) Chironomidés, c) Hydrobiidés, d) Hydropsychidés, e) Ephemeridés et f) Baetidés. Les couleurs correspondent aux seuil de gravité définis pour ce marqueur de toxicité. Zone verte : l'eau présente une contamination très faiblement toxique ; zonejaune: l'eau présente une contamination modérément toxique ; zone orange : l'eau présente une contamination fortement toxique et zone rouge : l'eau présente une contamination très fortement toxique. Pour cette calibration, seules les stations pour lesquelles une inhibition significative du taux d'alimentation a été observée, ont été utilisée	21
Figure 13 : Relation entre l'abondance de macro-invertébrés (corrigée selon la typologie physico-chimique) et la contamination métallique biodisponible exprimée à partir du calcul de l'IBCMétaux –(Geffard et al., 2019c) pour les six familles de macro-invertébrés a) Gammaridae, b) Chironomidae, c) Hydrobiidae, d) Hydropsychidae, e) Ephemeridae et f) Baetidae. Les points dans la partie blanche du graphique présentent une valeur de contamination par les métaux supérieures au 90 ^{ème} percentile de la distribution des valeurs obtenues avec l'IBCMétaux. IBCMétaux correspond à l'indicateur multi-contaminants défini dans nos précédent travaux (Geffard et al., 2019c).....	22
Tableau 1 : Contenu des cages pour les différents bioessais.....	15

6. Annexe A : Liste des stations expérimentées

id	Code station	Nom_site	Date lancement	Date récupération	Longitude	Latitude
1	1133000	Ancre à Bonnay	19/10/2017	27/10/2017	665071	6981744
2	1134500	Avre à Moreuil	19/10/2017	27/10/2017	662269	6963725
3	1138300	Evoissons à Bergicourt	20/10/2017	28/10/2017	629585	6961717
4	2018780	Petite Fecht à Stosswihr	17/10/2017	25/10/2017	1002465	6780412
5	2037500	Souffel à Mundolsheim	18/10/2017	26/10/2017	1048030	6848205
6	2103800	Rosselle à Petite-Rosselle	18/10/2017	26/10/2017	979432	6908069
7	2107900	Méholle à Void Vacon	27/09/2017	05/10/2017	892258	6843657
8	3001000	Seine à Nod-sur-Seine	28/09/2017	06/10/2017	817677	6741593
9	3006271	Groème à Terrefondrée	28/09/2017	06/10/2017	839771	6738161
10	3006590	Ource à Autricourt	28/09/2017	06/10/2017	820426	6767715
11	3013345	Méances à Chalmaison	26/09/2017	04/10/2017	717637	6820621
12	3014130	Aube à Auberive	27/09/2017	05/10/2017	855790	6743970
13	3016840	Landion à Argançon	27/09/2017	05/10/2017	819110	6795752
14	3022000	Aujon à Longchamp-sur-Aujon	28/09/2017	06/10/2017	834197	6785239
15	3052338	Puiseaux à Nogent sur Vernisson	26/09/2017	04/10/2017	678555	6751035
16	3078110	Yerres à Courtomer	26/09/2017	04/10/2017	692886	6838979
17	3099490	Ornain à Givrauval	27/09/2017	05/10/2017	871942	6843184
18	3145880	Auve à Sainte-Menehould	27/09/2017	05/10/2017	837812	6888295
19	3160000	Vesle à Taissy	27/09/2017	05/10/2017	779811	6902310
20	3162000	Vesle à Chassemy	26/09/2017	04/10/2017	734852	6919446
21	3174695	Mésangueville à Dampierre-en-Bray	19/10/2017	27/10/2017	604896	6937872
22	3174825	Auchy à Ferrières-en-Bray	20/10/2017	28/10/2017	608847	6931924
23	4009250	Mare à Gumières	25/09/2017	03/10/2017	775447	6493314
24	4019700	Bourbince à Vitry-en-Charolais	25/09/2017	03/10/2017	782782	6597430
25	4025040	Nièvre à Dompierre-sur-Nièvre	25/09/2017	03/10/2017	718939	6681860
26	4034650	Bedat à Saint-Laure	25/09/2017	03/10/2017	722875	6533430
27	4037900	Dore à Olliergues	25/09/2017	03/10/2017	749056	6508590
28	4046545	Vauvise à Jussy le Chaudrier	25/09/2017	03/10/2017	694744	6669900
29	4050100	Oussance à Ingrannes	26/09/2017	04/10/2017	642369	6766496
30	4068483	Layon à Ivoy-le-pré	25/09/2017	03/10/2017	660698	6700370
31	4082550	Clain à Anche	05/03/2018	13/03/2018	490125	6584030
32	4085500	Clain à Naintré	05/03/2018	13/03/2018	509080	6631020
33	4164758	Rance à Eréac	03/11/2017	11/11/2017	304456	6807991
34	4170500	Gouet à Saint-Julien	03/11/2017	11/11/2017	268937	6832116
35	4199370	Aff à Paimpont	03/11/2017	11/11/2017	315430	6777126
36	5006880	Bramerit en aval de Grandjean	06/03/2018	14/03/2018	417359	6535920
37	5025830	Colinet à Cézac	07/03/2018	15/03/2018	427348	6449520
38	5039000	Isle à Razac	06/03/2018	14/03/2018	510935	6455400
39	5042080	Auvezère à Ségur-le-Château	06/03/2018	14/03/2018	567693	6482460
40	5047000	Dordogne en aval de Bergerac	07/03/2018	15/03/2018	489203	6419170
41	5079100	Dropt à Loubens	07/03/2018	15/03/2018	459459	6397160
42	5083585	Tolzac à Vares	07/03/2018	15/03/2018	492143	6374720
43	5118000	Arrats à Saint Antoine	20/10/2017	28/10/2017	567642	6289985
44	5127000	Aveyron à Rodez (Druelle)	08/03/2018	16/03/2018	659597	6360010

45	5142100	Tarn à Albi	08/03/2018	16/03/2018	629764	6316920
46	5151100	Tarnon aux Rousses	11/04/2018	19/04/2018	748862	6340260
47	5158700	Aussonnelle à Seilh	20/10/2017	28/10/2017	567642	6289985
48	5176100	Montbrun à Montbrun-Bocage	20/10/2017	28/10/2017	527866	6289985
49	5223210	Luzou à Bégaar	07/03/2018	15/03/2018	389540	6310860
50	5228500	Bergon à Réans	08/03/2018	16/03/2018	460058	6311740
51	6082500	Bourbre à Tignieu-Jameyzieu	25/09/2017	03/10/2017	867947	6515147
52	6103500	Cance à Sarras	25/09/2017	03/10/2017	840264	6457878
53	6105568	Doux à Labathie d'Andaure	25/09/2017	03/10/2017	817646	6437780
54	6106030	Doux à Saint-Jean-de-Muzols	26/09/2017	04/10/2017	839966	6441598
55	6118550	Luech à Genholac	11/04/2018	19/04/2018	776630	6358800
56	6127900	Avène à St Privas des Vieux	25/09/2017	03/10/2017	790701	6337355
57	6128860	Amous à Générargues	11/04/2018	19/04/2018	778722	6330924
58	6159000	Durance aux Mées	26/09/2017	04/10/2017	937563	6330720
59	6194000	Luynes à Aix-en-Provence	26/09/2017	04/10/2017	896064	6267461
60	6416300	Durgeon à Vesoul	16/10/2017	24/10/2017	937751	6729704
61	6580238	Baume à Rosières	25/09/2017	03/10/2017	798544	6376728
62	6710039	Toulourenc à Saint-Leger-du-Ventoux	26/09/2017	04/10/2017	882069	6348202
63	6820073	Varèze à Cours-et-Buis	25/09/2017	03/10/2017	859976	6484614
64	6820138	Gier à La Valla en Gier	25/09/2017	03/10/2017	820186	6480464

7. Annexe B : Conditions physico-chimiques des stations expérimentées lors des interventions à J0 et J7. La température moyenne est calculée à partir des chroniques de température des sondes immergées tout au long des expérimentations.

Id	Code station	Température (°C)		Conductivité (µS/cm)		Oxygène (mg/l)		pH (unité pH)		Date
		J0	J7	J0	J7	J0	J7	J0	J7	
1	1133000	13,3	12,8	638	628	9,2	9	8,1	8	oct-2017
2	1134500	13,6	12,1	672	680	9,3	9	8,1	8,1	oct-2017
3	1138300	11,8	11,8	591	597	10,8	9,9	8,2	8,2	oct-2017
4	2018780	10	8,7	48	38	10,9	11,2	7,8	8	oct-2017
5	2037500	11,3	12,8	1184	1019	4,8	5,4	8	7,9	oct-2017
6	2103800	13,8	14,3	1802	1712	4,6	5	7,9	7,8	oct-2017
7	2107900	13,5	12	510	503	12,7	12,1	8,1	8,2	sept-2017
8	3001000	15,3	12,8	409	421	10	9,6	8,2	8,2	sept-2017
9	3006271	12,4	10,1	518	547	10,6	10,3	7,8	7,8	sept-2017
10	3006590	13,6	10,9	484	488	9,4	9,7	8,1	8	sept-2017
11	3013345	14,2	14,4	732	697	8,6	8,4	7,7	7,7	sept-2017
12	3014130	14,8	12,1	413	441	10,4	10,2	8,2	8,1	sept-2017
13	3016840	15,7	13,8	573	570	10,8	11,2	8	7,9	sept-2017
14	3022000	13,5	12	506	517	9,5	9,7	8	8	sept-2017
15	3052338	14,6	15,8	196	178	3,7	4,5	7	7,1	sept-2017
16	3078110	15,2	15,3	744	698	10,4	9,6	8,2	8,1	sept-2017
17	3099490	13,3	12,2	531	536	10,6	10,2	8,2	8,2	sept-2017
18	3145880	12,4	11,5	584	584	9,2	8,8	8	7,9	sept-2017
19	3160000	12,8	12,3	573	563	8,4	8,4	7,7	7,7	sept-2017
20	3162000	14,6	15,2	785	706	10	9,1	8,1	7,8	sept-2017
21	3174695	12,6	13,3	428	385	5	6,4	7,6	7,5	oct-2017
22	3174825	15,7	15,8	1593	1525	5,7	6,7	8,1	8,2	oct-2017
23	4009250	8,8	10	53	53	10,4	10,2	7,4	7,4	sept-2017
24	4019700	15,8	15,8	408	432	10,9	9,4	7,7	7,8	sept-2017
25	4025040	13,5	13,9	420	420	10,5	9,5	7,9	8	sept-2017
26	4034650	14,2	14,8	757	730	10	9,3	7,6	8,2	sept-2017
27	4037900	13,3	13,9	203	198	10,6	10,4	7,7	7,8	sept-2017
28	4046545	14,9	15,8	539	517	6,3	7,2	7,5	7,7	sept-2017
29	4050100	13,4	13,8	454	425	7,4	4,6	7,4	7,3	sept-2017
30	4068483	13,1	13,8	68,3	61	9,7	9,8	7,5	7,8	sept-2017
31	4082550	9,8	12	457	445	11,1	10,8	8,1	7,8	mars-2018
32	4085500	8,8	11,6	570	514	12,1	11,3	8,1	8,1	mars-2018
33	4164758	10,7	8,9	876	695	9,8	10,6	7,5	8,1	nov-2017
34	4170500	10,2	8,1	257	251	10,7	11,4	7,8	7,7	nov-2017
35	4199370	10,7	8,2	146	143,6	5,3	8,1	6,3	6,7	nov-2017
36	5006880	10,4	10,6	691	695	10,9	11,1	8,1	7,8	mars-2018
37	5025830	8,7	8,6	403	407	12	11,6	7,9	7,7	mars-2018
38	5039000	9,4	11	292	271	11,7	11,6	8,1	7,6	mars-2018

39	5042080	8,2	9,2	117	103,5	11,9	11,9	7,8	7,6	mars-2018
40	5047000	7,8	9,5	167	199	13,3	12,6	8,4	8,1	mars-2018
41	5079100	9,3	11,1	619	616	12,5	12,1	8,9	8,2	mars-2018
42	5083585	8,9	10,8	552	688	11,9	11,3	8,1	8,2	mars-2018
43	5118000	17,1	14,2	375	370	8,6	9,1	8,1	8	oct-2017
44	5127000	7,9	10,1	445	435	12,1	11,5	8,2	8	mars-2018
45	5142100	8,1	9,7	283	218	12,7	11,9	8,1	7,4	mars-2018
46	5151100	5,6	8,5	27,7	49	11	10,7	8	7,4	avr-2018
47	5158700	17,1	14,6	654	657	7,8	9,3	8,1	8,2	oct-2017
48	5176100	13,5	10,1	290	261	8,2	8,3	8	8,1	oct-2017
49	5223210	8,7	10,3	127	128,5	11,5	11	7,5	6,5	mars-2018
50	5228500	8	10,1	320	374	11,5	10,6	7,5	7,2	mars-2018
51	6082500	15,9	15,8	727	686	11,1	10,6	7,7	8	sept-2017
52	6103500	13,6	14,4	648	716	10	9,7	7,8	8,1	sept-2017
53	6105568	13,7	13,4	63	64	9,92	9,7	7,7	8,6	sept-2017
54	6106030	19,4	18,8	132	137	9,4	7,6	8,1	na	sept-2017
55	6118550	7,2	9,6	27,6	35,6	11,5	11,2	7,9	7,8	avr-2018
56	6127900	17,8	17,8	2010	1855	11,2	11,7	8,4	8,4	sept-2017
57	6128860	11,3	16,3	552	559	10,5	10,6	8,4	8,4	avr-2018
58	6159000	16,5	15,2	456	473	10,6	9,3	8,4	na	sept-2017
59	6194000	19,6	19,3	710	1240	9,3	9	8,1	7,6	sept-2017
60	6416300	13,1	12	820	940	6,9	4,8	7,9	7,8	oct-2017
61	6580238	19	18,5	167	154	9,9	10	8,1	7,9	sept-2017
62	6710039	15,2	14	333	351	9,6	10,2	8,2	na	sept-2017
63	6820073	13,7	13,8	404	409	9,8	10,2	7,7	8,2	sept-2017
64	6820138	12,8	12,8	67	66,6	9,5	10,1	7,2	6,9	sept-2017

Irstea

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

01 40 96 61 21

www.irstea.fr

Agence Française pour la Biodiversité

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

01 45 14 36 00

www.afbiodiversite.fr

