HAL
archives-ouvertes.fr

Modélisation toxico-cinétique de la bioaccumulation de composés organiques persistants par des invertébrés benthiques d'eau douce

Aude Ratier

▶ **To cite this version:**

Aude Ratier. Modélisation toxico-cinétique de la bioaccumulation de composés organiques persistants par des invertébrés benthiques d'eau douce. Ecologie, Environnement. Université de Lyon, 2019. Français. NNT : 2019LYSE1326 . tel-02612792v2

HAL Id: tel-02612792
https://tel.archives-ouvertes.fr/tel-02612792v2

Submitted on 20 May 2020

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

N° d'ordre NNT : 2019LYSE1326

THESE de DOCTORAT DE L'UNIVERSITE DE LYON
opérée au sein de **l'Université Claude Bernard Lyon 1**

Ecole Doctorale N° 341
Evolution Ecosystèmes Microbiologie Modélisation

Spécialité de doctorat : Ecologie des communautés, fonctionnement des écosystèmes, écotoxicologie
Discipline : Ecotoxicologie

Soutenue publiquement le 13/12/2019, par :
Aude Ratier

Modélisation toxico-cinétique de la bioaccumulation de composés organiques persistants par des invertébrés benthiques d'eau douce

---

Devant le jury composé de :

RICHAUME-JOLION, Agnès	Professeur des universités, Université Claude Bernard Lyon 1	Présidente
GOURLAY-FRANCE, Catherine	Directrice adjointe de l'Evaluation des Produits Réglementés, ANSES	Rapporteur
BADOT, Pierre-Marie	Professeur des universités, Université de Franche-Comté	Rapporteur
BILLOIR, Elise	Maître de Conférences, Université de Lorraine	Examinatrice
PERCEVAL, Olivier	Chargé de mission, Agence française pour la biodiversité	Examinateur
GEFFARD, Olivier	Directeur de recherche, Irstea Lyon-Villeurbanne	Directeur de thèse
LOPES, Christelle	Maître de Conférences, Université Claude Bernard Lyon 1	Invitée (Co-directrice)
BABUT, Marc	Chercheur (ICPEF), Irstea Lyon-Villeurbanne	Invité (Co-directeur)

Résumé

La présence de contaminants dans le milieu aquatique soulève la question de leur toxicité pour les organismes. Dans l'évaluation du risque environnemental, les effets d'une contamination sur des organismes sont évalués en deux temps. Tout d'abord, une étude de la toxico-cinétique (TK) du composé d'intérêt a lieu, c'est-à-dire établir le lien entre la concentration d'exposition et la concentration bioaccumulée par l'organisme. Par la suite, une étude toxico-dynamique (TD) est réalisée pour établir le lien entre la concentration du contaminant bioaccumulé dans l'organisme et sa toxicité.

La bioaccumulation est un phénomène variable, qui dépend des propriétés physico-chimiques des contaminants, de l'espèce considérée et des conditions environnementales. Des outils mathématiques, comme les modèles TK, ont été développés pour expliquer cette variabilité et paraissent de nature à pallier cette difficulté. Toutefois, l'implémentation de ces modèles impose de lever des verrous, comme l'estimation du taux de biotransformation et le devenir des métabolites, et d'estimer précisément l'incertitude sur les valeurs des paramètres toxico-cinétiques.

Ces travaux de thèse ont permis de développer un cadre générique de modélisation et d'inférence associée pour décrire et prédire la bioaccumulation de composés persistants (hexachlorobiphényl, hexabromocyclododécane, pentabromodiphényl-éther, pyrène) par différentes espèces d'invertébrés benthiques (insecte *Chironomus riparius*, crustacé amphipode *Gammarus fossarum*, mollusque gastéropode *Radix auricularia*).

La démarche adoptée au cours de cette thèse a consisté en la mise en œuvre d'essais de bioaccumulation au laboratoire, qui ont fournis les données expérimentales permettant de développer le cadre de modélisation et de tester différentes hypothèses sur les voies d'exposition des organismes. L'estimation des paramètres TK est réalisée par inférence Bayésienne, qui permet entre autres d'estimer simultanément tous les paramètres à partir de toutes les données disponibles, ce qui permet d'obtenir précisément l'incertitude autour de leur valeur et des prédictions du modèle.

Les différentes hypothèses testées à partir des données expérimentales correspondent à autant de modèles, dont on peut comparer les « performances ». Dans l'ensemble, ces modèles ont permis d'obtenir une estimation précise des paramètres et de leur incertitude. De plus, leurs prédictions s'ajustaient correctement aux données expérimentales, sauf dans le cas de l'HBCD. Une fonction de biotransformation a également été implémentée avec succès sur la base de données issues de la littérature (produits phytopharmaceutiques, médicaments, HAP). L'inférence Bayésienne appliquée au modèle générique a permis d'obtenir une incertitude réduite concernant le taux de biotransformation par rapport à celle des modèles originaux reposant sur une inférence classique.

Ce cadre générique de modélisation et d'inférence associée, développé dans une approche Bayésienne et pouvant s'adapter à chaque couple espèce-contaminant que l'on souhaite étudier, se révèle être un outil performant dans la description des toxico-cinétiques

de contaminants ainsi que dans l'évaluation de l'incertitude sur les paramètres et les prédictions.

Mots clés : invertébrés benthiques – composés organiques – bioaccumulation –inférence Bayésienne – modèle toxico-cinétique – biotransformation

Abstract

The presence of chemicals in the aquatic environment raises the question of their toxicity to organisms. In environmental risk assessment, the effects of a contamination on organisms are evaluated in two steps. Firstly, the toxicokinetics (TK) of the compound of interest are studied, that is to establish the link between the exposure concentration and the bioaccumulated concentration by the organism. Secondly, a toxicodynamic (TD) study is carried out to establish the link between the concentration of the contaminant bioaccumulated in the body and its toxicity.

Bioaccumulation is a variable phenomenon, which depends on the physico-chemical properties of chemicals, the species considered and the environmental conditions. Mathematical tools, such as TK models, have been developed to explain this variability and seem to overcome this difficulty. Nevertheless, implementing such models entailed to unlock several limitations, such as estimating biotransformation rates and metabolites' fate. Another current limitation of TK models lies in the assessment of uncertainty related to TK parameters.

This thesis has developed a generic model and inference framework for describing and simulating the bioaccumulation of persistent chemicals (hexachlorobiphenyl, hexabromocyclododecane, pentabromodiphenyl-ether, pyrene) by various freshwater benthic invertebrate species (an insect, *Chironomus riparius*, an amphipod, *Gammarus fossarum*, and a gastropod mollusk, *Radix auricularia*).

This thesis was based on a series of laboratory experiments, which provided bioaccumulation data suitable for model calibration, as well as for testing various hypotheses on exposure pathways. Model TK parameters are estimated through Bayesian inference, which simultaneously estimates all the parameters from all the available data, in order to obtain precisely the uncertainty around their value and the predictions of the model.

Each hypothesis tested on the basis of experimental data corresponds to a model, allowing then to compare the performance. These models provided an accurate estimate of the model parameters and their uncertainty. Overall, these models fit well the experimental data, except for HBCD. A biotransformation function was also successfully implemented on the basis of data from the literature (phytopharmaceuticals, drugs, PAH). In that case, Bayesian inference applied to the generic model yielded reduced uncertainty around the biotransformation rate compared to the original models which used classical inference.

This generic modelling and inference framework can be adapted to various species-contaminant pairs, and appears as an effective tool for describing contaminant kinetics, as well as for assessing the uncertainty related to model parameter estimation, or for predictions.

Keywords: benthic invertebrates – organic chemicals – bioaccumulation –Bayesian inference –toxicokinetic model – biotransformation

Remerciements

Je remercie tout d'abord **Pascal Boistard** pour m'avoir accueillie dans le centre Irstea Lyon-Villeurbanne pour ces trois ans de thèse, ainsi que **l'Agence Française pour la Biodiversité** pour le financement de ces travaux.

Je tenais également à remercier infiniment Olivier Geffard, Christelle Lopes et Marc Babut, directeur et co-directeur.rice.s de « ma » thèse. Sans vous ce manuscrit n'aurait pas vu le jour ! **Olivier**, merci pour ta disponibilité à toute heure, pour les diverses re-lectures et conseils sur « l'après thèse », mais aussi pour ton humeur joviale accompagnant les repas de l'équipe le midi (et aussi pendant les réunions labo!). **Christelle**, j'ai toujours été (et je le suis encore) impressionnée par ta rigueur et infinie patience, qui font de toi une encadrante hors du commun ! J'ai pu bénéficier de ton don pour l'enseignement, qui n'est plus un « *a priori* ». Merci pour ta présence dans l'encadrement de cette thèse, ton sourire permanent et tes encouragements. Grâce à toi j'ai beaucoup appris, entre autres sur le Bayésien et la rigueur en modélisation et inférence, sans être perdue dans toutes ces notions nouvelles pour moi. **Marc**, merci de m'avoir fait confiance tout du long, ce qui a renforcé mon autonomie et ma confiance en moi. Je te remercie également pour ta grande disponibilité, ton sens de l'humour qui recharge en bonne humeur (surtout à la fin des réunions ou au coin café), et le modèle (pas mathématique cette fois !) que tu es pour ton organisation, dont j'ai pu m'inspirer. Merci également de m'avoir aidée dans les diverses manips, entre autres pour le prélèvement et l'homogénéisation du sédiment.

Je remercie également les membres du comité de pilotage qui m'ont suivie et accompagnée pendant ces trois ans, à savoir **Carmen Casado-Martinez**, **Pierre Labadie**, **Olivier Perceval** et **Pierre Marmonier**, ainsi que les **rapporteurs** et **examinateurs** pour avoir accepté de juger ce travail.

Cette aventure n'aurait pas été la même sans le soutien quotidien de l'équipe du labo écotox, par les différentes personnes la composant, et la tradition du vendredi midi à l'Oxo. Je remercie les techniciens sans qui les manips n'auraient pas vu le jour (et pour avoir supporté mes « tocs » de comptage!) : **Lucile** et ton partage de trucs et astuces sur les chiros et sur les grosses chaussettes à prendre pour la sortie feuilles. **Laura** et ta compagnie dans les aventures « périlleuses » du terrain, entre le péage, l'enlisement pour la pêche des physes ou encore l'arbre à déplacer c'est « easy » ! **Nicolas**, pour ton aide sur les manips (chiro et

sédiment en particulier), d'avoir mis les mains dans le cambouis, d'avoir été mes bras (du fait de ma petite taille haha) quand je ne pouvais pas porter les aquariums avec les 15L d'eau, les petits trucs et astuces qui simplifient de fou les manips, et aussi pour nos discussions de « geek » Linux et autres. **Hervé**, pour mon intégration dans l'équipe dès le début, avec la sortie feuilles dès le lendemain de mon arrivée (et non je n'ai pas oublié !) et ta sympathie, c'est vrai qu'il y a un vide quand tu ne manges pas avec l'équipe le mercredi midi ! Bref, j'ai beaucoup apprécié ces moments passés avec vous !

Je tiens également à remercier **Arnaud** pour la direction de l'équipe, les bilans et ta volonté qu'on se sente impliqué dans l'équipe, mais aussi pour tes conseils après-thèse et ta « positive attitude ». **Khedidja**, pour ta bonne humeur et ton sourire, tes pâtisseries (surtout préviens-moi si tu te mets à ton compte !) et les discussions diverses et variées. **Renaud**, pour les échanges qu'on a pu avoir et ton aide et tes conseils aussi bien scientifiques (tu as sauvé un prélèvement de ma manip gammare pyrène !) qu'administratifs (quand on parlait de nos vacances au ski et autres :)). **Patrice**, pour les discussions échangées de tes voyages et les différents films et séries du moment. Sans oublier **Jeanne** pour vos questions pertinentes lors des présentations au labo mais aussi pour vos petites attentions en cette période de rédaction en passant par le bureau des doctorants pour apporter un sourire. **Davide**, pour la mise en place du Journal Club et les échanges qui boostent pour les publications, **Adeline**, ta passion commune pour la mayo et sans oublier la soirée de la SEFA à Montpellier. **Annabelle**, pour l'encouragement mutuel du footing, les discussions de « filles » shopping et coiffure, et pour avoir partagé ce sentiment d'avoir 7,5j de congés supplémentaires en octobre :o **Alex**, pour m'avoir soufflé l'idée du Radix alors que j'étais vraiment en galère d'escargots, mais aussi pour ta mythique tasse lama. Sans oublier les stagiaires, en particulier **Véronique**, pour avoir assuré l'expérience BDE-99/gammare, et l'aide au dé-coquillage des radix et d'avoir participé aux analyses au LPTC ! Aussi les post-docs, **Benjamin** et **Thomas**, et les CDD qui sont passés par le labo, en particulier Elodie la marseillaise !

Je ne serais probablement pas arrivée jusqu'ici sans les colocataires de bureau, partenaires de crimes scientifiques, oui vous amis doctorants « opération survie, PhD <3 » ! Paul, Duarte, Alice, Pauline, Natacha, Noëlle et Maxime, MERCI pour votre présence et soutien !!! **Paul** et ta passion partagée de la photographie, même si on a côtoyé le même bureau que 3 mois. **Duarte** et ta sérénité lors de la phase de rédaction et ta capacité à improviser les slides pour la réunion labo le matin même, une inspiration ! **Alice** que dire ! Sûrement pas assez pour tout le soutien apporté, dans les grandes questions de Bayésien et ta compréhension quand R met

du rouge partout, dans les diverses soirées, dans les moments de doutes, dans les moments de rage contre l'administration (enfin surtout les agences de voyages ^^'), dans les escapades à Lille, Montpellier et Rome, mais aussi dans les moments de deuils, bref ta bonne humeur et ta personnalité entière était indispensable pour l'aboutissement de « ma » thèse ! **Pauline** ! Pour avoir partagé cette « course » qu'est la thèse, en particulier la toute fin, ton amour passionnel pour Terre Adelice (alors t'as testé tous les parfums finalement ?!) et pour le Coca (le pschiiiit quand tu ouvres une canette et les fous rires associés), tes conseils des bons restos (ce n'est plus l'application La fourchette mais l'appli «les critiques de PauPau » qu'il faut qu'on installe !), pour m'avoir motivée à « reprendre » (plutôt commencer haha) le footing, ta présentation à la SETAC de Rome qui a placé haut le niveau (et en même temps m'a beaucoup encouragée !), les divers encouragements quotidiens, les potins, tout ça quoi ! **Natacha**, dommage que tu n'aies pas été dès le début dans la secte du bureau des doctorants ! Tu es vraiment surprenante haha ! Tu comprends mieux que quiconque dans ce bureau les blagues sur R et compagnie, la passion pour le code jusqu'à ce que ça marche (enfin du moins quand t'es lancée, y a pas de fin haha!), et merci d'avoir partagé l'adresse de la fabrique à cookies ! Et tes muffins oh là là ! En vrai si tu te reconvertis tiens-moi au courant, je serais une cliente fidèle :D ! J'imagine encore ma tête quand tu nous as dit la bonne nouvelle, et aussi la confiance que j'ai, t'inquiètes tu seras une really good mama ! (Ps : tes cheveux, t'as trop de la chance!) **Noëlleee** ! Partenaire de boxe et de fous rires ! Merci pour tes post-it, tes fameuses questions à la pause de 16h, la révision du vocabulaire libanais, tes idées un peu folles parfois (dans le sens positif), ta bonne humeur, toujours pleine d'énergie, le stylo « coup de poing » (je l'adore, surtout quand Word bug sans prévenir haha !) et merci de traverser ce long couloir régulièrement pour faire coucou, bref je ne sais plus comment te décrire pour te remercier, mais tu sais déjà tout ça ! Au fait, tu me diras si t'as fait les « 20 blagues à faire aux collègues de travail », surtout celle avec les graines dans le clavier ! **Maxime**, alias Mamasita ou rayon de soleil ! Ah là là ces derniers mois de rédaction sans toi à ma droite et tes sandwichs du matin, c'était dur ! Merci pour tous ces temps passés avec le sourire, ta bonne humeur, notre escapade à Helsinki, Tallinn et Sto' ! C'était vraiment de bons moments ! Tu as pu comprendre ce qu'on traverse dans les analyses chromato / spectro, à quel point ça peut prendre du temps, merci parce que j'ai pu partager ce sentiment avec toi ! Merci à tous aussi pour les soirées au Toï-Toï, la tapenade, tout ça ! Vous-mêmes vous savez haha ! Nat', Noëlle et Max, je vous souhaite tout plein de courage pour braver les aventures du PhD (c'est pas Koh-Lanta mais Koh-Doctorat), mais je ne me fais pas de souci, je sais que vous allez réussir !!! :)

Je remercie aussi **Philippe Veber** et ses acolytes pour avoir mis en place la formation « inférence Bayésienne », parce que sans elle, je serais probablement encore perdue dans le codage !

Je tenais également à remercier **Sandrine** Charles, merci pour ta présence tout au long de la thèse, de m'avoir conviée aux réunions d'équipes du LBBE (y compris autour de galettes des rois), et aussi pour ton soutien lors de la SETAC 2019 à Helsinki qui m'a fortement encouragée !

Je remercie également le LPTC et les personnes le constituant : **Hélène** Budzinski pour ta supervision sur place, pour m'avoir intégrée à l'équipe quand j'étais en séjour au labo (encore merci pour m'avoir invitée à la sortie de fin d'année du labo !) et pour les diverses réflexions scientifiques pertinentes. Je remercie également **Pierre** Labadie pour tes questions, remarques et conseils tout au long de ces 3 années, **Karyn** Le Menach pour ta pédagogie et ne pas avoir perdu patience lorsque je ne comprenais pas, quitte à quitter tard le labo ! (je suis impressionnée par ton efficacité !) **Laurent** Peluhet et ton immense patience, ta sympathie et disponibilité pour les manips PCB et autres, à sacrifier quelques week-ends pour vérifier si les analyses se passaient bien et remettre du solvant, **Sylvie** Legagneur et **Patrick** Pardon pour vos disponibilités pour les analyses HBCD et leurs explications, ainsi que tous les autres permanents et contractuels que j'ai pu croiser aux différents pots et pauses café, sans oublier les doctorants, post-docs, stagiaires et CDD autour des quelques soirées passées à Bordeaux, en particulier **Manon**, **Louise**, **Marine**, **Sarah**, **Banan**, **Romane**, **Geoffroy**, **Rémi**, **Amélie**, **Aurélie** et **Christelle** (Roger le crabé !).

Je tiens aussi à remercier l'Institut Écocitoyen, en particulier **Julien**, **Annabelle** et **Sylvaine** pour m'avoir encouragée à postuler à cette offre de thèse même si le temps manquait !

Les ami.e.s, je ne pourrais pas tous vous citer ! **Jinou**, pour ta constante présence et disponibilité de BFF, tu es toujours restée la même malgré le fait que j'ai quitté la région parisienne ! Mais ces moments précieux sont gravés dans ma mémoire (et dans mon appareil photo ^^). **Flora** pour notre escapade à Rome et les diverses histoires folkloriques que tu peux nous raconter sur le groupe, **Tracy**, **Ramou** & **Nathou** quand on s'est toutes retrouvées autour d'une crêpe, du brunch ou aux buttes (rip tes lunettes de soleil Nathou, j'avais tout donné en escalade là x')). **Eva** et les accueils à Grenoble le temps d'un week-end, et pour rattraper le temps :) Charlène et nos escapades marseillaises ! Ta joie de vivre, ton énergie

positive, ton rire, ta folie, mais aussi tes sages conseils (parfois :p), merci pour tous ces moments et cette bulle d'oxygène dans les moments de doutes et de fatigue ! **Mary** pour ta passion du café, la seule à me comprendre sur ce point je crois (en même temps c'est toi qui m'as entraînée dans ce darkside of coffee :p), les brèves entrevues parisiennes, et les discussions sportives ! **Christelle** et **Camille**, le duo de choc, vous m'avez bien eue avec votre livre en cadeau là ! Pas besoin d'en dire plus, vous savez très bien que vous êtes des folles et que je vous aime pour ce que vous êtes :D Le reste de la team Antony, pour les diverses discussions autour de sushis ! Un merci particulier pour les **ados & anims de St Lu** (et **Lydie** pour nos aventures à Bercy pour le hand suivi du jap'), être animatrice pendant ces divers temps de vacances c'était une réelle bénédiction, et vous avez reboosté mon moral, jusqu'à même parfois en oublier le sujet de ma thèse au complet ^^ Que dire du **GDJA** Rue Louis, que d'aventures et de fous rires, impossible de tout citer (enfin peut-être celle du café italien et du réchaud sur le campus, celle-là est atypique quand même) ! Si je quitte la région lyonnaise, vous serez les premiers à me manquer ! La **promo 23 PCGE**, les rares fois où j'ai pu vous voir ça m'a fait un bien fou ! Surtout quand on était quasi tous au complet un soir, prendre des nouvelles de chacun, se revoir comme au bon vieux temps !

Mon chéri, tu me surprendras toujours, aux moments les plus fous et improbables ! Un million de mercis (voir plus) pour ta présence, tes petites attentions, de ne m'avoir jamais lâchée, même quand je racontais n'importe quoi et quand la folie se manifestait, juste d'avoir été là, d'avoir été dans tes bras, en sécurité et aimée. Tu ne te rends pas compte à quel point tu as boosté ma motivation pour la rédaction !

Un énorme merci à toute la famille, en particulier **Samuel** et **Kelly**, le bro' et la belle-sœur, votre mariage et les week-ends au ski (pratique la sœurette qui habite à Lyon ;p), Tignes, tous ces excellents moments (sportifs quand même !) partagés avant votre départ à Maurice ! **Maman et Papa** merci pour vos précieux encouragements et votre écoute. Merci pour avoir supporté les hauts et les bas de mes émotions. Maman, nos discussions jusqu'à pas d'heure autour de la fameuse tisane. Papa, pour les apéros divers et variés accompagnés de blagues et le week-end rando à Chamonix. **Papy et Mamie**, partis trop tôt avant d'avoir vu l'aboutissement de cette thèse, mais je sais que vous auriez été fiers de ce travail. La terrible nouvelle de **Nico**, bien trop jeune pour que ta vie s'arrête, quelques jours à en être effondrée, sonnée et perdue, mais merci parce que tu m'as fait comprendre plus que tout que chaque jour doit être vécu pleinement, demain ne nous appartient pas, et qu'il faut se recentrer sur l'essentiel qui durera éternellement : l'amour.

Table des matières

Résumé iii
Abstract v
Remerciements vii
Table des matières xiii
Liste de valorisations associées xvii
Liste des Figures xix
Liste des Tableaux xxiii
Liste des Abréviations xxv
Introduction 1
Contexte 1
Objectifs 4
Organisation du manuscrit 5
Chapitre 1 : Etat des connaissances 6
1.1 Evaluation du risque environnemental 6
1.1.1 Définition 6
1.1.2 Exemples d'applications 8
1.1.3 Invertébrés benthiques d'eau douce 14
1.1.4 Contaminants organiques et impacts environnementaux 25
1.2 Modélisation et estimation des paramètres toxico-cinétiques 44
1.2.1 Généralités des modèles toxico-cinétiques (TK) 44
1.2.2 Estimation des paramètres d'un modèle TK 49
1.3 Résumé 58
Chapitre 2 : Matériels et méthodes 59
2.1 Plan Experimental général 60
2.1.1 Approche globale 60
2.1.2 Stratégies 60
2.2 Prélèvement et dopage de la matrice d'exposition 62
2.2.1 Prélèvement, stockage et dopage des sédiments 62
2.2.2 Prélèvement, stockage et dopage des feuilles 66
2.3 Prélèvement et élevage des organismes d'études 68
2.3.1 Chironomes 68
2.3.2 Gammares 69
2.3.3 Radix 70
2.4 Exposition des organismes : cinétiques de bioaccumulation 71
2.5 Caractéristiques physico-chimiques des sédiments 72
2.6 Dosages chimiques 73
2.6.1 Préparation des échantillons 73
2.6.2 Analyses 76
2.6.3 Quantification 78

2.6.4 Contrôle qualité 79
2.7 Modélisation et inférence 83
2.7.1 Modélisation 83
2.7.2 Ajustement du modèle aux données expérimentales par inférence Bayésienne 85
Chapitre 3 : Cadre Bayésien pour estimer les paramètres d'un modèle TK générique par les invertébrés benthiques: preuve de concept avec le PCB 153 95
3.1 Objectif 95
3.2 Article 1 96
3.3 Matériel supplémentaire 131
3.4 Note 1 : *Radix auriculria* exposé au PCB 153 141
3.4.1 Introduction 141
3.4.2 Matériels et méthodes 141
3.4.3 Résultats et discussion 142
3.4.4 Conclusion 144
Chapitre 4 : Prise en compte de la biotransformation dans le cadre de modélisation et d'inférence développé 145
4.1 Objectif 145
4.2 Article 2 146
4.3 Matériel supplémentaire 169
4.4 Note 2 : *Gammarus fossarum* exposé au pyrène 191
4.4.1 Introduction 191
4.4.2 Matériels et méthodes 191
4.4.3 Résultats et discussion 192
4.4.4 Conclusion 196
Chapitre 5 : Exemples d'applications du cadre de modélisation et d'inférence développé 197
5.1 Objectif 197
5.2 Article 3 198
5.3 Matériel supplémentaire 233
5.4 Note 3 : Comparaison avec des données *in situ* 243
5.4.1 Introduction 243
5.4.2 Matériels et méthodes 243
5.4.3 Résultats et discussion 244
5.4.4 Conclusion 246
5.5 Note 4 : Taux d'ingestion et efficacité d'assimilation 247
5.5.1 Introduction 247
5.5.2 Matériels et méthodes 248
5.5.3 Résultats et discussion 249
5.5.4 Conclusion 252
5.6 Note 5 : Mise en œuvre des directives 2000/60 et 2013/039 – Exemple du Benzo-(a)-Pyrène 253
5.6.1 Introduction 253
5.6.2 Matériels et méthodes 253
5.6.3 Résultats et discussion 254
5.6.4 Conclusion 256

Chapitre 6 : Discussion générale 257
6.1 Validation du modèle générique et du cadre d'inférence developpé 257
6.2 Variabilité interspécifique, contaminants et facteurs environnementaux 259
6.2.1 Variabilité des espèces 261
6.2.2 Les contaminants 262
6.2.3 Les facteurs environnementaux 263
6.3 Pertinence de l'outil dans l'évaluation du risque environnemental 264
6.4 Difficultés rencontrées 264
Perspectives 265
Références bibliographiques 267
Annexes 289

Liste de valorisations associées

ARTICLES

Publiés :

Ratier, A., Lopes, C., Labadie, P., Budzinski, H., Delorme, N., Quéau, H., Peluhet, L., Geffard, O., Babut, M. 2019. A Bayesian framework for estimating parameters of a generic toxicokinetic model for the bioaccumulation of organic chemicals by benthic invertebrates: proof of concept with PCB 153 and two freshwater species. Ecotoxicology and Environmental Safety 180:33-42.

En préparation :

Ratier, A., Lopes, C., Duvillard, V., Labadie, P., Budzinski, H., Geffard, O., Babut, M. 2019. Bioaccumulation of Brominated Flame Retardants (BFRs) and their potential biotransformation by freshwater invertebrates.

Ratier, A., Lopes, C., Geffard, O., Babut, M. 2019. Estimation of biotransformation rates for organic contaminants in aquatic invertebrates using a generic toxicokinetic model and Bayesian inference.

RAPPORT SCIENTIFIQUE

Babut, M., Ratier, A., Delorme, N., Labadie, P., Budzinski, H., Lopes, C. 2019. Modélisation biodynamique de l'accumulation de substances persistantes par des invertébrés benthiques d'eau douce. p. 70. (convention Irstea-Agence Française de la Biodiversité, action n°47)

COMMUNICATIONS ORALES

Ratier, A., Lopes, C., Budzinski, H., Labadie, P., Geffard, O., Babut, M. - Approche bayésienne pour estimer les paramètres d'un modèle biodynamique chez les invertébrés benthiques d'eau douce - SEFA, Montpellier, 27-28 juin 2018

Ratier, A., Lopes, C., Budzinski, H., Labadie, P., Geffard, O., Babut, M. - Approche bayésienne pour estimer les paramètres d'un modèle toxico-cinétique chez les invertébrés benthiques d'eau douce - GDR écotoxicologie, Irstea Antony, 05 décembre 2018

Ratier, A., Lopes, C., Budzinski, H., Labadie, P., Geffard, O., Babut, M. - An attempt to account for biotransformation in bioaccumulation models for aquatic invertebrate species - SETAC, Helsinki (Fl), 26-30 mai 2019.

Ratier, A., Lopes, C., Budzinski, H., Labadie, P., Geffard, O., Babut, M. - Prise en compte de la biotransformation dans un modèle toxicocinétique générique appliqué aux invertébrés aquatiques - SEFA, Lyon, 24-25 juin 2019.

COMMUNICATIONS AFFICHEES

Ratier, A., Babut, M., Lopes, C., Budzinski, H., Labadie, P., Geffard, O. - Modélisation biodynamique de l'accumulation de composés organiques persistants par des invertébrés benthiques d'eau douce – SEFA, Lille, 29-30 Juin 2017.

Ratier, A., Lopes, C., Budzinski, H., Labadie, P., Geffard, O., Babut, M. - A Bayesian approach to estimate biodynamic model parameters: bioaccumulation of PCB 153 by the freshwater crustacean Gammarus fossarum –SETAC, Rome (I), 13-17 mai 2018).

Ratier, A., Lopes, C., Budzinski, H., Labadie, P., Geffard, O., Babut, M. - Bioaccumulation and biotransformation of Hexabromocyclododecane (HBCD) by the freshwater crustacean Gammarus fossarum: a Bayesian approach to estimate biodynamic model parameters - SETAC, Rome (I), 13-17 mai 2018.

Ratier, A., Lopes, C., Budzinski, H., Labadie, P., Geffard, O., Babut, M. - Bioaccumulation of brominated flame retardants (BFRs) by two freshwater invertebrates exposed by different routes - SETAC, Helsinki (Fl), 26-30 mai 2019.

Liste des Figures

Figure 1. Principales étapes de l'évaluation du risque. 7

Figure 2. Formalisme des modèles TK/TD existants (Charles et Lopes 2018). 9

Figure 3. Processus de bioamplification. 14

Figure 4. Les trois invertébrés sélectionnés pour cette thèse : à gauche *C. riparius*, au milieu *G. fossarum* et à droite *R. auricularia* (Irstea). 15

Figure 5. Cycle de vie du chironome : (1) oeuf, (2) larve, (3) nymphe et (4) adulte (Ali et Morris 1992). 16

Figure 6. Morphologie de *Gammarus fossarum* (Piscart et Bollache 2012). 19

Figure 7. Durée (jours) des différents stades du cycle de mue de *G. fossarum* à trois températures : 7.0, 12.1 et 16.4 °C (Coulaud 2012). 20

Figure 8. Répartition géographique de *Radix auricularia* (Inventaire National du Patrimoine Naturel). 23

Figure 9. Schéma du devenir des POP dans le milieu aquatique (Université de Saint-Quentin-en-Yveline). 26

Figure 10. Structure chimique générale d'un PCB. 26

Figure 11. Structure du PCB 153. 27

Figure 12. Cartographie de la contamination des sédiments fluviaux et estuariens par les PCB_i en France métropolitaine ($\mu g\ kg^{-1}$ ps). Données de 2008 à 2010 du plan national d'échantillonnage PCB (©ONEMA, 2014). 29

Figure 13. Structure chimique de l'hexabromocyclododécane. 31

Figure 14. Représentation des structures chimiques du (a) BDE 99 et (b) BDE 47. 35

Figure 15. Métabolisation du BDE-209 par différentes espèces de poissons (la carpe *Cyprinus carpio*[a], la truite arc-en-ciel *Oncorhynchus mykiss*[b], et le saumon royal *Oncorhynchus tshawytscha*[c]). (Roberts *et al.* 2011) 37

Figure 16. Structure chimique du Pyrène 39

Figure 17. Suivi temporel des émissions atmosphériques nationales (en tonnes) des 8 HAP règlementés (benzo(a)pyrène, benzo(b)fluoranthène, benzo(k)fluoranthène, indeno(1,2,3-cd)pyrène, benzo(g,h,i)pérylène, fluoranthène, dibenzo(a,h)anthracène, benzo(a)anthracène). Source : CITEPA / Format SECTEN – Avril 2017 40

Figure 18. Structure chimique du principal métabolite du pyrène, l'hydroxy-pyrène (1-OH-pyrène). 42

Figure 19. Exemple d'ajustement séquentiel (OCDE 2012). 50

Figure 20. Exemple d'ajustement simultané (OCDE 2012). 51

Figure 21. Exemple de différents ajustements d'un modèle aux données. Le meilleur ajustement est celui qui présente une somme des résidus la plus faible.....52

Figure 22. Recherche dans le « Web of knowledge » d'articles contenant le mot « bayesian » dans le titre. Source : M. L. Delignette-Muller, *Mise en oeuvre de l'inférence bayésienne avec JAGS et rjags* , 30 mars 2017.....53

Figure 23. Distribution marginale *a posteriori* d'un paramètre, avec μ la valeur moyenne et l'intervalle de crédibilité à 95 % donné par les percentiles 2.5 et 97.5 %. 54

Figure 24. Principe général de l'inférence Bayésienne.....55

Figure 25. Exemple de deux chaînes Markov pour un paramètre du modèle (source : Fabien Subtil).....57

Figure 26. Tamisage du sédiment (à gauche) ; site de prélèvement à l'étang des Libellules (en haut à droite); site de prélèvement au Rizan (en bas à droite).....63

Figure 27. Homogénéisation du sédiment à l'aide d'une hélice à peinture rattachée à une perceuse électrique (gauche) ; système d'agitation pour le dopage du sédiment et des feuilles (droite). 64

Figure 28. Reformation des couches oxique et anoxique après une semaine de décantation. 66

Figure 29. Collecte des feuilles d'aulne par l'équipe Ecotox d'Irstea. 66

Figure 30. Chambre d'exposition via les feuilles. 67

Figure 31. Cressonnière de St Maurice de Rémens : prélèvements de gammares et de radix. 68

Figure 32. Chironomes au stade L2 transvasés dans les seaux (à gauche) et comptage de chironomes au stade L4 sur une table lumineuse avant le début de l'expérimentation (à droite). 69

Figure 33. Pêche de gammares (gauche), colonne de tamis (centre) et rinçage de la colonne de tamis / collecte dans les seaux (droite). 70

Figure 34. Mesure de la longueur d'une coquille de radix 70

Figure 35. Mesure de la taille des chironomes sous loupe binoculaire.....71

Figure 36. Exposition des radix au mélange PCB 153/BDE 99. 72

Figure 37. Les différentes étapes de préparation d'échantillons solides avant analyse. 74

Figure 38. Préparation des échantillons avant analyse du 1-OH-pyrène. 75

Figure 39. Système de filtration des échantillons d'eau. 76

Figure 40. Exemple du GC-μECD utilisé lors des analyses PCB et PBDE (à gauche) et de la chaîne de chromatographie liquide utilisée pour les analyses de l'HBCD (à droite).....76

Figure 41. DAG du modèle TK le plus complet avec trois sources de contamination (feuilles C_l, eau C_w et sédiment C_s), et trois sources d'élimination (excrétion, dilution par la croissance et biotransformation). 87

Figure 42. Cinétiques d'accumulation et d'élimination du PCB 153 chez le radix. Le trait vertical pointillé délimite la phase d'exposition de la phase de dépuration. Le trait plein représente les concentrations moyennes prédites dans le radix et les traits pointillés l'intervalle de crédibilité à 95 % des prédictions. 143

Figure 43. Niveaux de concentrations (ng g^{-1} pf) en pyrène (points) et son métabolite (1-OH-pyrène, triangles) mesurés dans *G. fossarum* pour les conditions E1 et E2. Chaque point ou triangle représente une mesure dans un échantillon (n = 1). 193

Figure 44. Distributions *a priori* (rouge) et *a posteriori* (noire) des paramètres du modèle (Eqs. (25) et (26)). 194

Figure 45. Ajustement simultané des prédictions du modèle aux données observées des concentrations en pyrène et 1-OH-pyrène mesurées dans *G. fossarum* dans les conditions E1 (rouge et violet) et E2 (bleu et bleu marine). 195

Figure 46. Prédictions de la bioaccumulation du BaP et des métabolites (a) par *C. tentans* exposé pendant 3 jours à 25 ng g^{-1} ps de sédiment contaminé, (b) par *H. azteca* exposé à 19 ng g^{-1} ps de sédiment contaminé pendant 3 jours et (c) par *H. azteca* exposé pendant 14 jours à 13.5 ng g^{-1} ps de sédiment contaminé. La ligne pointillée horizontale rouge représente la NQE_{biote} de 5 ng g^{-1} pf. La ligne verticale pointillée noire représente la fin de la phase d'exposition des organismes.....255

Figure 47. Distribution des valeurs des paramètres (j^{-1}) pour le PCB 153, BDE 99 et pyrène chez *G. fossarum* en fonction de leur caractère hydrophobe ($LogK_{ow}$). Les points représentent les valeurs moyennes et les barres d'erreurs leurs intervalles de crédibilité à 95 %. 262

Liste des Tableaux

Tableau 1. Substances prioritaires dont la NQE est applicable dans le biote. Transposition au contexte français de la directive 2013/39/UE et du document guide 2014 (Commission Européenne 2014).....13

Tableau 2. Niveaux de concentration en PCB 153 dans les sédiments et dans les invertébrés (sauf indication) disponibles dans la littérature.....30

Tableau 3. Niveaux de concentration en ∑HBCD (sauf indication) disponibles dans la littérature dans les sédiments européens et le biote aquatique. 33

Tableau 4. Niveaux de concentration en PBDE disponibles dans la littérature dans les sédiments européens et le biote aquatique. 38

Tableau 5. Résumé des niveaux de concentrations en pyrène disponibles dans la littérature dans les sédiments français et dans les invertébrés. 43

Tableau 6. Exemple d'études utilisant le concept de modèle TK.....47

Tableau 7. Résumé des expériences réalisées au cours de cette thèse.....62

Tableau 8. Etat des eaux de la station « Rizan à Meyzieu » (code station : 06082510). Etat biologique : TBE : très bon état ; BE : bon état ; Ind : État indéterminé : absence actuelle de limites de classes pour le paramètre considéré, ou absence actuelle de référence pour le type considéré (biologie), ou données insuffisantes pour déterminer un état (physicochimie). Etat chimique : Ind : Information insuffisante pour attribuer un état. © Eau France (2015). 63

Tableau 9. Nombre de blancs de manipulation réalisés par composé. 80

Tableau 10. Rendements de récupération pour les matrices solides. 81

Tableau 11. Rendements de justesse (ou de quantification) pour les différentes matrices de référence (SRM) ou dopées.....82

Tableau 12. Résumé des distributions *a priori.* 88

Tableau 13. Résumé des différentes données collectées et des sous-modèles testés dans les différentes expériences.....91

Tableau 14. Moyennes et intervalles de crédibilité à 95 % estimés pour les paramètres TK de *G. fossarum* exposé au pyrène. 194

Tableau 15. Moyennes et intervalles de crédibilité à 95 % estimés pour le taux de biotransformation du pyrène (k_m , j^{-1}) pour trois espèces d'invertébrés aquatiques. 196

Tableau 16. Contamination observée et prédite (moyenne puis intervalle de crédibilité à 95 % entre crochets) *in situ* (sédiment, invertébrés autochtones et encagés) pour l'HBCD et le BDE 99 (na : non analysé, n.d : non détecté).....244

Tableau 17. Résultats expérimentaux des taux d'ingestion (IR) pour les chironomes.....249

Tableau 18. Paramètres TK estimés pour le chironome exposé au PCB 153 à partir de l'équation (28) et rappel des valeurs estimées à partir de l'Eq. (6) de l'article 1. 250

Tableau 19. Distribution des surfaces de feuille consommées (mm^2 $individu^{-1}$ j^{-1}) par les gammares témoin.....251

Tableau 20. Paramètres TK estimés pour le gammare exposé au PCB 153 et rappel des valeurs estimées à partir des Eqs. (12) et (14) de l'article 1. 252

Tableau 21. Résumé de l'ensemble des valeurs médianes des paramètres toxico-cinétiques estimés à partir des expériences réalisées au laboratoire et du cadre de modélisation et d'inférence. Les intervalles de crédibilité à 95 % sont indiqués entre crochets.....260

Tableau 22. Principales différences de bioaccumulation des contaminants étudiés chez les trois espèces d'invertébrés sélectionnées. 260

Liste des Abréviations

1-OH-pyrène : 1-hydroxy-pyrène
AChE : Acétylcholine estérase
AE : Assimilation Efficiency - efficacité d'assimilation
AFB: Agence Française pour la Biodiversité
BAP : benzo-(a)-pyrène
BDE 99 : bromodiphényl éther-99
BDE 47 : bromodiphényl éther-47
BFRs: "Brominated flames retardants" - Retardateurs de flamme bromés
CAG : Charbon actif en grain
CBR : Critical Body Residue - concentration tissulaire critique
CE : Commission Européenne
CO : Carbone Organique
CYT-P450 : cytochrome P-450
DCE: Directive Cadre sur l'Eau
DCM : dichlorométhane
DIC : Deviance Information Criterion
EC : Effect Concentration – concentration efficace
EFSA : European Food Safety Authority
EI : étalon interne
ERE : évaluation du risque environnemental
GC-µECD : Chromatographie gazeuse couplé à un détecteur à capture d'électron
GC-MS/MS : Chromatographie gazeuse couplé à deux spectromètres de masse
HAP : Hydrocarbure aromatique polycyclique
HBCD : Hexabromocyclododécane
HPLC-MS/MS : Chromatographie liquide haute performance couplé à deux spectromètres de masse
IR : taux d'ingestion (« ingestioin rate »)
LogKow : coefficient de partage octanol/eau
LoD : Limite de détection
LoQ : Limite de quantification
MCMC : Markov Chain Monte Carlo
MO : matière organique
MRM : « Multi Reaction Monitoring »
m/z : rapport masse sur charge
NOAEL : No Observed Adverse Effect Level
NOEC : Non Observable Effect Concentration
NQE : Norme de Qualité Environnementale
OCDE (ou OECD) : Organisation de Coopération et de Développement Economiques
OCN : ophtachloronaphtalène
PBDE : Polybromodiphényl éthers

PCB : polychlorobiphényles
PCB_i : PCB indicateurs
PCB-DL : PCB dioxin-like (PCB présentant une analogie structurale avec la 2,3,7,8 tétra-chloro-dibenzo-dioxine et un profil toxicologique similaire)
PCB-NDL : PCB non-dioxin-like (PCB 28, -52, -101, -138, -153 et -180)
pf : poids frais
PNEC : Predicted No Effect Concentration
PP : polypropylène
pl : poids lipidique
ps : poids sec
QS : norme de qualité standard
REACH : enregistrement, évaluation, autorisation et restriction des substances chimiques
RFBs : Retardateurs de Flammes Bromés
rpm : rotation par minute
SIM : Single Ion Monitoring
SPE : Solid Phase Extraction (extraction sur phase solide)
SPMD : Semi Permeable Membrane Device
SPME : Solid Phase Miccro Extraction
S/N : rapport signal sur bruit
SRM : matériel de référence standardisé (« standardized reference material »)
TD : Toxico-dynamique
TEQ : quantité équivalente toxique
TEC : Treshold Effect Concentration
TMF : trophic magnification factor (facteur de bioamplification trophique)
TK : Toxico-cinétique
US-EPA: United States Environmental Protection Agency
UE : Union Européenne
UPLC : Ultra Performance Liquid Chromatography -

Introduction

CONTEXTE

L'étude de la bioaccumulation des contaminants (i.e. la capacité des organismes à absorber et à concentrer certaines substances chimiques dans tout ou partie de leur organisme) connait un regain d'intérêt depuis quelques années. Ceci s'explique d'une part par un intérêt croissant concernant les contaminants émergents (Poma *et al.* 2014) et d' autre part, par la réglementation qui impose la mise en œuvre d'une surveillance des milieux (e.g. directive (2013/39/CE)) et l'évaluation des risques environnementaux (ERE) de toutes substances avant leurs mises sur le marché.

Dans l'évaluation du risque environnemental, les effets d'une contamination sur des organismes sont évalués en deux temps. Tout d'abord, une étude de la toxico-cinétique (TK) du composé d'intérêt a lieu, c'est-à-dire établir le lien entre la concentration d'exposition et la concentration bioaccumulée par l'organisme. Par la suite, une étude de la toxico-dynamique (TD) est réalisée pour établir le lien entre la concentration du contaminant bioaccumulé dans l'organisme et sa toxicité ; cette dernière étant cruciale du fait que les gestionnaires évaluent le risque en caractérisant les effets. Ainsi, l'étude de la TK vise à améliorer celle de la TD puisque l'accumulation et le devenir des contaminants dans les organismes sont des processus essentiels qui agissent sur la toxicité.

La bioaccumulation dépend des propriétés physico-chimiques des contaminants, de l'espèce considérée et des conditions environnementales d'exposition. Les modèles TK sont couramment utilisés pour décrire, formaliser et prédire la variabilité de la bioaccumulation des contaminants. La construction originale du modèle TK à un compartiment part de l'hypothèse que la cinétique de bioaccumulation nette (cinétique de premier ordre) résulte de trois processus concurrents (Landrum 1989, MacKay et Fraser 2000, Luoma et Rainbow 2005) : l'absorption sous forme dissoute, l'absorption par voie alimentaire, et les pertes. Celles–ci peuvent provenir de l'excrétion, de la dilution par la croissance (biodilution, Spacie et Hamelink (1982)) et de processus métaboliques modifiant la structure du contaminant (i.e. biotransformation, Kuhnert *et al.* (2013)). Ce modèle repose implicitement sur trois hypothèses : (*i*) que pour chaque voie d'exposition l'accumulation est due à une diffusion à travers une membrane (branchiale, digestive), (*ii*) que la répartition du contaminant est

uniforme dans l'organisme (modèle à un compartiment) et (*iii*) qu'il y a conservation de la masse, en d'autres termes que le composé absorbé n'est pas dégradé par l'organisme.

Chez les invertébrés benthiques, ces modèles ont été développés à l'origine pour les métaux (Luoma et Rainbow 2005), même si ces dernières années de plus en plus d'études concernent les composés organiques, telles que les polychlorobiphényles (PCB) (McLeod *et al.* 2008, Janssen *et al.* 2010) ou les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP) (Bourgeault et Gourlay-Francé 2013). De façon générale pour les composés organiques, il parait essentiel de développer des concepts et outils visant à formaliser les liens entre la contamination de l'environnement (eau, sédiment), l'exposition des organismes, la bioaccumulation et le devenir de ces composés dans les organismes. Cependant, une des limitations importantes des modèles TK est que les voies d'accumulation (dissoute et trophique) sont rarement prises en compte simultanément, la voie dissoute étant la principale voie d'entrée des polluants chez les organismes aquatiques. Pour autant, la voie trophique est d'une importance non négligeable pour les contaminants organiques hydrophobes du fait de leur forte capacité d'adsorption sur la matière organique ou la nourriture (Gross-Sorokin *et al.* 2003). D'autre part, le processus de biotransformation des composés organiques est à considérer, puisque ce phénomène conduit à la diminution de la concentration du composé parent lorsque ce dernier est métabolisé, et les potentiels effets provoqués par les métabolites. Aujourd'hui, moins d'une dizaine d'études reportent des données TK de composés parents et de leurs métabolites dans les invertébrés benthiques (Ashauer *et al.* 2012, Fu *et al.* 2018).

Les paramètres d'un modèle TK sont estimés à partir de données expérimentales (cinétiques) comportant deux phases. La phase d'accumulation consiste à exposer les organismes pendant un certain temps à un ou plusieurs contaminant(s). La phase de dépuration consiste à transférer les organismes précédemment exposés dans un milieu exempt de toute contamination pour qu'ils éliminent le ou les composés. Le modèle est ensuite ajusté aux données expérimentales à l'aide de méthodes d'inférence pour estimer les paramètres (e.g. taux d'accumulation, taux d'élimination). Pour estimer les paramètres d'un modèle TK, deux guides européens sont utilisés (OCDE 2008, 2012) où il est recommandé d'estimer les paramètres suivant une régression non linéaire en plusieurs étapes (estimation séquentielle) ou simultanément. De nos jours, deux méthodes d'inférence sont utilisées pour estimer les paramètres : l'inférence fréquentiste qui est historiquement la plus utilisée, et l'inférence Bayésienne. L'inférence fréquentiste nécessite la plupart du temps de fixer certains paramètres lorsque tous ne peuvent pas être estimés simultanément, induisant un biais lorsque

ces paramètres sont corrélés (e.g. taux d'accumulation et taux d'élimination). De plus, avec cette approche, il n'est pas possible de prendre en compte simultanément des données de nature différente (e.g. données de bioaccumulation et de croissance). L'incertitude sur les paramètres du modèle, et donc sur ses prédictions, ne peut donc pas être « correctement » estimée, un point pourtant crucial dans l'ERE. L'inférence Bayésienne permet de lever ces verrous (Gelman *et al.* 1995, Bernillon et Bois 2000) car : (*i*) elle pallie le problème d'estimation simultanée de tous les paramètres d'un modèle à partir de données de nature différente ; (*ii*) elle utilise l'information disponible sur les paramètres à partir de la littérature, d'expériences préliminaires ou d'avis d'experts ; et (*iii*) elle fournit une estimation des incertitudes à travers les distributions *a posteriori* de chaque paramètre, issue de la distribution jointe de tous les paramètres estimés simultanément (incluant donc les corrélations éventuelles).

Parmi les applications opérationnelles des modèles TK, on peut notamment retenir les points suivants :

- La mesure de certaines substances prioritaires au titre de la directive 2000/60 serait plus pertinente dans le biote, plutôt que dans l'eau comme cela s'effectue à l'heure actuelle. Ainsi, la mise à disposition de modèles TK offre la possibilité de traduire une teneur accumulée par un organisme en concentration dissoute dans l'eau, pouvant ainsi être comparée directement à la NQE associée qui est exprimée en concentration dans l'eau.

- De même, les sédiments sont souvent utilisés dans les réseaux de surveillance des milieux aquatiques pour les substances hydrophobes alors que les NQE associées s'expriment en concentrations dans le biote. Ainsi, de tels modèles permettent soit de transposer la NQE_{biote} au sédiment, soit de prédire le risque de dépassement de la NQE à partir d'observations du sédiment.

- Par ailleurs, la bioaccumulation des composés persistants reste un domaine peu développé de l'évaluation des risques des sédiments contaminés, notamment par les substances bioamplifiées dans les niveaux trophiques aquatiques. Il conviendrait de développer des outils permettant de prédire les concentrations tissulaires à différents niveaux trophiques, en commençant par les invertébrés benthiques.

OBJECTIFS

La problématique générale de ma thèse est de développer un cadre générique de modélisation et d'inférence applicable à différentes espèces d'invertébrés exposés à divers contaminants organiques, en incluant différentes voies d'exposition et différents processus, comme la dilution par la croissance et la biotransformation.

Pour cela, le travail effectué s'est articulé autour de deux objectifs : un objectif méthodologique de développement du cadre de modélisation et d'inférence ; et un objectif écotoxicologique d'étude de la variabilité de la bioaccumulation de contaminants par différentes espèces.

L'objectif méthodologique comprend le développement d'un cadre générique de modélisation TK et d'inférence, incluant toutes les possibilités, c'est-à-dire plusieurs voies d'exposition (dissoute et trophique) et d'élimination (excrétion, croissance, biotransformation), adapté à différents couples espèces-substances, dans un cadre d'inférence considérant simultanément l'ensemble des données disponibles et permettant de quantifier les incertitudes. Pour répondre à cet objectif, il a été nécessaire dans un premier temps de calibrer ce cadre générique de modélisation et d'inférence à une substance non métabolisable pour différentes espèces d'invertébrés. Dans une deuxième étape, la biotransformation a été intégrée au cadre générique précédemment élaboré. Dans un dernier temps, l'utilisation du cadre de modélisation et d'inférence a été illustrée à travers diverses applications. L'estimation simultanée des paramètres a été effectuée par inférence Bayésienne à l'aide du logiciel R, à partir de données expérimentales obtenues au laboratoire ou disponibles dans la littérature scientifique.

L'objectif écotoxicologique consiste en l'étude expérimentale des cinétiques de bioaccumulation pour plusieurs couples invertébré – contaminant. Pour cela, une première série d'expériences a été réalisée concernant l'exposition de *Chironomus riparius*, *Gammarus fossarum* et *Radix auricularia* au 2,2′,4,4′,5,5′- hexachlorobiphényle (PCB 153) par différentes voies d'expositions. Une deuxième série d'expériences a consistée en l'exposition de *G. fossarum* à un HAP, le pyrène, afin d'étudier sa biotransformation dans cet organisme. Enfin, une troisième série d'exposition à des substances d'intérêts, l'hexabromocyclododécane (HBCD) et le 2,2',4,4',5 pentabromodiphényl-éther (BDE 99), a été effectuée sur les invertébrés étudiés.

ORGANISATION DU MANUSCRIT

Ce manuscrit est organisé en 6 chapitres. Un premier chapitre présente l'état des connaissances sur 1) l'évaluation du risque environnemental et 2) les méthodes de modélisation toxico-cinétique (TK) et d'inférence des paramètres des modèles.

Le chapitre suivant (chapitre 2) détaille la méthodologie : il présente les expérimentations réalisées et le modèle développé ainsi que la méthode d'estimation des paramètres.

Les chapitres 3, 4 et 5 rapportent les résultats des travaux réalisés, de l'étude d'une première exposition des organismes au PCB 153 (chapitre 3), la prise en compte du phénomène de biotransformation dans le modèle et son cadre d'inférence, à partir de données disponibles dans la littérature et via l'exposition au laboratoire des organismes à un HAP (chapitre 4), jusqu'à des illustrations de son application (chapitre 5). Ces chapitres décrivent les expérimentations réalisées, présentent les résultats des analyses, puis la modélisation et l'inférence, en traitant à chaque fois une question spécifique. Tout d'abord, dans le chapitre 3, la méthode d'estimation des paramètres utilisée a été validée. Ensuite, dans le chapitre 4, la question de la prise en compte du processus de biotransformation dans ce cadre générique a été abordée. Enfin, le chapitre 5 présente l'intérêt de la modélisation et son application en évaluation du risque environnemental. Les chapitres 3, 4 et 5 s'appuient sur trois articles, dont le premier est publié dans Ecotoxicology and Environmental Safety (chapitre 3, Ratier *et al.* (2019)).

Le chapitre 6 présente une discussion de l'ensemble des résultats obtenus.

Chapitre 1 : Etat des connaissances

Ce chapitre développe les notions majeures abordées dans cette thèse, en commençant par la notion d'évaluation du risque environnemental (section 1.1) qui comprend sa définition (section 1.1.1), des exemples de son application (section 1.1.2), une description des invertébrés benthiques d'eau douce dans le rôle du transfert des polluants (section 1.1.3) et les impacts des contaminants organiques étudiés (section 1.1.4). Une deuxième partie présente la modélisation toxico-cinétique (TK), les méthodes d'estimation de ses paramètres ainsi que l'utilisation de tels modèles en évaluation du risque (section 1.2). Enfin, la section 1.3 résume les principales idées conceptuelles à retenir.

1.1 EVALUATION DU RISQUE ENVIRONNEMENTAL

Le développement de l'écotoxicologie remonte aux années 1960-1970, lors de la découverte de la persistance de produits phytopharmaceutiques organochlorés dans l'environnement, et les effets observés sur des espèces non ciblées (Carson 1962). Plusieurs définitions pour « l'écotoxicologie » ont été proposées (Jouany 1971, Ramade 1977, Butler 1978, Moriarty 1983, 1988, Kendall 2001, Lynch 2007, Newman et Zhao 2008) ; nous retenons la suivante pour ces travaux: « une science qui étudie les modalités de contamination de l'environnement par les agents polluants naturels ou artificiels produits par l'activité humaine, ainsi que de leurs mécanismes d'action et effets sur les êtres vivants qui peuplent la biosphère » (Ramade 1977). Il s'agit donc d'une discipline à part entière, qui allie l'écologie et la toxicologie, et qui a pour objectifs la connaissance des effets des polluants sur les écosystèmes, en s'efforçant de prédire la nature, l'ampleur et la durée de ces effets, afin de mieux évaluer les risques associés et d'en permettre la prévention.

1.1.1 Définition

L'évaluation du risque environnemental (ERE) identifie et évalue les menaces pour l'environnement, en particulier les organismes vivants, leurs habitats et les écosystèmes (Muralikrishna et Manickam 2017). Les causes des menaces sur l'environnement sont multiples, d'origines naturelles ou anthropiques. En particulier, l''utilisation des produits chimiques est aujourd'hui soumise à une réglementation qui prend en compte les conséquences de leur présence et dispersion dans l'environnement : le règlement REACH - enregistrement, évaluation, autorisation et restriction des substances chimiques, entré en

vigueur le 1er juin 2007 (Règlement 1907/2006). Le risque chimique est défini comme la « probabilité d'occurrence d'un effet défavorable sur l'homme ou l'environnement résultant d'une exposition donnée à une substance chimique ou à un mélange de substances chimiques » (Leeuwen 2007). En évaluation du risque, le risque implique la probabilité combinée des dangers et de l'exposition. Les étapes de la réalisation d'une ERE incluent donc l'identification du danger, l'évaluation de l'exposition et des effets, et la caractérisation du risque (**Figure 1**).

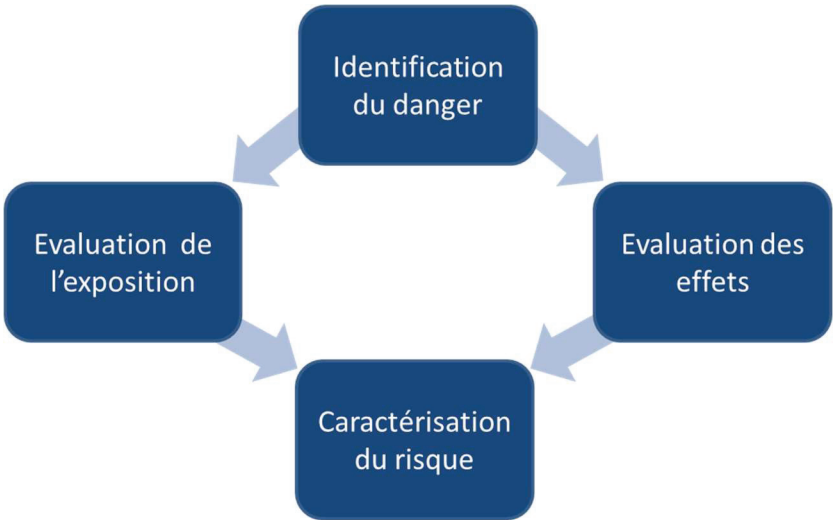


Figure 1. Principales étapes de l'évaluation du risque.

- L'identification du danger

Le danger désigne « la capacité inhérente d'une substance chimique ou d'un mélange de substances chimiques à causer des effets défavorables à l'homme ou à l'environnement selon les conditions d'exposition » (Leeuwen 2007).

- L'évaluation de l'exposition

L'exposition désigne le contact entre une substance chimique et une population ou un individu dans le temps, ou plus précisément « la détermination des émissions, des chemins empruntés, des quantités de substances et de leurs transformation ou dégradation afin d'estimer les concentrations (ou doses) auxquelles les populations humaines ou les compartiments environnementaux sont ou ont pu être exposés ». (Leeuwen 2007). La concentration ou dose externe (quantité de substance chimique qui entre en contact avec les barrières de l'organisme par les voies d'exposition) est alors distinguée de la concentration interne (quantité de substance chimique qui pénètre dans les milieux biologiques, une fois passés les tissus séparant les espaces intérieurs et le milieu extérieur).

- L'évaluation des effets

L'effet est la conséquence de l'exposition à une substance, indépendamment des caractéristiques de l'organisme exposé. Dans l'environnement, ces effets peuvent par exemple se traduire par la mortalité, par un trouble dans la reproduction ou encore de croissance.

- La caractérisation du risque

La caractérisation du risque peut être résumée par l'estimation de l'incidence et des effets indésirables susceptibles de se produire dans l'environnement compte tenu de l'exposition à une substance chimique.

L'ERE est donc par définition liée à la notion de probabilité, définie par les notions de variabilité des réponses et des incertitudes de prédictions. La variabilité se réfère à une description quantitative de la gamme ou de la propagation d'un ensemble de valeurs (US EPA 2011) et elle est souvent exprimée à travers une statistique métrique (comme la variance, l'écart-type ou encore les quantiles) qui reflète la distribution des données. Dans l'évaluation de l'exposition, elle peut être présente dans les paramètres environnementaux (pH, température, etc.) ou encore dans les facteurs d'exposition (e.g. le sexe, l'âge, etc.). La variabilité ne peut pas être réduite mais elle peut être caractérisée. Les incertitudes quant à elles renvoient à un manque de données ou d'une compréhension incomplète du contexte de l'évaluation ; elles peuvent être quantitatives ou qualitatives (US EPA 2011). Dans l'évaluation de l'exposition, elles peuvent résulter d'erreurs dans les hypothèses, d'erreurs de jugement, d'analyses incomplètes, d'erreurs de mesure ou d'échantillonnage et dans les prédictions d'un modèle. Les incertitudes peuvent donc être réduites avec plus ou de meilleures données. La quantification des incertitudes est un point crucial pour une meilleure évaluation du risque.

1.1.2 Exemples d'applications

Modèles toxico-cinétiques/toxico-dynamiques (TK/TD)

Généralement abordées en première étape dans l'ERE, les approches mécanistes permettent de décrire les processus reliant l'exposition ou les concentrations environnementales (dose externe) d'une substance à sa concentration dans l'organisme (dose interne), jusqu'à sa toxicité dans un taxon donné ou pour l'écosystème global (Grech *et al.* 2017). Le lien entre l'exposition à un contaminant et sa toxicité est complexe puisque la toxicité est déterminée par l'absorption interne du contaminant et par les différents processus de métabolisation ou de détoxification propre à l'espèce. Deux phases sont alors distinguées

dans cette relation : la phase toxico-cinétique (passage de la concentration en contaminant dans l'organisme et sa distribution, TK) de la phase toxico-dynamique (expression de la toxicité ou l'effet d'une substance sur l'organisme au cours du temps, TD). Des outils mathématiques, aussi appelés modèles TK/TD, ont été développés pour formaliser ces processus variables, qui dépendent de plusieurs facteurs : des propriétés des contaminants, de l'espèce considérée et des caractéristiques du milieu (**Figure 2**). Ces modèles peuvent donc être utilisés pour caractériser le risque, couplant les évaluations de l'exposition et des effets.

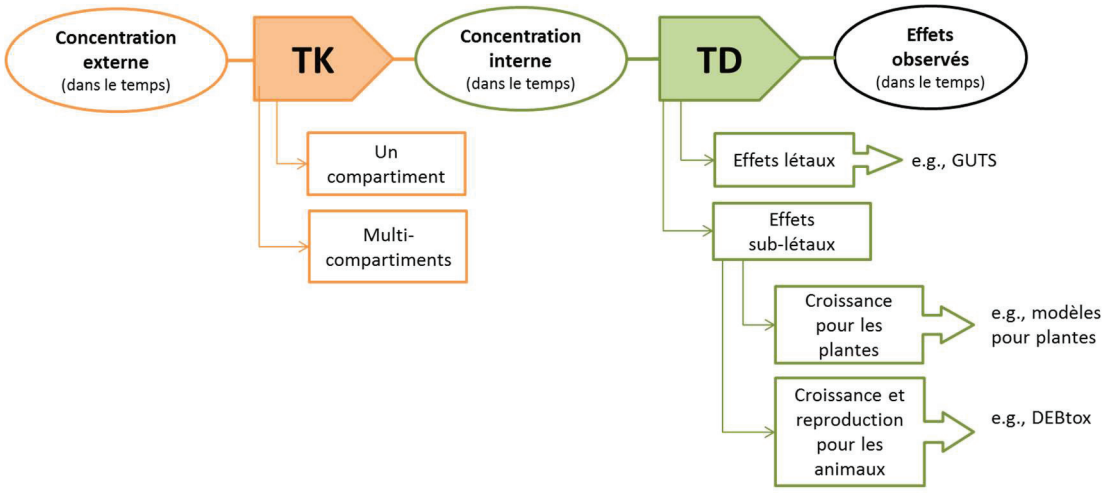


Figure 2. Formalisme des modèles TK/TD existants (Charles et Lopes 2018).

En particulier, les modèles TK sont reconnus pour leur utilisation dans l'évaluation du risque environnemental (EFSA 2018). Ils permettent la quantification, la synthèse, la prédiction et le test d'hypothèses :

- ils améliorent les prédictions des contaminants accumulés dans le biote en considérant l'importance relative des différentes voies d'expositions (Wang et Fisher 1999, Luoma et Rainbow 2005) ;
- ils expliquent aussi la variabilité de la bioaccumulation des contaminants dans le biote à l'état d'équilibre/stationnaire (Luoma et Rainbow 2005, Rainbow 2007, Wang et Rainbow 2008) ;
- ils sont utilisés comme outils prédictifs de la relation entre la dose externe et la dose interne : extrapolations entre les niveaux d'expositions, les voies d'expositions, à l'échelle de l'individu ou entre espèces comme par exemple dans l'évaluation de l'impact de sédiments contaminés tout au long de la chaîne trophique aquatique (Lopes *et al.* 2012, Ashauer et Jager 2018) ;

- ils peuvent prédire l'effet de traitement de sédiments contaminés sur les invertébrés (Janssen *et al.* 2011) ;
- ils sont utilisés pour estimer les expositions des métabolites (Ashauer et Escher 2010) ;
- plus récemment, ils peuvent être utilisés pour prédire un bruit de fond[1] de concentration pour les métaux (Jin *et al.* 2015, Lu *et al.* 2019, Wang et Tan 2019) ;
- ils permettent également de surmonter la limite entre la bioaccumulation au laboratoire et sur le terrain en considérant les incertitudes des expérimentations au laboratoire et des conditions environnementales (Urien *et al.* 2016).

Directive Cadre européenne sur l'Eau (DCE)

La présence de contaminants dans l'environnement, et plus particulièrement dans le milieu aquatique, soulève la question de leur toxicité pour les organismes. Dans une perspective de gestion du risque environnemental, la directive cadre sur l'eau (2000/60/CE), ou DCE , adoptée en octobre 2000 par le Parlement et le Conseil Européen, est le texte majeur de la politique de l'eau dans l'Union Européenne. Elle offre un cadre structuré et engage chaque état membre dans un objectif de protection et de reconquête de la qualité des eaux et des milieux aquatiques.

Concernant les eaux de surface, continentales et littorales, ainsi que les eaux souterraines, la DCE crée des obligations de méthodes, de résultats et de calendrier. Elle repose sur des plans de gestion et des programmes de mesures établis pour une certaine période. L'état d'une masse d'eau de surface comprend deux aspects, un état écologique et un état chimique :

- L'état écologique tient compte de l'écosystème dans son ensemble, et se base sur des paramètres biologiques (e.g. abondance des espèces de poissons d'une rivière), tout en tenant compte de paramètres physico-chimiques (e.g. oxygène dissous dans l'eau, température, etc.), de la morphologie et de l'hydrologie du milieu.
- L'état chimique est évalué en mesurant la présence et la concentration dans le milieu aquatique d'une liste de substances chimiques (e.g. éléments traces métalliques, PCB, HAP). Cet état s'inscrit dans l'évaluation de l'exposition du

[1] Bruit de fond : désigne l'existence naturelle ou artificielle d'un phénomène, dont il est nécessaire de connaître l'importance pour mesurer efficacement l'impact d'une activité.

cadre de l'ERE, mais ne permet pas une caractérisation complète du risque. Deux classes sont définies pour qualifier l'état chimique des masses d'eau : bon et non conforme (ou mauvais). Si la concentration mesurée d'une substance dans le milieu dépasse une valeur limite (norme de qualité environnementale, NQE), alors la masse d'eau n'est pas considérée dans un bon état chimique.

Les NQE sont établies suivant différentes étapes : l'identification des compartiments à risque (e.g. eau, sédiment, biote), l'identification des propriétés physico-chimiques des substances et la collecte de données écotoxicologiques, l'extrapolation de ces données à une concentration seuil (ou norme de qualité spécifique (QS)), la proposition d'une QS s'appliquant au compartiment à risque et la définition de la NQE[2] (INERIS 2011). Pour la plupart des substances prioritaires, la NQE est établie pour le compartiment eau (i.e. NQE_{eau}), mais pour un certain nombre de substances prioritaires hydrophobes c'est la NQE_{sed} ou la NQE_{biote} qui s'applique (2008/105/CE , Directive 2013).

Les NQE_{eau} sont définies par une valeur seuil, la concentration annuelle moyenne (notée $AA\text{-}QS_{water_eco}$), qui prend en compte les données d'écotoxicité à long terme (toxicité chronique) disponibles pour chaque substance afin de tenir compte au minimum trois niveaux trophiques : les producteurs primaires (algues ou plantes aquatiques), les invertébrés et les poissons. Ces données sont souvent soit la concentration pour laquelle il n'y a pas d'effet observable (NOEC) ; soit la concentration ayant 10 % d'effet sur les individus testés (EC_{10}). Si ces données sont en nombre suffisant, une méthode d'extrapolation statistique peut être utilisée pour définir la valeur seuil. Si les données sont insuffisantes alors des facteurs d'extrapolation (à partir de données de toxicité par voie orale obtenues chez des mammifères ou des oiseaux) sont appliqués à la valeur de NOEC ou EC_{10} la plus faible.

La définition des $NQE_{sédiment}$ dépend des données écotoxicologiques disponibles pour les organismes benthiques qui vivent en contact direct avec le sédiment, pour lesquelles un facteur d'extrapolation est appliqué. Si aucune donnée n'est disponible, le coefficient de partage est alors utilisé (principe d'un équilibre entre la phase aqueuse et le sédiment) pour définir les $NQE_{sédiment}$.

[2] Une NQE est déterminée à partir des QS calculées pour chacun des compartiments. Afin de protéger le compartiment le plus sensible, la NQE globale retenue sera la plus faible des QS déterminée pour chaque compartiment.

La NQE_{biote} vise (*i*) à protéger les grands prédateurs (i.e. oiseaux et mammifères) des risques d'empoisonnement dus à l'ingestion de leurs proie (empoisonnement secondaire) et (*ii*) à protéger les organismes benthiques également exposés à un empoisonnement secondaire. En général, la norme obtenue pour la protection des mammifères et des oiseaux est considérée suffisamment protectrice pour les organismes benthiques. La valeur seuil pour le biote correspond à la concentration prédite sans effet pour les prédateurs supérieurs (notée $QS_{biota_sec\ pois}$). La définition de cette valeur est basée sur une chaîne alimentaire simplifiée, évaluant les effets toxiques aux niveaux les plus élevés de la chaîne alimentaire, résultant de l'ingestion d'organismes aquatiques contaminés à des niveaux trophiques inférieurs. Les données écotoxicologiques retenues se basent sur des données de toxicité orale chez les mammifères et les oiseaux (« No Observed Adverse Effect Level », NOAEL) et la concentration de toxique dans le biote qui n'induit pas d'effets observés pour ces prédateurs (NOEC). La NOEC peut être déduite de la NOAEL par des facteurs de conversion empiriques variables selon les espèces testées, la durée de l'essai et le type d'essai.

Les $NQE_{sédiment}$ et NQE_{biote} permettent de quantifier la contamination des substances hydrophobes qui sont difficilement mesurables dans l'eau. En particulier, le suivi dans le biote s'applique aujourd'hui à 11 substances prioritaires et dangereuses prioritaires de l'état chimique (**Tableau 1**).

Le document guide européen portant sur la mise en œuvre de la surveillance chimique dans le biote (Commission Européenne 2014) suggère l'utilisation d'organismes alternatifs au poisson pour limiter l'épuisement de la ressource piscicole. Si l'évaluation de l'état chimique d'un site est non conforme avec la matrice alternative (e.g. invertébrés), alors seulement lors de l'étape de confirmation le prélèvement et l'analyse de poisson aura lieu. Les invertébrés d'eau douce semblent être une bonne matrice alternative au poisson, du fait qu'ils représentent plus de 80 % de la biodiversité animale des eaux douces (Balian 2008). De plus, ils sont susceptibles d'être les plus sensibles à la pollution aquatique, notamment du fait de leur mode de vie en proximité avec le sédiment, un des réservoirs des contaminants organiques hydrophobes. Par ailleurs, les connaissances collectées à ce niveau trophique permettent une meilleure compréhension du transfert de contaminants dans les maillons supérieurs de la chaîne trophique, plus communément appelé processus de bioamplification. La bioamplification désigne l'augmentation cumulative des concentrations d'une substance persistante à chaque stade de la chaîne trophique (**Figure 3**).

Tableau 1. Substances prioritaires dont la NQE est applicable dans le biote. Transposition au contexte français de la directive 2013/39/UE et du document guide 2014 (Commission Européenne 2014).

Substance	Substance dangereuse prioritaire	NQE_{biote} (ng g^{-1}, poids frais, pf)	Biote concerné
Mercure (**Hg**)	oui	20	Poissons (entier)
Hexachlorobenzène	oui	10	Poissons (filet)
Hexachlorobutadiène	oui	55	Poissons (entier)
PBDE (∑ BDE-28, 47, 99, 100, 153, 154)	Uniquement tétra, penta, hexa et hepta-BDE	0,0085	Poissons (filet)
Acide perfluorooctane sulfonique (**PFOS**)	oui	9,1	Poissons (filet)
HBCD (somme des trois isomères)	oui	167	Poissons (entier[2])
Dioxines et PCB de type dioxine (∑ 7 PCDD, 10 PCDF et 12 PCB-dl)	oui	0,0065 TEQ[1]	Poissons (filet) Crustacés[3] Mollusques[3]
Heptachlore et époxyde d'heptachlore	oui	0,0067	Poissons (filet)
Fluoranthène	Non	30	Crustacés Mollusques
HAP à 5 et 6 anneaux (Benzo[a]pyrène, Benzo[b]fluoranthène, Benzo[k]fluoranthèhne, Benzo[g,h,i]pérylène, Indéno[1,2,3cd]pyrène)	oui	5	Crustacés Mollusques
Dicofol	oui	33	Poissons (entier)

[1] TEQ : concentration équivalente toxique conformément aux facteurs équivalents toxiques de 2005 de l'Organisation Mondiale de la Santé.

[2] poissons (entier) : ce support biote n'est plus d'actualité depuis la parution de la nouvelle version de la note de cadrage pour la surveillance et de la note technique du 27/12/2017 du ministère de l'environnement.

[3] crustacés, mollusques : utilisation des crustacés pour la surveillance des eaux continentales et des mollusques pour les eaux littorales.

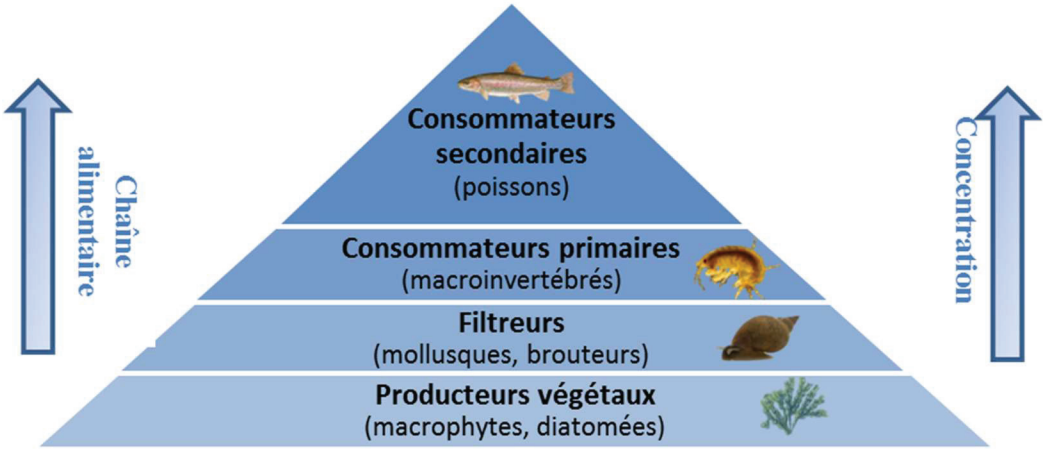


Figure 3. Processus de bioamplification.

Le suivi sur invertébrés dans le cadre de la DCE répond à un double objectif : d'une part à analyser les substances pour lesquelles les NQE sont définies dans ce taxon, et d'autre part d'étendre la couverture spatiale du suivi biote sur le territoire.

1.1.3 Invertébrés benthiques d'eau douce

Plusieurs tests standardisés ont été développés sur des espèces modèles pour évaluer les effets des polluants au niveau sub-individuel (biomarqueurs) et individuel (traits de vie). Les espèces modèles les plus utilisées en écotoxicologie aquatique incluent notamment l'algue unicellulaire d'eau douce *Pseudokirchneriella subcapitata*, le chironome (*Chironomus riparius*, *Chironomus tentans*), le gastéropode *Potamopyrgus antipodarum*, des crustacés tels que la daphnie *Daphnia magna* (historiquement la plus utilisée en écotoxicologie) ou le gammare (*Gammarus pulex*, *Gammarus fossarum*), ou encore le poisson zèbre (*Danio rerio*). Ce sont des espèces couramment utilisées lors de tests écotoxicologiques pour leur facilité d'élevage au laboratoire et de manipulation, leur sensibilité à certains types de contaminants et leur représentativité d'un maillon de la chaîne trophique. Dans le cadre de la DCE, l'état chimique est en partie assuré par le suivi des invertébrés, généralement par l'encagement de *Gammarus fossarum* (Note technique 2017).

Dans le cadre de ce travail, trois invertébrés aquatiques ont été sélectionnés : l'insecte *Chironomus riparius*, le crustacé *Gammarus fossarum* et le mollusque *Radix auricularia* (**Figure 4**). Cette approche multi-spécifique a pour objectif d'intégrer au mieux les

différences de sensibilité entre espèces. Ces espèces présentent une diversité de traits biologiques et écologiques, et appartiennent à deux embranchements (mollusques et arthropodes) qui représentent deux grands groupes phylogénétiques d'invertébrés. En effet, chez les invertébrés d'eau douce, l'embranchement le plus représenté est celui des arthropodes comptant pour environ 75 % de la biodiversité animale (incluant les insectes et crustacés). Le deuxième embranchement le plus représenté est celui des mollusques qui occupe environ 4 % de la biodiversité animale des milieux d'eau douce (Balian 2008, Boisseaux 2017).

Figure 4. Les trois invertébrés sélectionnés pour cette thèse : à gauche *C. riparius*, au milieu *G. fossarum* et à droite *R. auricularia* (Irstea).

Chironomus riparius

Taxonomie et répartition géographique

Dans l'ordre des Diptères, *Chironomus riparius* fait partie de la famille des *Chironomidae* et de la sous-famille des *Chironominae* (Tachet 2010). Il s'agit d'un organisme possédant une large aire de répartition, dans les zones tempérées de l'hémisphère Nord mais aussi dans les régions arctiques (Rasmussen 1984).

Position écologique

Aussi appelé « moustique non-piqueur », ses larves sont présentes dans les lacs, étangs et rivières, se nourrissant de la matière organique disponible dans les fines particules de sédiment (Rasmussen 1984, Moller Pillot 2009). Elles vivent dans des tubes composés de grains de sables (fourreaux). *C. riparius* tolère les environnements extrêmes (fortes températures, large gamme de pH, faible niveau en oxygène dissous (Armitage 1995)), faisant de lui un des organismes présents dans les sédiments benthiques. Les chironomes jouent un rôle important dans la chaîne trophique du fait qu'ils représentent une source importante de nourriture pour les poissons et les oiseaux (Armitage 1995).

Morphologie

Les chironomes ont un cycle de vie court d'une vingtaine de jours à 21 °C, comprenant quatre étapes (**Figure 5**) : le stade œuf (2 à 3 jours), le stade larvaire aquatique (12 jours), le stade nymphal (6 jours) et le stade adulte (3 jours). Après fécondation, la femelle dépose une masse gélatineuse à la surface de l'eau, contenant une centaine d'œufs qui écloront après quelques jours (deux à trois jours à 21 °C). Le mâle émerge avant la femelle, et il est plus petit (Wiklund 1977, Péry *et al.* 2002).

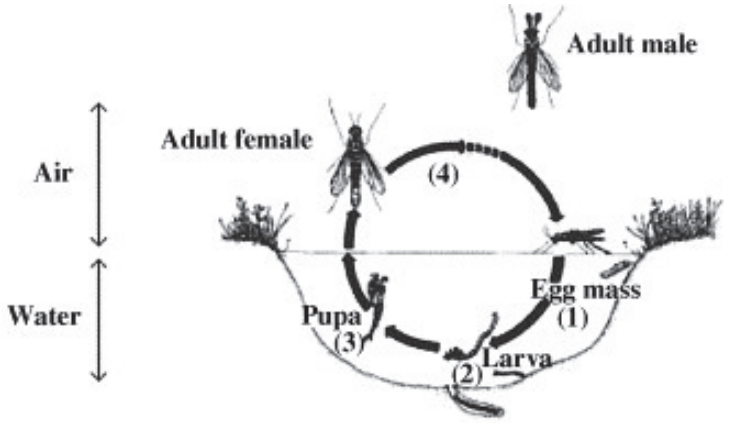


Figure 5. Cycle de vie du chironome : (1) oeuf, (2) larve, (3) nymphe et (4) adulte (Ali et Morris 1992).

Le cycle larvaire s'effectue en quatre mues successives, d'une durée totale d'une douzaine de jours. Le stade L1 (3ème et 4ème jours après la ponte) correspond à la larve obtenue juste après éclosion des masses (jours 2 à 3). Par la suite, cette larve va s'enfouir dans le sédiment et construire un fourreau (stade L2, jours 5 et 6). Au stade L3 (jours 7 et 8), la larve acquiert l'hémoglobine qui lui assurera sa couleur rouge et le transport de l'oxygène, lui permettant de vivre dans des environnements pauvres en oxygène. La larve se développe dans le sédiment jusqu'à la fin du stade L4, dernier stade larvaire (jours 7 à 14). C'est au stade larvaire que le chironome est en contact direct avec le sédiment et les matières en suspension, se nourrissant de la matière organique. Par ailleurs, il a été montré que la température influence le taux de croissance de cet organisme, mais n'a pas d'effet sur la reproduction et la survie pour les températures testées entre 15 et 27 °C (Péry et Garric 2006). La larve du stade L4 peut mesurer jusqu'à 3 cm, possédant une tête individualisée. Son thorax se compose de trois segments, dont le premier possède une paire de pseudopodes. L'abdomen présente quant à lui neuf segments, le dernier comportant quatre tubules ventraux impliqués dans la respiration. Son tube digestif est structuré en quatre parties (Craig 1998).

Pertinence en écotoxicologie

Le chironome est un organisme utilisé en écotoxicologie en raison de son cycle de vie court, sa croissance rapide, sa facilité d'élevage au laboratoire et sa sensibilité relative aux sédiments contaminés par les substances organiques. De plus, par son importance écologique dans la chaîne trophique (Armitage 1995), *C. riparius* est un organisme particulièrement approprié dans la perspective d'ERE lié à la bioamplification de contaminants persistants.

Cet organisme est le plus souvent utilisé au stade larvaire (généralement L2 ou L4) pour évaluer la toxicité aiguë et chronique de contaminants présents dans les sédiments mais aussi dans l'eau de surface (EPA 2000a, b, OECD 2004a, b, 2010). Ces tests consistent en l'étude de l'impact des polluants sur différents traits de vies de cet organisme, comme la survie et la croissance des larves ainsi que le nombre et le temps d'émergence au stade adulte pour ce qui est du test de toxicité aigüe (Naylor et Rodrigues 1995, Weltje *et al.* 2010). Concernant la toxicité chronique, des tests sur deux générations sont développés où différents traits de vie sont évalués : le nombre total d'émergences d'adultes pour les deux générations, les sex-ratios ainsi que le nombre et la fertilité des masses pondues (1ère génération). Les températures classiquement utilisées pour ces tests sont 15, 18, 21, 24 ou 27 °C (Péry et Garric 2006).

D'autres tests ont été développés, bien qu'ils ne soient pas standardisés, pour évaluer la biodisponibilité et la bioaccumulation des polluants. Au laboratoire, du fait de la courte durée de son stade larvaire, l'utilisation de *C. riparius* est réduite pour évaluer la toxico-cinétique des polluants. Cet organisme a toutefois été utilisé pour estimer des paramètres toxico-cinétiques de PCB (Lydy *et al.* 1994), de composés perfluorés (Bertin *et al.* 2014, Bertin *et al.* 2018), de produits phytopharmaceutiques (Kuhlmann *et al.* 2019), ou encore de composés métalliques (Ferrari *et al.* 2019). Sur le terrain (*in situ*), l'encagement de *C. riparius* permet d'évaluer la qualité des sédiments, de 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.* 2016a) ou encore de mesurer la bioaccumulation des métaux *in situ* (Bervoets *et al.* 2004, Ferrari *et al.* 2014) et des substances organiques (e.g. Babut *et al.* (2016a), Casado-Martinez *et al.* (2016)).

Gammarus fossarum

Taxonomie et répartition géographique

Dans l'embranchement des arthropodes, *Gammarus* est un genre de crustacés amphipodes de la famille des gammaridés. Il existe plus de 200 espèces (Väinölä *et al.* 2008)

dont la majorité évolue en eau douce. Trois espèces sont majoritaires dans les cours d'eau d'Europe occidentale (Macneil *et al.* 1997) : il s'agit de *Gammarus fossarum* (Koch, 1835), *Gammarus pulex* (Linnaeus, 1758) et *Gammarus roeseli* (Gervais, 1835). Leur distribution est influencée par des facteurs abiotiques tels que la température, la salinité, l'oxygène dissous, l'acidité et la pollution (Macneil *et al.* 1997). Dans le cadre de cette thèse, nous nous intéresserons à l'espèce *Gammarus fossarum*, abondante sur tout le territoire français à l'exception de la Bretagne, de la Corse et d'une partie de la Normandie (Piscart et Bollache 2012).

Position écologique

Gammarus fossarum est un organisme qui vit sur le substrat présent au fond des milieux aquatiques (organisme épibenthique), au niveau de galets ou graviers, ou encore de bryophytes, végétaux rivulaires et végétation morte (Felten *et al.* 2008, Tachet 2010). Leur espérance de vie est d'un à deux ans (Tachet 2010). Les gammares sont regroupés en populations de forte densité pouvant atteindre jusqu'à plusieurs milliers d'organismes au mètre carré (Felten 2003). Ils vivent dans des eaux entre 0 et 25 °C, la température létale pour une population étant de 25.8 °C (Roux et Roux 1967).

Les gammares jouent un rôle important dans la chaîne trophique. En effet, ils sont traditionnellement classés dans le groupe fonctionnel d'alimentation des déchiqueteurs (Felten 2003) du fait qu'ils recyclent la litière en la déchiquetant, broutent le biofilm organique et ingèrent des particules fines de matière organique provenant de dépôts de sédiments (Macneil *et al.* 1997). Plusieurs études ont montré une relation entre la présence de *Gammarus sp* et la décomposition des feuilles (Hieber et Gessner 2002, Maltby *et al.* 2002, Dangles *et al.* 2004). De ce fait, ils participent à la dégradation de la matière organique terrestre fixée dans les réseaux trophiques d'eau douce, contribuant au cycle du carbone et des nutriments, ainsi qu'à la redistribution de la matière et de l'énergie dans les écosystèmes aquatiques (Maltby et Crane 1994). Plus rarement, ils peuvent aussi adopter un comportement de prédation vis-à-vis d'autres macro-invertébrés, voire même de cannibalisme (Kelly *et al.* 2002). Les gammares représentent une importante source de nourriture pour plusieurs espèces de macro-invertébrés, poissons, oiseaux et amphibiens (Macneil *et al.* 1999). En effet, les poissons (notamment la truite *Salmo trutta* ou le chabot *Cottus cobio*) consommeraient plus de 60 % de la production annuelle de gammares de leurs habitats (Welton et Clarke 1980). Cela s'explique notamment par le fait que tout au long de l'année les gammares sont présents dans les milieux, pouvant pallier le manque d'insectes à certaines saisons (Macneil *et al.* 1999).

Morphologie

La taille des crustacés amphipodes peut considérablement varier d'une espèce à l'autre (6 à 25 mm), la taille maximale observée pour *Gammarus fossarum* étant de 14 mm (Pinkster 1972). Leur corps est caractérisé par un aplatissement latéral (Tachet 2010) et divisé en quatre parties (**Figure 6**, Piscart et Bollache (2012)) : la tête, le mésosome, le métasome et l'urosome.

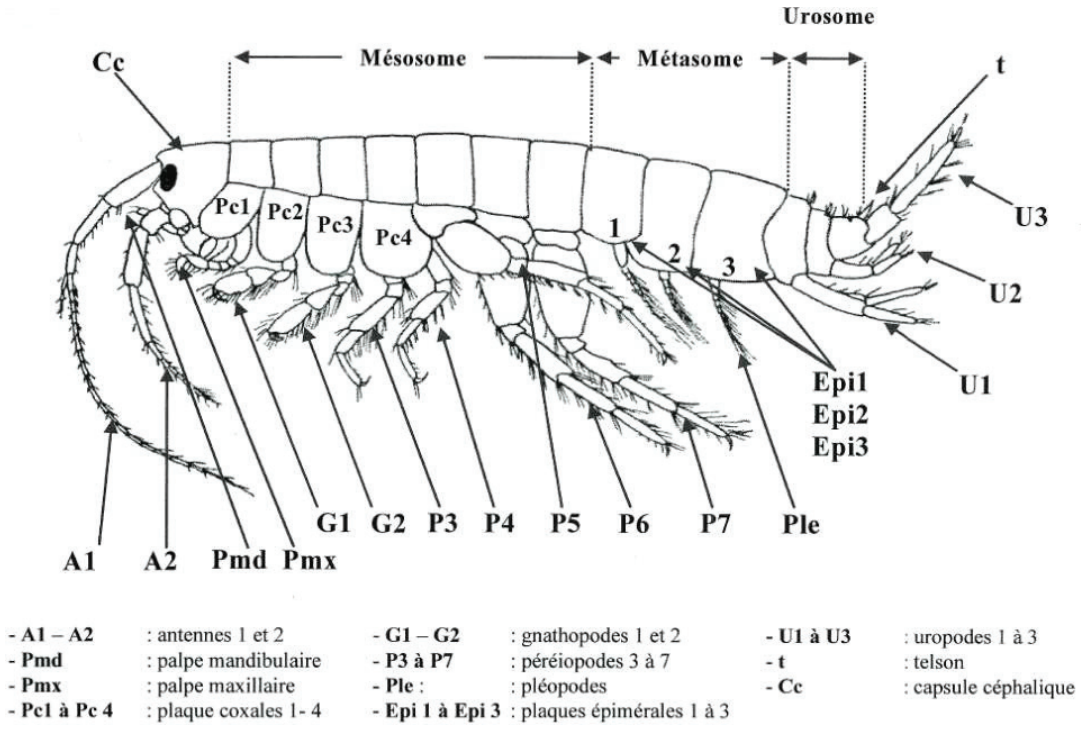


Figure 6. Morphologie de *Gammarus fossarum* (Piscart et Bollache 2012).

Le gammare est un organisme itéropare[3] à reproduction sexuée grandissant par mues successives. Les nouveau-nés grandissent et atteignent une maturité sexuelle au bout de plusieurs mues, à environ 4 mois à 12 °C (Welton et Clarke 1980). Le cycle de reproduction des femelles est parfaitement synchronisé avec le cycle de mue, où la fréquence entre deux pontes est contrainte par la fréquence des mues.

Le cycle de mue se subdivise en 6 stades (A, B, C1, C2, D1, D2) et le développement des embryons peut quant à lui être divisé en 5 stades (stades 1 à 5) (Geffard *et al.* 2010). La durée des cycles de mue et de reproduction sont dépendants de la température : lorsque la température augmente, la durée du cycle diminue. Par exemple, la durée de cycle de mue est de deux mois environ à 7 °C, d'une trentaine jours à 12 °C et d'une vingtaine de jours à 16 °C

[3] Se dit d'une espèce dont les femelles se reproduisent plusieurs fois dans leur vie.

(**Figure 7**, Geffard *et al.* (2010), Coulaud (2012)). Le cycle de reproduction des mâles quant à lui n'est pas connecté directement au cycle de mue et est beaucoup plus court que celui de la femelle : 7 jours après l'accouplement suffisent pour la restauration du stock de spermatozoïdes (Lacaze 2011).

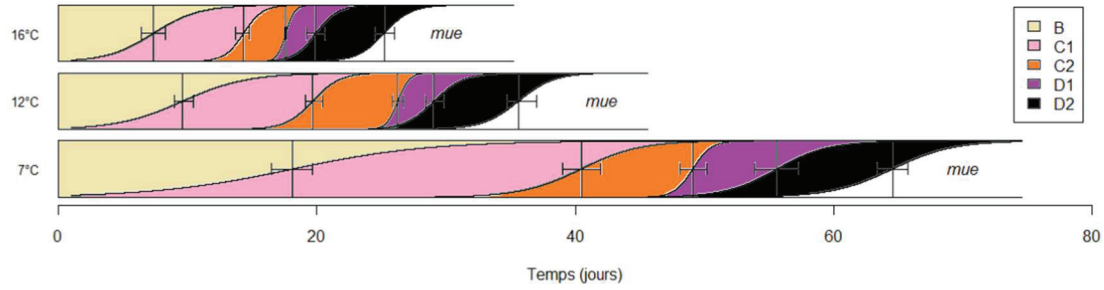


Figure 7. Durée (jours) des différents stades du cycle de mue de *G. fossarum* à trois températures : 7.0, 12.1 et 16.4 °C (Coulaud 2012).

Pertinence en écotoxicologie

Modèle biologique

Les gammares sont utilisés comme espèce modèle en écotoxicologie car (*i*) ils sont faciles à prélever et à manipuler, (*ii*) ils ont une large répartition géographique où ils sont abondamment retrouvés toute l'année au sein d'habitats divers, (*iii*) ils ont une grande importance écologique, (*iv*) ils ont un cycle de vie connu et relativement long pour intégrer les flux de contaminants (Charron 2014), (*v*) ils accumulent une large gamme de contaminants, notamment des composés métalliques (Urien *et al.* 2016) et des composés organiques comme les perfluorés (Bertin *et al.* 2016), les polybromodiphényl éthers (PBDE) (Besse *et al.* 2013b, Lebrun *et al.* 2014) ou encore de multiples xénobiotiques (Ashauer *et al.* 2012, Rösch *et al.* 2016), (*vi*) ils présentent un dimorphisme sexuel permettant l'identification sexuelle des individus et (*vii*) ils sont sensibles à de nombreux stress (Kunz *et al.* 2010). En effet, la revue bibliographique de Kunz *et al.* (2010) regroupe de nombreuses publications qui rapportent l'effets des polluants sur *Gammarus sp.*, aussi bien au niveau de son comportement, sa reproduction, son développement, son alimentation, sa structure populationnelle que les conséquences sur ses interactions avec ses prédateurs.

Outils pour l'évaluation de la toxicité et pour la biosurveillance des milieux

Les gammares sont utilisés dans les études écotoxicologiques, aussi bien au laboratoire que sur le terrain, dans de multiples scénarios d'exposition, afin d'évaluer la toxicité de

sédiments, d'eau ou d'effluents potentiellement contaminés (Kunz et al. 2010). Des biomarqueurs ont été développés pour évaluer l'impact des polluants sur *G. fossarum* :

- des marqueurs de toxicité générale, comme par exemple les effets sur la reproduction (Geffard *et al.* 2010), l'inhibition alimentaire et les effets sur le comportement (Coulaud *et al.* 2011). Notamment, il a été montré dans plusieurs études que les contaminants peuvent induire une diminution du taux d'alimentation chez le gammare, provoquant une diminution de leur croissance, de leur fécondité et de leur survie (Webster et Benfield 1986, Maltby *et al.* 2002). Pour mesurer l'effet sur l'alimentation, la consommation de feuilles est mesurée en corrigeant l'effet de la taille et de la température. Pour évaluer les effets sur la reproduction, des mesures biométriques peuvent être effectuées (fertilité, cycle de mue, superficie des œufs, Geffard *et al.* (2010)) ;
- des marqueurs de perturbation endocrinienne, notamment dans la désynchronisation de processus physiologiques tels que la mue, l'ovogénèse (croissance ovocytaire) et le développement embryonnaire (Geffard *et al.* (2010), Jubeaux *et al.* (2012)) ;
- des biomarqueurs de la neurotoxicité, comme par exemple l'inhibition de l'activité enzymatique acétylcholine estérase (AChE) spécifique de l'exposition aux insecticides (Xuereb *et al.* 2009). Pour mesurer l'effet neurotoxique, un dosage biochimique de l'activité enzymatique de l'AChE peut être effectué.

D'autre part, des bioessais actifs standardisés ont été développés afin de mesurer la bioaccumulation de substances chimiques dans les eaux de surface continentales, comme par exemple l'encagement *in situ* de gammares (AFNOR XP T90-721 Mars 2019). Ils permettent (*i*) une qualification et une priorisation des sites en fonction de leur contamination biodisponible et de leur toxicité ; (*ii*) un suivi des tendances de contamination biodisponible et de toxicité ; (*iii*) une mesure de substances prioritaires dans le biote dans le cadre de la DCE et/ou de substances spécifiques (Besse *et al.* 2013a, Alric *et al.* 2019).

Par ailleurs, *Gammarus sp.* est de plus en plus utilisé pour étudier la toxico-cinétique de divers contaminants, comme par exemple pour les composés métalliques (Lebrun *et al.* 2011, Lebrun *et al.* 2012, Urien *et al.* 2015), les HAP (Carrasco-Navarro *et al.* 2015), les composés perfluorés (Bertin *et al.* 2016), les PBDE (Lebrun *et al.* 2014) ou encore de multiples xénobiotiques (Ashauer *et al.* 2012, Rösch *et al.* 2016, Garcia-Galan *et al.* 2017, Miller *et al.* 2017, Fu *et al.* 2018).

Radix auricularia

Taxonomie et répartition géographique

Dans l'embranchement des mollusques, la classe des gastéropodes représente la seule classe dont les représentants ont colonisé le milieu terrestre avec succès (Zapata *et al.* 2014). Environ 4 000 espèces de gastéropodes d'eau douce sont présents sur tous les continents (à l'exception de l'Antarctique) et peuplent quasiment tous les types d'habitat dulcicole[4] (Strong *et al.* 2008). L'ordre des *Pulmonata* (gastéropode possédant des structures s'apparentant à des poumons) comprend aujourd'hui le sous-ordre des *Basommathophora* dont les trois familles principales sont : les *Physidae*, les *Planorbidae* et les *Lymnaeidae*. Leur poumon est richement vascularisé, pouvant se remplir d'air ou d'eau selon la disponibilité en dioxygène dissous (McMahon 1983). Dans la super-famille des *Lymnaeoidea*, la coquille est spiralée. La famille des *Lymnaeidae* est caractérisée par une torsion de la coquille (enroulement non-horizontal). Elle comporte 21 genres dont le genre *Radix* (Montfort 1810) constitué d'une dizaine d'espèces. Cinq espèces sont retrouvées dans le Nord-Est de l'Europe : *Radix ampla*, *Radix auricularia*, *Radix balthica*, *Radix labiata* et *Radix lagotis* (Feldmeyer *et al.* 2011, Pfenninger *et al.* 2011, Schniebs *et al.* 2011). Elles sont caractérisées par une plasticité écologique élevée, et présentes dans des masses d'eau de différents types (Vinarski *et al.* 2010). *Radix auricularia* est présente sur l'ensemble du territoire français (**Figure 8**) et plus généralement possède une répartition holarctique (Aksenova *et al.* 2017).

Position écologique

Le rôle des mollusques dulcicoles peut être prépondérant dans certains écosystèmes stagnants (mares, étangs), lacustres (lacs) et potamiques (cours d'eau de plaine ou rivière large à courant lent). En effet, ils peuvent représenter plus de 80 % de la biomasse totale des macro-invertébrés benthiques (Mouthon 1982). Les *Lymnaeidae* participent à la stabilisation du développement de la couverture algale et favorisent ainsi l'incidence de la lumière sur les fonds et donc la fabrication d'oxygène et la présence de nutriments dans le milieu (Coeurdassier *et al.* 2004).

[4] Habitat dulcicole : eau douce

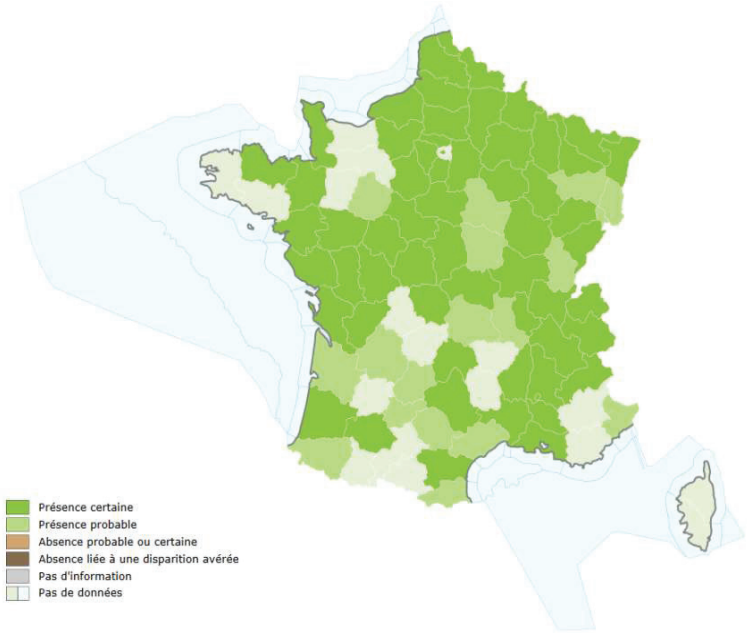


Figure 8. Répartition géographique de *Radix auricularia* (Inventaire National du Patrimoine Naturel).

R. auricularia est une espèce dulçaquicole, se retrouvant dans les milieux lentiques (à faible débit d'eau), stagnants et benthiques, riches en éléments nutritifs (algues, végétaux aquatiques, matière organique) et peu profonds. Sa température optimale est d'environ 20 °C, avec une large amplitude (± 13 °C) (Rossetti *et al.* 1989). Cet organisme se nourrit essentiellement de macrophytes vivants (végétaux aquatiques d'eau douce visible à l'œil nu) et de périphyton (mélange complexe d'algues, de cyanobactéries, de champignons et microbes hétérotrophes et de détritus), faisant de lui un brouteur (Tachet 2010).

Cet organisme est un consommateur primaire pouvant également devenir une proie appréciée des oiseaux (canards, hérons, mouettes, poules d'eau), poissons, arthropodes (écrevisses), annélides (planaires et sangsues) et de quelques amphibiens. De ce fait, il constitue un élément non négligeable de la chaîne alimentaire (Runck 2007), en tant que lien important entre les producteurs primaires et les consommateurs secondaires (Habdija *et al.* 1995). Il possède également un rôle majeur dans la distribution d'éléments entre l'eau et le sédiment, remontant régulièrement à la surface de l'eau pour respirer (A. Hussain 2012).

Morphologie

Les radix sont des organismes ectothermes, c'est-à-dire que la température du milieu va fortement influencer leur métabolisme. Leur croissance est continue mais pas uniforme : typiquement, elle est plus forte au printemps-été qu'en automne-hiver.

La coquille des mollusques est riche en carbonate de calcium et elle est le résultat d'une bio-minéralisation complexe (Marie 2008). Comme les escargots terrestres, les *Lymnaeidae* sont dotées d'un poumon, mais ne disposent d'aucun organe permettant une respiration dans l'eau. Leur mode de vie étant principalement aquatique, elles doivent remonter régulièrement à la surface pour respirer. Les radix se distinguent du genre des limnées par leur courte spire et leur lèvre extérieure qui est plus évasée. D'ailleurs, la détermination du genre *Radix* est toujours réalisée selon la morphologie de la coquille, de son enroulement et de la taille de l'ouverture. En particulier, l'espèce *R. auricularia* se différencie par sa coquille très arrondie et une pointe acérée. Cet organisme présente un corps gris noir, parsemé de petits points blanchâtres. Ses yeux se situent à la base de chacune des deux tentacules placés sur la tête de l'animal. Il se nourrit grâce à la présence d'une radula (langue râpeuse) présente sur la face ventrale de la bouche constituée essentiellement de muscles servant à la locomotion.

R. auricularia, comme la majorité des *Lymnaeidae*, est une espèce hermaphrodite simultanée qui se reproduit préférentiellement par allofécondation (Coutellec and Lagadic 2006). En condition de stress, la reproduction devient majoritairement asexuée. Sa durée de vie est de 1 à 2 ans en fonction des conditions environnementales : la température, la qualité de l'eau et l'abondance alimentaire conditionnent son espérance de vie et sa capacité reproductrice (Wayne 2001). Les *Lymnaeidae* pondent sur une plante ou une paroi une cinquantaine d'œufs groupés dans une masse gélatineuse de 15 à 30 mm de long, l'éclosion ayant lieu après une quinzaine de jours (Kupfer 2019).

Pertinence en écotoxicologie

Le deuxième embranchement le plus représenté chez les invertébrés d'eau douce est celui des mollusques. Il semble donc pertinent de s'intéresser à ces organismes en écotoxicologie aquatique. La famille des *Lymnaeidae*, et plus spécifiquement le genre *Lymnaea*, fait l'objet d'une ligne directrice de l'Organisation de Coopération et de Développement Economiques (OCDE) pour l'évaluation des effets de toxiques sur la reproduction (Bandow et Weltje 2012, Bouétard *et al.* 2012, Gust *et al.* 2013, Barsi 2015, Atli et Grosell 2016, Charles *et al.* 2016, OCDE 2016, Reátegui-Zirena et Salice 2018). Par ailleurs, la récente revue bibliographique d'Amorim *et al.* (2019) démontre que les *Lymnaeidae* sont des bons modèles en écotoxicologie aquatique, nécessitant toutefois une amélioration des connaissances, en particulier toxico-cinétiques.

Plus spécifiquement, *R. auricularia* fait partie des espèces les moins sensibles aux pollutions selon l'échelle de Mouthon (2001). Il possède une large répartition géographique

avec une importance écologique certaine et une commodité d'élevage au laboratoire. Par ailleurs, cet organisme est facile à prélever et à manipuler. Il a notamment été utilisé dans l'évaluation des effets de l'action ovicide du niclosamide (Parashar *et al.* 1995), de la toxicité aigüe de métaux lourd (Liu *et al.* 2013b, Al-Hassen *et al.* 2014) et du benzène (Farid et Farid 2011), de l'impact de nanoparticules sur le développement embryonnaire et post-embryonnaire (Ahmadov *et al.* 2017), dans le développement d'un biomarqueur moléculaire de la toxicité de métaux lourd (Almamoori *et al.* 2015) mais aussi dans la bioaccumulation d'éléments traces métalliques (Gundacker 2000, Ming 2006, Neeratanaphan 2008, Hong *et al.* 2014). En revanche, à ma connaissance, aucune information n'est disponible quant à l'étude toxico-cinétique de contaminants organiques. De ce fait, l'utilisation du radix dans notre étude a permis d'apporter de nouvelles données écotoxicologiques sur un mollusque encore peu étudié.

1.1.4 Contaminants organiques et impacts environnementaux

Un contaminant organique d'origine naturelle ou provenant de diverses activités humaines (agriculture, industrialisation, urbanisation, etc.) se retrouve dans les différents compartiments de l'environnement (air, sol, eau, sédiment). La classification du danger pour l'environnement de substances chimiques dépend de 4 propriétés : la persistance (dégradation lente), la bioaccumulation (accumulation dans les organismes), la toxicité (les effets nocifs sur l'environnement, le biote et les humains) et la mobilité (transport longue distance). Les polluants organiques persistants (POP) présentent de mauvais scores dans chacune de ces propriétés. Les plus connus sont les Polychlorobiphényles (PCB), les Polybromodiphényl éthers (PBDE) et certains produits phytopharmaceutiques. Lors de leur émission par différentes sources anthropiques, que ce soit atmosphériques, dans l'eau ou par épandage sur les sols, le milieu aquatique est *in fine* le réservoir terminal de ces polluants (**Figure 9**).

De par leurs propriétés physico-chimiques hydrophobes et lipophiles, les contaminants organiques hydrophobes se retrouvent associés aux particules, en particulier dans les sédiments. Les organismes benthiques vivent au contact direct de ces derniers contaminés. Ils se retrouvent ainsi avec de fortes teneurs en polluants en fonction de leur physiologie et de leur mode de vie. Les invertébrés sont par la suite consommés par des organismes de niveaux trophiques plus élevés, qui peuvent bioaccumuler ainsi les contaminants hydrophobes, principalement au niveau de leurs tissus adipeux.

Dans le cadre de cette étude, quatre contaminants organiques ont été choisis pour diverses raisons qui seront développées ci-dessous. Il s'agit du PCB 153, de deux retardateurs de flamme que sont l'HBCD et le BDE 99, ainsi que le pyrène, un HAP.

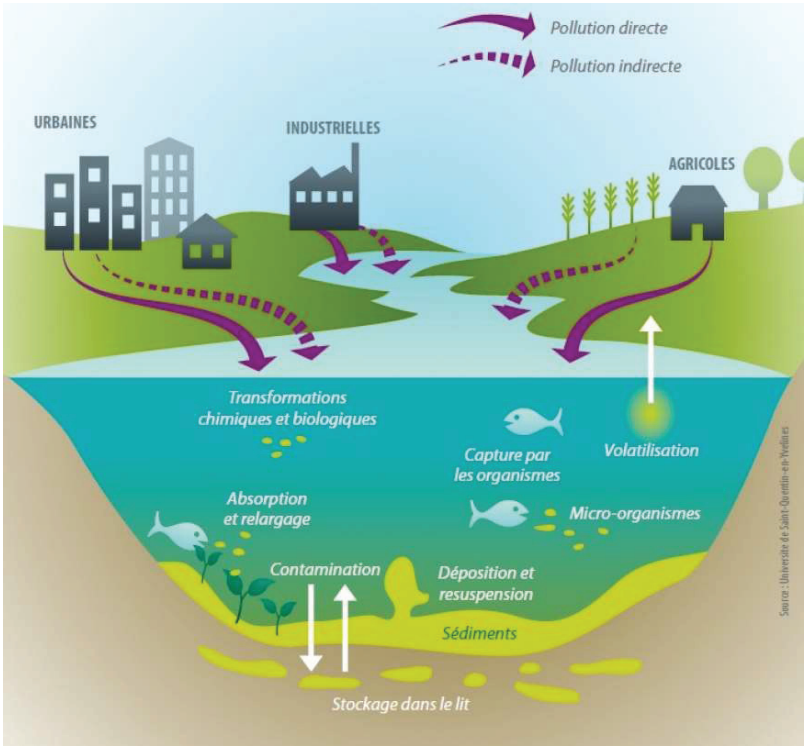
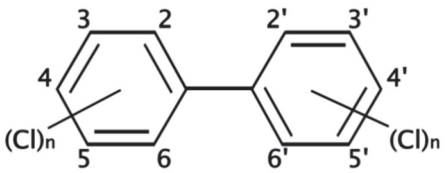


Figure 9. Schéma du devenir des POP dans le milieu aquatique (Université de Saint-Quentin-en-Yveline).

PCB 153

Propriétés physico-chimiques

Les PCB constituent une famille de 209 composés aromatiques organochlorés de formule brute $C_{12}H_{10-n}Cl_n$ (avec $1 \leq n \leq 10$). Ils se composent d'un noyau aromatique biphényle ($C_{12}H_{10}$) sur lequel un à dix atomes de chlore se substituent aux atomes d'hydrogène (**Figure 10**).



2,2',6,6': position ortho
3,3',5,5': position méta
4,4': position para

Figure 10. Structure chimique générale d'un PCB.

Les 209 congénères de PCB sont répartis selon deux catégories suivant leur affinité à un récepteur biologique spécifique (récepteur d'aryl d'hydrocarbone - Ah[5]), dont l'activation entraîne divers effets, dont les effets tératogènes : les PCB de type dioxine (PCB dioxin-like ou PCB-DL) et les autres PCB (PCB non dioxin-like ou PCB-NDL). Les 12 PCB-DL (PCB 77, 81, 105, 114, 118, 123, 126, 156, 157, 167, 169 et 189) sont comparables aux polychloro-dibenzodioxines puisqu'ils sont capables de se lier au même récepteur cellulaire que celles-ci. Néanmoins, ce sont les moins abondants dans les mélanges industriels et dans les matrices environnementales. En 1982, 7 PCB indicateurs (PCB_i) parmi les 209 congénères ont été sélectionnés par le Bureau Communautaire de Référence de la Commission Européenne comme étant les composés à rechercher en priorité dans les analyses de matrices organiques, dans l'objectif de caractériser l'ensemble du spectre des PCB sans passer un temps exagéré à déterminer les concentrations d'un nombre important de congénères. Les PCB_i sont abondants dans l'environnement, représentés le plus souvent par les PCB 138, 153 et 180. Plus particulièrement, le PCB 153 (numéro CAS : 35065-27-1) se compose de 6 atomes de chlores. Sa structure chimique ($C_{12}H_4Cl_6$) est présentée **Figure 11**.

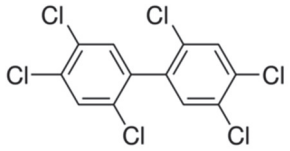


Figure 11. Structure du PCB 153.

Les PCB ont pour propriétés physico-chimiques d'être stables thermiquement (< 1 000 °C), stables chimiquement (peu sensibles aux acides, bases et oxydants), et ils sont ininflammables, d'où leur utilisation en isolation thermique dans les transformateurs électriques de puissance. Le PCB 153 est un contaminant persistant très hydrophobe (logarithme du coefficient de partage octanol-eau : $LogK_{ow}$ = 7,22, INERIS (2009)) pratiquement insoluble dans l'eau (solubilité dans l'eau : 0,86 µg L^{-1} à 25 °C) mais très soluble dans les lipides ; et *a priori* non métabolisable par les invertébrés benthiques d'eau douce (Schuler *et al.* 2003) et par les poissons (Boon *et al.* 1997).

[5] **Récepteur Ah**: protéine à l'intérieur d'une cellule se complexant aux hydrocarbures d'Aryl, pénétrant ainsi le noyau de la cellule. Ce complexe contrôle, dans le noyau, la production de protéines, dont certaines sont associées à la croissance cellulaire et la différenciation. Ces récepteurs ont tendance à se lier aux polychlorodibenzo-dioxines et aux PCB-DL, qui peuvent entraîner des changements dans l'expression génétique, ayant ainsi des répercussions sur la croissance, la forme et le fonctionnement des cellules. C'est pour cette raison que les PCB-DL peuvent être cancérigènes ou tératogènes.

Historique, applications et usages

En 1881, Schmidt et Schlulz ont été les premiers à synthétiser les PCB (Tanabe 1988). A partir des années 1930, les producteurs Monsanto (Etats-Unis), Bayer (Allemagne de l'Ouest) et Prodelec (France) ont développé leur fabrication industrielle. Les PCB ont principalement été utilisés dans les industries comme fluides diélectriques (liquide isolant et caloporteur) dans les transformateurs et les condensateurs, ou encore comme lubrifiants dans les turbines et les pompes, les soudures, les adhésifs ou les peintures. Leurs propriétés physico-chimiques ont permis leurs diverses utilisations industrielles (PNUE 2010).

Réglementation

De nombreuses inquiétudes et craintes ont été soulevées dans le début des années 1970 par la découverte des PCB dans l'environnement (Jensen 1966, 1972). Suite aux accidents empoisonnant la population par des huiles de cuisine contenant des PCB au Japon dans la province de Fukuoka en 1968 et à Taïwan en 1979 (Carrier *et al.* 2006), ainsi que les effets environnementaux observés, la réglementation des PCB s'est mise en place progressivement. En France, l'interdiction de la production, l'utilisation et la vente de ces substances, de même que leur élimination, résulte de la transposition des directives 76/769/EEC, 85/467/EEC et 96/59/EC complétée par des règlements spécifiques (76/769/EEC, Gramaglia et Babut 2014).

La transposition de ces textes réglementaires européens a conduit à une note technique précisant la mise en œuvre du suivi des substances de l'état chimique des eaux de surface dans le biote. Elle précise les modalités de suivi pour le second cycle 2016-2021 de la DCE (2013/39/CE). Une valeur seuil pour l'autorisation de remise à l'eau des sédiments de dragage a été établie à 680 ng g^{-1} poids sec (ps) pour l'ensemble des PCB_i (Programme d'actions 2011-2013). Suite aux données du plan national, une valeur seuil pour le sédiment de 50 ng g^{-1} ps pour la ΣPCB_i a été proposée (Mathieu et Babut 2012). Pour le PCB 153 spécifiquement, Lopes *et al.* (2012) ont prédit une concentration maximale dans les sédiments, entre 0,2 et 0,8 ng g^{-1} ps selon l'espèce de poisson considérée, pour laquelle un poisson peut être exposé sans que cela dépasse le critère de référence pour sa consommation. Cette valeur est confirmée par Mathieu et Babut (2012), où une concentration seuil dans le sédiment de 1,13 ng g^{-1} ps a été calculée pour le PCB 153 calibrée sur la protection du barbeau.

Dans le cadre du Règlement n°1259/2011 (2011) de la commission, une norme a été établie pour les concentrations en PCB-NDL (PCB-28, -52, -101, -138, -153, -180) de 75 ng g^{-1} pf pour la chair musculaire des poissons issus de la pêche et produits dérivés

destinée à la consommation, 125 ng g^{-1} pf pour la chair musculaire de poisson d'eau douce sauvage capturé et 300 ng g^{-1} pf pour la chair musculaire d'anguille sauvage.

Impacts et risques environnementaux

Malgré leurs interdictions de fabrication depuis 40 ans, les PCB restent très persistants dans l'environnement car ils sont peu biodégradables. En effet, leur temps de demi-vie est de plusieurs dizaines voire centaines d'années. En raison de leur faible solubilité dans l'eau, la toxicité aiguë des PCB s'avère être faible pour les organismes aquatiques.

Niveaux de contamination dans les sédiments et le biote aquatique

Une cartographie a été réalisée indiquant géographiquement les niveaux de concentrations en PCB dans les sédiments fluviaux et estuariens (ONEMA (2014), **Figure 12**). Par ailleurs, l'Observatoire des Sédiments du Rhône créé en 2009 rassemble les données des pollutions sédimentaires pour l'ensemble du fleuve (Thollet *et al.* 2018).

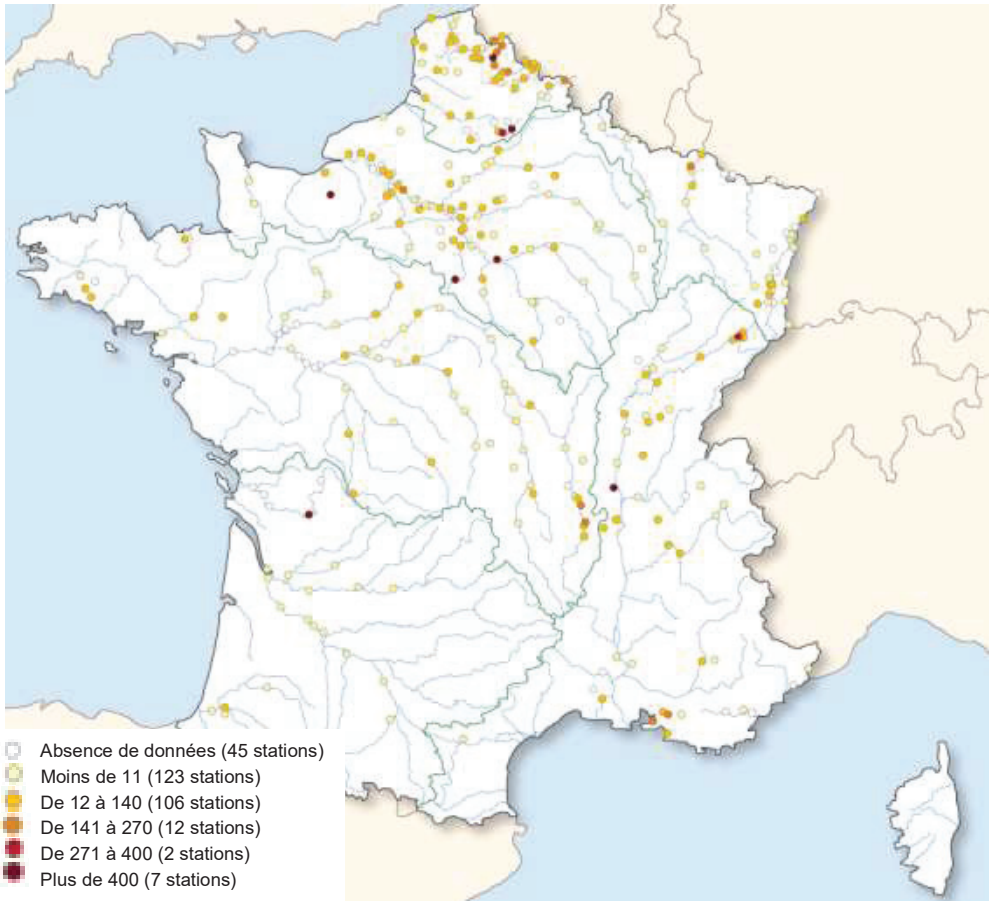


Figure 12. Cartographie de la contamination des sédiments fluviaux et estuariens par les PCB_i en France métropolitaine (µg kg^{-1} ps). Données de 2008 à 2010 du plan national d'échantillonnage PCB (©ONEMA, 2014).

Les différents niveaux de concentrations en PCB 153 dans les sédiments et dans le biote aquatique ayant fait l'objet s'un suivi en France sont reportés dans le **Tableau 2**. Par ailleurs, plusieurs études toxico-cinétiques ont été menées sur l'exposition d'invertébrés au PCB 153 (Mum *et al.* 1983, Pinkney *et al.* 1985, Hwang *et al.* 2001, Schuler et Lydy 2001, Schuler *et al.* 2003, Salmelin *et al.* 2016, Sidney *et al.* 2016).

Tableau 2. Niveaux de concentration en PCB 153 dans les sédiments et dans les invertébrés (sauf indication) disponibles dans la littérature.

Etude	**Niveaux de concentration dans le sédiment** (ng g^{-1} ps)	**Niveaux de concentration dans le biote** (ng g^{-1} pf)	**Localisation**
Thollet *et al.* (2018)	moyenne : 58,3 4 - 336		Bassin RMC
Mourier *et al.* (2014)	11,5 – 417 (ΣPCB_i)		Rhône
Lopes *et al.* (2012)	15 - 28	Chironome[a] > 100 Gammare[a] : 80 Corbicule[a] : 15	Région lyonnaise
ONEMA (2014)		Chaire de poisson moyenne : 41,8 1.62 - 426	Bassin RMC
Alric *et al.* (2019)		Gammares encagés moyenne : 24,6 1,16 - 323 ng g^{-1} ps	Données nationales
Brunet (2007)	12 - 165		Allemagne

[a] Concentrations prédites

Hexabromocyclododécane

Propriétés physico-chimiques

L'HBCD (1,2,5,6,9,10-hexabromocyclododecane, CAS : 3194-55-6) est un retardateur de flamme présent dans les mélanges commerciaux sous la forme de trois diastéréoisomères majoritaires, à savoir le α-, β- et γ-HBCD (**Figure 13**). Il se compose d'une structure cyclique de 12 carbones auxquels sont rattachés 6 atomes de brome ($C_{12}H_{18}Br_6$). Selon la méthode de fabrication et de production, l'HBCD commercial se compose du γ-HBCD qui est le diastéréoisomère avec les proportions les plus élevées (75 à 89 %), de l' α -HBCD (10 à 13 %) et du β -HBCD (1 à 12 %) (Covaci *et al.* 2006a). Ce contaminant est lipophile et hydrophobe ($logK_{ow}$ = 5,62), il possède une forte affinité aux matières particulaires et une

faible solubilité dans l'eau (ΣHBCD : 0,07 mg L^{-1}). Concernant les diastéréoisomères, la solubilité dans l'eau est entre deux et trois fois plus élevée pour l'α-HBCD (α : 0,05 ; β : 0,015 ; γ : 0,002 mg L^{-1}, Marvin *et al.* (2011)). L'isomérisation des diastéréoisomères β- et γ-HBCD en α-HBCD a été démontrée sous haute température (Peled *et al.* 1995) et à la lumière (Stuart *et al.* 2008).

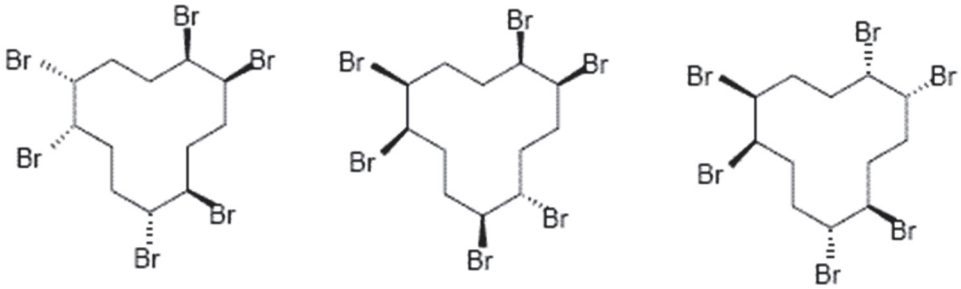


Figure 13. Structure chimique de l'hexabromocyclododécane.

Historique, applications et usages

Au niveau industriel, l'HBCD s'est retrouvé sur le marché dès la fin des années 1960. La société BASF fut la première à utiliser l'HBCD pour produire des mousses ignifugées (anti-feu) dans la fin des années 1980. Il est produit en Chine, Europe, Japon et aux Etats-Unis. En 2001, l'HBCD fut le troisième retardateur de flamme bromé le plus utilisé au monde au cours de la décennie précédente (Bilitewski *et al.* 2012). Dans cette même année, l'Europe était le plus gros consommateur d'HBCD avec une demande de plus de la moitié du volume du marché international (9 500 des 16 500 tonnes) (Bilitewski *et al.* 2012, Koch *et al.* 2015). Il a été utilisé comme retardateur de flamme dans les différents processus industriels (production, formulation et utilisation). Il se retrouve majoritairement dans les mousses d'isolation des bâtiments et d'emballages, et à moindre échelle dans les tissus d'ameublement, le textile, ainsi que dans les équipements électroniques et électriques (e.g. télévisions et réfrigérateurs). Il fait partie des BFRs appliqués comme additifs, c'est-à-dire qu'il est ajouté dans les matériaux à ignifuger sous forme de mélange, sans liaison covalente (Law *et al.* 2006a, ECHA 2008).

Réglementation

En juin 2008, la Norvège a suggéré d'ajouter l'HBCD comme possible POP dans la liste de l'annexe A de la convention de Stockholm où il a finalement été inscrit en 2013. L'utilisation et la production de l'HBCD est interdite depuis août 2015 dans l'Union

Européenne (Règlement n°143/2011). Dans le cadre de la DCE (2013/39/CE), une NQE_{biote} de 167 ng g^{-1} pf a été déterminée.

Pour *Lumbriculus variegatus* et *Chironomus riparius*, la plus forte concentration testée à laquelle aucun effet sur l'organisme n'a été observé (NOEC) a été déterminée à 8,6 mg kg^{-1} ps (normalisé à 5 % de carbone organique, CO) dans le sédiment, soit 430 ng g^{-1} ps (Oetken *et al.* 2001). Pour *Hyalella azteca*, la NOEC est de 1 000 mg kg^{-1} ps normalisé à 5 % de CO dans le sédiment, soit de 50 mg kg^{-1} ps (Thomas *et al.* 2003). Ainsi, la plus forte concentration de la substance sans risque pour l'environnement (PNEC) pour le sédiment a été fixée à 43 ng g^{-1} ps (ou 0,86 mg kg^{-1} ps normalisé à 5 % de CO).

Impacts et risques environnementaux

Lors de sa production et de sa fabrication, mais également lors du transport, de son utilisation et de son stockage, l'HBCD peut se retrouver dans l'environnement. Lorsque les bâtiments dotés de mousses d'isolation contenant de l'HBCD (polystyrène : XPS, EPS) seront détruits, on peut supposer que cela induira un important risque d'émission d'HBCD dans l'environnement. Aussi, l'utilisation d'HBCD comme additif ignifuge dans les textiles peut mener à une contamination de l'eau de surface lors du lavage du tissu (ECHA 2011).

A cause de ses propriétés physico-chimiques, et particulièrement de par sa forte hydrophobicité, l'HBCD se lie fortement aux particules du sédiment (Covaci *et al.* 2006a). L'HBCD est persistent dans l'environnement, se bioaccumule dans les poissons, oiseaux et mammifères. D'ailleurs, les teneurs mesurées en HBCD dans les plus hauts niveaux de la chaîne trophique dans les régions sources (Europe, Japon, Chine) comme éloignées soulèvent une préoccupation importante pour la santé humaine et l'environnement. L'HBCD est retrouvé dans le sang, le plasma et les tissus adipeux. Il est fréquemment détecté dans les produits animaux (viandes, œufs, lait), certes à des doses généralement inférieures à 1 ng g^{-1} poids lipidique (pl) et sans risque pour la santé humaine (Efsa 2011), mais devenant une source majeure de l'exposition des consommateurs.

Niveaux de concentration dans les sédiments et le biote aquatique

Le **Tableau 3** résume les niveaux de concentration en ΣHBCD dans les sédiments européens et dans le biote aquatique disponibles dans la littérature. Dans les sédiments, le γ-HBCD est le plus quantifié, correspondant aux proportions du mélange commercial (Hong *et al.* 2010, Zhang *et al.* 2013, Zhang *et al.* 2017).

Tableau 3. Niveaux de concentration en ΣHBCD (sauf indication) disponibles dans la littérature dans les sédiments européens et le biote aquatique.

Etude	Niveaux de concentration dans le sédiment (ng g^{-1} ps)	Niveaux de concentration dans le biote (ng g^{-1} pf)	Localisation
Liber *et al*. (2019)	Jusqu'à 26,1		Rhône, France
Rudel *et al.* (2017)	Jusqu'à 12,6		Rhône, France
Ichihara *et al.* (2014)	0,88 – 4,8		Angleterre
Kilemade *et al.* (2005)	0,4 – 5,3		Irlande
Eljarrat *et al.* (2004)	Jusqu'à 514		Espagne
Remberger *et al.* (2004)	0,2 – 1,5		Suède
Thorsten *et al.* (2008)	0,99 – 19,8 ng g^{-1} COT		Allemagne
Kohler *et al.* (2008)	2,5		Suisse
Lauzent (2017)	14 - 71	gammares encagés jusqu'à 0,02	France
Verslycke *et al.* (2005)		*Neomysis intege*	Pays-Bas
Janák *et al*. (2005)		crevettes grises α-HBCD : 0,196 – 0,266 γ-HBCD : jusqu'à 0,126	ouest de l'estuaire de l'Escaut, Pays-Bas

Par ailleurs, les études de bioaccumulation de l'HBCD chez les invertébrés aquatiques sont, d'une façon générale, peu nombreuses comparées à celles des poissons. Contrairement au profil sédimentaire, l'α-HBCD est l'isomère majoritaire dans le biote, particulièrement dans les plus haut niveaux de la chaîne alimentaire aquatique (Law *et al.* 2014). La biotransformation de l'HBCD, principalement la débromination, semble très spécifique à l'espèce (Brandsma *et al.* 2009, Esslinger *et al.* 2011, Abdallah *et al.* 2014). Par ailleurs, il a

été montré une débromination préférentielle du γ-HBCD par le cytochrome P-450 (CYT-P450) par rapport à l'α-HBCD chez la souris (Hakk *et al.* 2012), pouvant suggérer une explication pour la plus forte proportion en α-HBCD chez les espèces aquatiques (Koch *et al.* 2015).

Quelques études toxico-cinétiques chez les poissons exposés à l'HBCD sont disponibles dans la littérature, entre autres l'étude de Law *et al.* (2006a), où des juvéniles de truites arc-en-ciel ont été exposés pendant 56 jours à de la nourriture contaminée. Ce sont les premiers à avoir mis en évidence la bio-isomérisation des β- et γ-HBCD en α-HBCD chez le poisson. Par la suite, l'étude de Du *et al.* (2012) chez le poisson zèbre suggère une bioaccumulation dépendante à la concentration et a également démontré une bio-isomérisation du γ- au α-HBCD chez cet organisme. Dans l'étude de Zhang *et al.* (2014), où la carpe commune est exposée pendant 30 jours à de l'eau et à de la nourriture contaminées, les niveaux en α-HBD sont plus élevés qu'en β- et γ-HBCD, confirmant également le processus de bio-isomérisation chez cette espèce.

Chez les invertébrés benthiques d'eau douce, aucune étude TK n'a *a priori* été menée jusqu'à présent. De plus, la bio-isomérisation n'a pas été étudiée pour ce niveau trophique.

Concernant les invertébrés marins, Shi *et al.* (2017) ont exposé le copépode *Tigriopus japonicus* à de l'eau contaminée en ΣHBCD où les proportions en α-, β- et γ-HBCD sont très proches de celles retrouvées dans la solution de dopage (mélange commercial), suggérant une absence de bio-isomérisation chez cette espèce.

Polybromodiphényl éthers

Propriétés physico-chimiques

Les PBDE (polybromodiphényl éthers) constituent une classe majeure des retardateurs de flammes bromés. Ils peuvent contenir deux à dix atomes de brome. Ils sont au nombre de 209, principalement distribués sous forme de mélanges commerciaux. Les congénères les plus représentés dans ces mélanges sont les suivants : BDE 28, 47, 99, 100, 153, 154, 183 et 209 (ANSES 2016). Parmi ces congénères, deux nous intéressent particulièrement (**Figure 14**), le BDE 99 (penta-BDE, $C_{12}H_5Br_5O$, N° CAS : 60348-60-9) et -47 (tétra-BDE, $C_{12}H_6Br_4O$, N° CAS : 5436-43-1). Ce sont des composés lipophiles et hydrophobes ($\log K_{ow}$ = 6,84 et 6,77 pour le BDE 99 et -47 respectivement), peu solubles dans l'eau (2,4 et 10,9 µg L^{-1} à 25 °C respectivement).

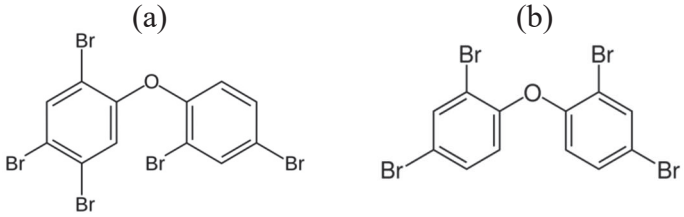


Figure 14. Représentation des structures chimiques du (a) BDE 99 et (b) BDE 47.

Historique, application et usages

Depuis les années 1970, les PBDE étaient utilisés pour ignifuger les matières plastiques, les textiles et les équipements électriques. Les trois mélanges industriels d'usage courant étaient nommés d'après le congénère prédominant :

- Le mélange penta-BDE (majoritairement des PBDE à 4, 5, 6 atomes de brome), qui servait principalement à ignifuger les mousses de polyuréthane (OMS 1994) ;
- Le mélange octa-BDE (majoritairement des PBDE à 7 et 8 atomes de brome) qui s'utilisait principalement dans les résines acrylonitrile-butadiène-styrène des ordinateurs et des appareils électroménagers (OMS 1994, Union Européenne 2003) ;
- Le mélange déca-BDE (majoritairement des PBDE à 9 et 10 atomes de brome) qui s'utilisait principalement dans le polystyrène des appareils électriques et électroniques, des tissus d'ameublement et des rideaux (OMS 1994).

La production totale de PBDE est estimée entre 1 300 000 et 1 500 000 tonnes depuis 1970 jusqu'à 2005 (UNEP 2010).

Réglementation

En raison de leur persistance dans l'environnement, leur fabrication est interdite et l'importation, l'utilisation et la vente des produits industriels contenant les plus préoccupants d'entre eux (penta- et octa-BDE) sont restreintes depuis 2008 au Canada et depuis fin 2004 aux États-Unis. La mise sur le marché d'articles contenant des concentrations supérieures à 0,1 % en masse des mélanges commerciaux Penta-BDE et Octa-BDE est interdite en Europe depuis 2004 (2003/11/CE). Dans l'Annexe A de la convention de Stockholm, les Tétra- et Penta-BDE ont été inscrit depuis 2009. En 2017, le Déca-BDE y a également été répertorié.

Dans le cadre de la directive prise en application de la DCE (2013/39/CE), une NQE_{eau} est définie à 0,5 ng L^{-1}, qui correspond au mélange des BDE-28, -47, -99, -100, -153 et -154. Une NQE_{biote} a également été définie à 0,0085 ng g^{-1} pf sur la base des recommandations de

l'EFSA en matière de protection des consommateurs. Concernant la matrice sédimentaire, aucune NQE n'a été définie mais une valeur seuil indicative a été calculée à 6 ng g^{-1} ps[6]. Ces concentrations sont souvent voir systématiquement dépassées en Rhône-Alpes (Babut *et al.* 2011, Perceval et Babut 2012, Besse *et al.* 2013b), et pour six rivières allemandes, les normes de qualité ont été dépassés pour les PBDE sur l'ensemble des sites étudiés entre 1995 et 2014 (Fliedner *et al.* 2016). Du fait de leurs caractéristiques lipophiles, il a été montré que les produits alimentaires tels que les poissons ou les huiles riches en lipides contenaient des concentrations relativement élevées de PBDE, constituant ainsi une voie d'exposition importante pour l'homme (Frederiksen *et al.* 2009).

Impacts et risques environnementaux

Dans l'environnement, les PBDE fortement bromés sont susceptibles d'être métabolisés (débromination) en congénères moins bromés. Ce processus a été étudié dans les poissons, où les BDE 47 et -100 présentent les proportions les plus élevées parmi l'ensemble des PBDE dans le biote aquatique. En effet, une débromination a été mise en évidence chez plusieurs espèces comme la carpe commune (*Cyprinus carpio*) avec une métabolisation du BDE 99 en BDE 47 (Stapleton *et al.* 2004), le touladi (*Salvelinus namaycush*), la truite arc-en-ciel (*Oncorhynchus mykiss*) ou le saumon royal (Tomy *et al.* 2004b, Roberts *et al.* 2011) (**Figure 15**).

Niveaux de concentration dans les sédiments et dans le biote aquatique

Le **Tableau 4** donne au niveau européen les concentrations en PBDE observées dans les sédiments et le biote. A l'échelle mondiale, le BDE 209 est le congénère le plus quantifié dans les sédiments, reflétant une utilisation importante du mélange commercial Deca-BDE, qui d'ailleurs fut le plus longtemps autorisé sur le marché (Martellini *et al.* 2016, Iqbal *et al.* 2017). Chez les invertébrés, les concentrations en PBDE sont variables (Covaci *et al.* 2003, Law *et al.* 2003, Van Ael *et al.* 2012, Sutton *et al.* 2019). Un profil des PBDE accumulés dans les invertébrés semble ressortir, et notamment le congénère majoritaire, le BDE 47, provenant potentiellement de la débromination du BDE 99 ou -153. Pour les gammares, l'étude de Lebrun *et al.* (2014) est la seule rapportant des données cinétiques.

[6] La valeur seuil dans les sédiments est une valeur calculée à partir de la valeur seuil dans l'eau selon [VSsed] = [VSeau] x (0,696 + 0,022 Koc) - Circulaire DCE 2005/12 relative à la définition du "bon état" et à la constitution des référentiels pour les eaux douces de surface, en application de la directive européenne 2000/60/DCE du 23 octobre 2000, ainsi qu'à la démarche à adopter pendant la phase de transitoire (2005-2007).

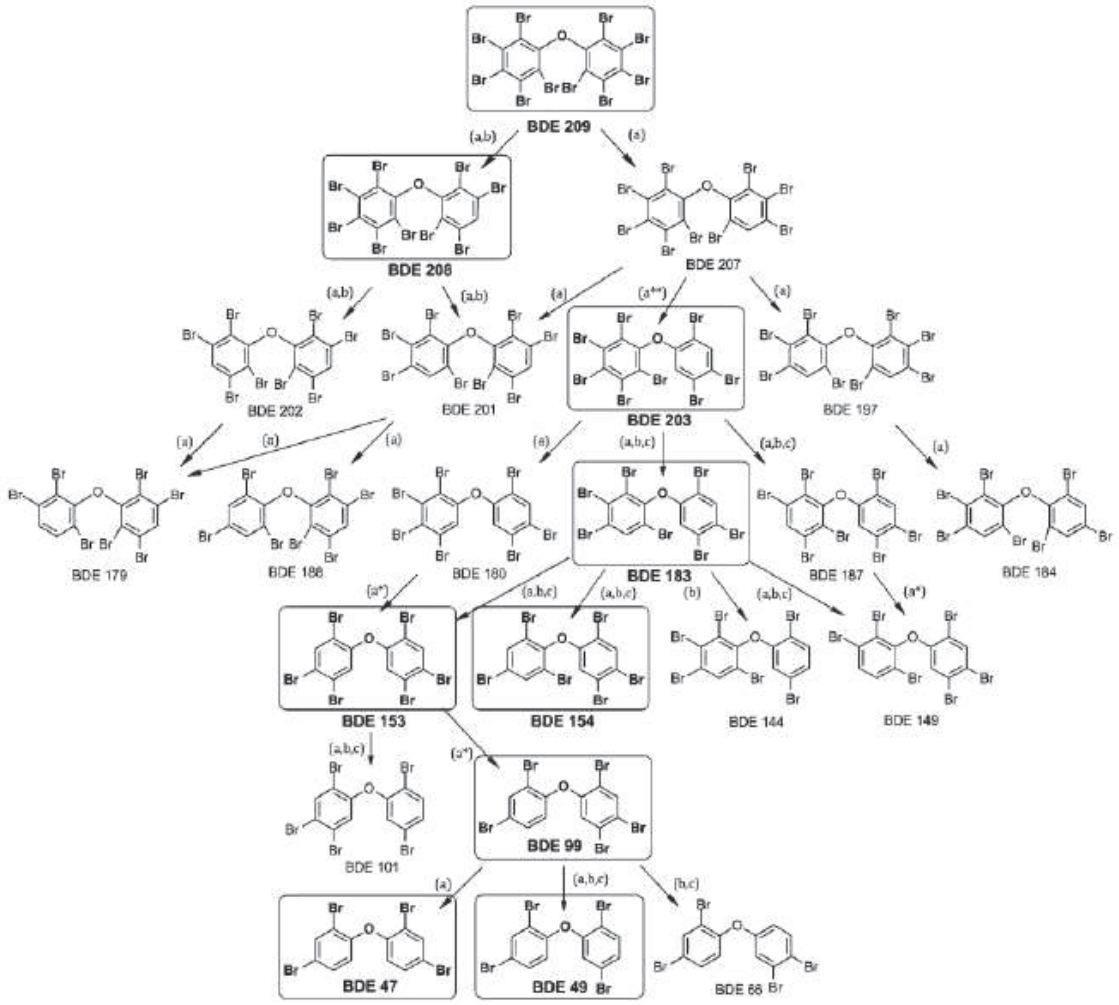


Figure 15. Métabolisation du BDE-209 par différentes espèces de poissons (la carpe *Cyprinus carpio*[a], la truite arc-en-ciel *Oncorhynchus mykiss*[b], et le saumon royal *Oncorhynchus tshawytscha*[c]). (Roberts *et al.* 2011)

Tableau 4. Niveaux de concentration en PBDE disponibles dans la littérature dans les sédiments européens et le biote aquatique.

Etude	Niveaux de concentration dans le sédiment (ng g^{-1} ps)	Niveaux de concentration dans le biote (ng g^{-1} pf)	Localisation
Labadie *et al.* (2010)	ΣPBDE : 3,1 - 15,1 BDE 99 : 0,34 et 2,99 BDE 47 : 0,19-0,78		Essonne
Teil *et al.* (2014)	BDE 99 : jusqu'à 6,7 BDE 47 : 0,18 – 3,6		Orge et Seine
Wiest *et al.* (2018)	ΣBDE 47,-99,-183,-209 : 8 – 286		Lyon
Loizeau *et al.* (2017)	BDE 99: 0,04 (0,02-0,12) BDE 47 : 0,016-0,10		Léman, Suisse-France
de Wit (2002)	BDE 99 : jusqu'à 7 BDE 47: jusqu'à 6,2		rivières européennes
Barón *et al.* (2014)	ΣPBDE : 164 - 186		Espagne
Luigi *et al.* (2015)	ΣPBDE : jusqu'à 3132		Italie
Iqbal *et al.* (2017)	BDE 99 : jusqu'à 44 BDE 47 : jusqu'à 19		Espagne
Voorspoels *et al.* (2003)		invertébrés (ΣPBDE) 0,2 à 30	estuaire de l'Escaut, Belgique / Pays-Bas
Van Ael *et al.* (2012)		crustacés (ΣPBDE) 0,05 – 3,24	
Verslycke *et al.* (2005)		crevettes BDE 99 : 8,3 à 12 BDE 47 : 9,6 à 13	Pays-Bas
Viganò *et al.* (2009)		gammares (BDE 99) 1,75 à 413 ng g^{-1} pl	Italie
Tlili *et al.* (2012)	Σtri-heptaPBDE : 0,03 – 1,4	gammares (BDE 99) 0,11 – 4,1 ng g^{-1} ps	Orge
Besse *et al.* (2013a)		gammares encagés (ng g^{-1} ps) BDE 99: 0,5 – 3,2 BDE 47: 0,9 – 5,0	Rhône-Alpes
Liu *et al.* (2013a)		escargots eau douce BDE 99: 0,84-1,01 BDE 47: 1,31-1,5	Chine

Pyrène

Propriétés physico-chimiques

Les HAP sont des composés organiques aromatiques polycycliques constitués généralement de carbone et d'hydrogène (hydrocarbure). Ils sont constitués par la fusion d'un nombre variable de cycles aromatiques : ils sont dits « légers » s'ils possèdent jusqu'à trois cycles et « lourds » lorsqu'ils sont constitués de quatre cycles ou plus. Cela leur confère des propriétés physico-chimiques et toxicologiques relativement différentes.

En général, les HAP sont hydrophobes, moins pour les plus légers, comme le naphtalène, que pour les lourds. Ils se retrouvent préférentiellement dans les sédiments et les graisses des organismes. Parmi les 16 HAP classés prioritaires par l'US-EPA, le pyrène (N° CAS 129-00-0) de formule chimique $C_{16}H_{10}$ possède 4 cycles (**Figure 16**). Il est particulièrement intéressant pour des tests en écotoxicologie car sa toxicité reste modérée (cancérogénèse non confirmée) tout en présentant des propriétés physico-chimiques voisines de HAP lourds qui sont plus toxiques. Le pyrène a une solubilité de 0,135 mg L^{-1} à 25 °C et un $\log K_{ow}$ de 4,88 (INERIS 2009).

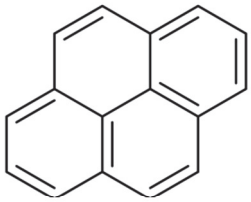


Figure 16. Structure chimique du Pyrène.

Historique, applications et usages

Les HAP sont issus majoritairement des processus de combustion incomplets, naturels (volcans, feux de forêts) ou anthropiques (transports routier et maritime, industries, agriculture, résidentiel). Selon leur origine, ils sont regroupés en deux catégories : pyrolytiques (combustion de la matière organique) et pétrogéniques (formation à partir de produits ou dérivés pétroliers). En France en 2015, la principale source d'émission HAP est le secteur résidentiel et tertiaire, suivi du transport, de l'agriculture et de l'industrie (**Figure 17**).

Réglementation

Une réglementation à l'échelle internationale a été adoptée du fait de la présence ubiquiste des HAP dans l'environnement. Ils ont été répertoriés comme POP dès 1998 et dès 2000, l'US EPA a établi un critère de qualité de l'eau courante pour protéger la santé humaine des effets cancérogènes des HAP, le niveau maximal de contaminant pour le benzo-

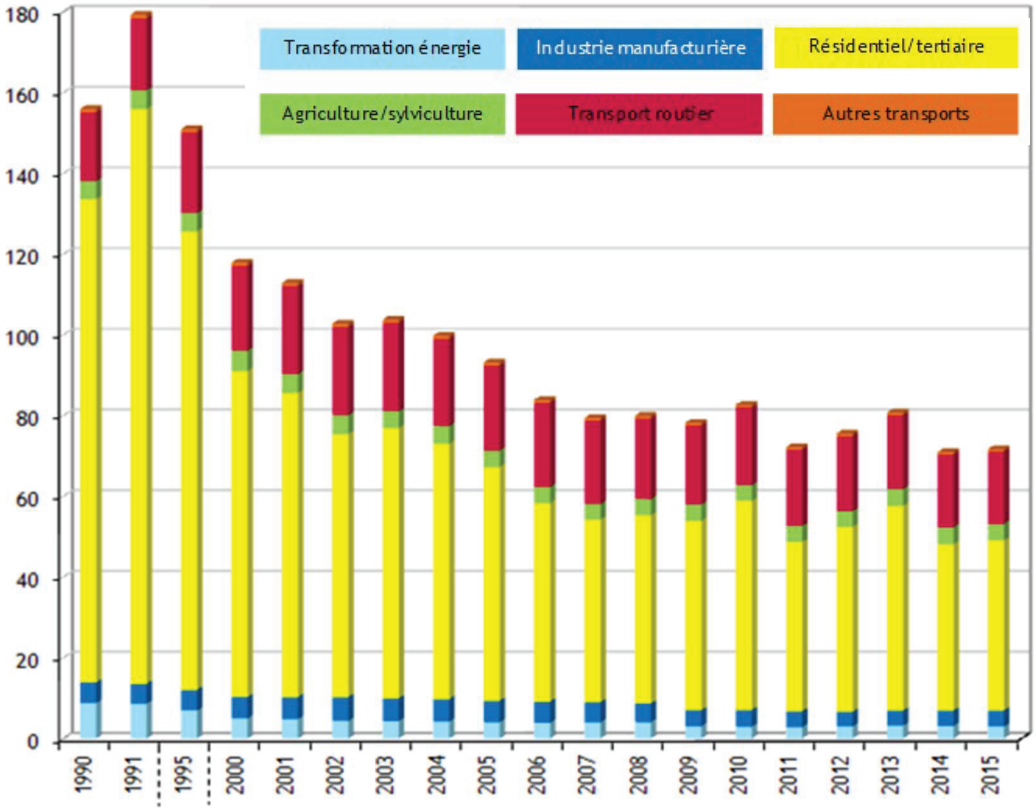


Figure 17. Suivi temporel des émissions atmosphériques nationales (en tonnes) des 8 HAP règlementés (benzo(a)pyrène, benzo(b)fluoranthène, benzo(k)fluoranthène, indeno(1,2,3-cd)pyrène, benzo(g,h,i)pérylène, fluoranthène, dibenzo(a,h)anthracène, benzo(a)anthracène). Source : CITEPA / Format SECTEN – Avril 2017

(a)-pyrène (BaP) a été fixé à 0,2 ng L^{-1}. A l'échelle européenne, des NQE_{eau} et des NQE_{biote} ont été établies par la directive (2013/39/CE) pour 8 HAP :Anthracène, Fluoranthène, Naphtalène, BaP, Benzo(b)fluoranthène, Benzo(g,h,i)pérylène, Benzo(k)fluoranthène et Indéno(1,2,3-cd)pyrène. Les valeurs les plus limitantes correspondent à celles du BaP, où la NQE_{eau} (moyenne annuelle) est de 0,17 ng L^{-1} et la NQE_{biote} de 5 ng g^{-1} pf.

Pour le pyrène spécifiquement, puisqu'aucune NQE_{biote} n'est définie, une valeur seuil en accord avec la concentration à effet seuil (TEC) dans le sédiment est indiquée à 195 ng g^{-1} ps pour les écosystèmes aquatiques (MacDonald *et al.* 2000). Il a été ajouté à la liste des substances potentiellement préoccupantes et sur la liste des substances extrêmement préoccupantes (autorisation). L'arrêté du 30 juillet 2005 (Journal Officiel 2005) a ajouté le pyrène dans la sélection des substances pertinentes. Une NOEC pour les invertébrés d'eau douce a été établie à 2,1 µg L^{-1} ainsi qu'une PNEC de 0,024 µg L^{-1} (INERIS 2009). A titre

indicatif, la valeur seuil dans le sédiment est de 129 ng g^{-1} ps pour le fluoranthène qui est un HAP relativement proche du pyrène, et sa NQE_{biote} est de 30 ng g^{-1} pf (INERIS 2009).

Impacts et risques environnementaux

La majorité des HAP retrouvés dans les sédiments sont principalement d'origine pyrolytique (Budzinski *et al.* 1997, Hansen *et al.* 2003). Une accumulation du pyrène dans les tissus d'organismes benthiques a été observée, chez *Lumbriculus variegatus* (Kukkonen et Landrum 1995, Leppänen et Kukkonen 1998) et *Eisenia Andrei* (Jager *et al.* 2000). Ces auteurs ont montré que l'absorption du pyrène a lieu majoritairement par ingestion de nourriture, plutôt que par voie dissoute.

Le pyrène peut provoquer des effets importants chez certaines espèces et selon les conditions. Par exemple, il a été démontré qu'il a une toxicité croissante sur les micro-algues benthiques sous radiations UV (Petersen *et al.* 2008). Mäenpää *et al.* (2009) ont constaté avec le temps une diminution du taux de pulsation des vaisseaux sanguins chez *Lumbriculus variegatus*, suggérant un signe de narcose. Clément *et al.* (2005) ont observé une diminution de la survie et de la croissance chez la hyalèlle exposé à deux sédiments fortement contaminés. Par ailleurs, il est largement reconnu que les effets les plus toxiques causés par plusieurs HAP se manifestent après leur biotransformation (Stegeman et Lech 1991). Parfois, la biotransformation du composé parent peut aboutir à la formation d'un intermédiaire plus toxique, comme le cas du BaP et de ses dérivés époxydes se liant à l'ADN (Schlenk *et al.* 2008).

Chez les invertébrés aquatiques, la biotransformation comprend une phase I, où le pyrène est majoritairement transformé en hydroxy-pyrène (1-OH-pyrène) (**Figure 18**) par le CYP-450 (Stroomberg *et al.* 1999, Ikenaka *et al.* 2006). La phase II consiste à la conjugaison d'autres molécules au 1-OH-pyrène, telles que le glucose, l'acide gluconique ou encore le sulfate (Stroomberg *et al.* 2004, Ikenaka *et al.* 2006, Carrasco Navarro *et al.* 2012). Les gastéropodes sont généralement dépourvus de systèmes enzymatiques à hydrolases, ce qui peut entraîner une plus forte accumulation des HAP dans ces organismes (Frank *et al.* 1986, Newsted et Giesy 1987). Les organismes des hauts niveaux trophiques ont une meilleure capacité à biotransformer les contaminants, ils bioaccumulent donc moins les composés parents (Santodonato *et al.* 1981, INERIS 2009). Des molécules plus solubles dans l'eau sont ainsi formées et sont plus biodégradables (Lee 2003). Les facteurs environnementaux tels que le pH, la température, la salinité, la concentration en oxygène ou encore la pression agissent

directement sur les mécanismes de biodégradation des HAP. Malgré ces diverses observations, l'ERE ne prend pas en compte les métabolites de HAP, ce qui peut mener à une sur- ou sous-estimation de la toxicité du composé parent (McElroy *et al.* 2006).

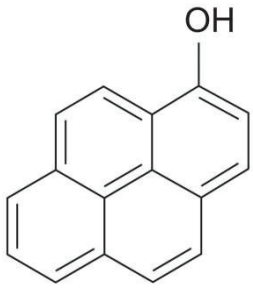


Figure 18. Structure chimique du principal métabolite du pyrène, l'hydroxy-pyrène (1-OH-pyrène).

Niveaux de concentration dans les sédiments et le biote aquatique

Le **Tableau 5** présente les niveaux de concentration en pyrène dans les sédiments européens et le biote. Récemment, l'étude d'Alric *et al.* (2019) reporte un taux de détection du pyrène à 99 % sur l'ensemble du territoire français à travers l'encagement de gammares, démontrant la présence ubiquiste de ce polluant. Pour plusieurs espèces d'invertébrés, la métabolisation du pyrène en 1-OH-pyrène a été mise en évidence. Par exemple, les cinétiques correspondantes ont été obtenues pour *Hyalella azteca* (Lee *et al.* 2002), *Gammarus setosus* (Carrasco-Navarro *et al.* 2015), *Lubriculus variegatus* (Mäenpää *et al.* 2009) et *Nereis diversicolor* (Giessing *et al.* 2003).

L'évaluation du risque potentiel de ces quatre contaminants sur l'environnement implique une meilleure compréhension des impacts et une surveillance à chaque niveau trophique de la chaîne alimentaire. Une meilleure connaissance du transfert de ces contaminants dans les maillons inférieurs de la chaîne trophique (e.g. les invertébrés benthiques) permettra de mieux appréhender les questionnements dans les maillons trophiques plus élevés (e.g. les poissons). Les modèles toxico-cinétique/toxico-dynamique (TK/TD) sont susceptibles de décrire et formaliser ces processus variables et complexes.

Tableau 5. Résumé des niveaux de concentrations en pyrène disponibles dans la littérature dans les sédiments français et dans les invertébrés.

Etude	**Niveaux de concentration dans le sédiment** (ng g^{-1} ps)	**Niveaux de concentration dans le biote** (ng g^{-1} ps)	**Localisation**
Cachot *et al.* (2006)	1418		Oise
	44 - 162		Seine
Ifremer (2018)	713		Bassin Adour-Garonne
Fauches (2017)	31 - 9033		Ile-de-France
Lauzent (2017)	moyenne : 65 10-150		Région de Bordeaux
Sciences et Techniques de l'Environnement (2014)	494		Bourget
Besse *et al.* (2013b)		gammares encagés moyenne : 2.0 0,4-48	Données nationales
Bourgeault et Gourlay-Francé (2013)		moules encagées 481 - 689	Seine
Alric *et al.* (2019)		gammares encagés 10,5 1,59 – 47,8	Données nationales
Viganò *et al.* (2007)		gammare autochtone 790-1500 ng g^{-1} pl	Po, Italie

1.2 MODELISATION ET ESTIMATION DES PARAMETRES TOXICO-CINETIQUES

1.2.1 Généralités des modèles toxico-cinétiques (TK)

En écotoxicologie, les modèles TK/TD sont des outils mathématiques utilisés pour évaluer le risque environnemental des substances chimiques, couplant les évaluations de l'exposition et des effets. Dans une première étape, la partie TK est utilisée pour décrire et comprendre la bioaccumulation des contaminants par un organisme au cours du temps. Le modèle TK est donc un élément crucial dans l'évaluation de la toxicité d'un contaminant, précédant le modèle TD qui décrit les effets des contaminants en fonction des concentrations bioaccumulées. D'un point de vue global, le modèle TK décrit la bioaccumulation de polluants comme la résultante de l'ensemble des processus d'accumulation et d'élimination, où les processus observés sont décrits par des hypothèses.

Les modèles TK en écotoxicologie s'inspirent des modèles utilisés en pharmacologie et radioécologie. En 1937, Teorell a introduit pour la première fois le principe de ce modèle (Teorell 1937). Puis Landrum *et al.* (1992) ainsi que Luoma et Rainbow (2005) ont repris ce concept en le développant dans le domaine de l'écotoxicologie aquatique. Le terme de « modèle toxico-cinétique » (Landrum *et al.* 1992, Grech *et al.* 2017) utilisé dans la littérature scientifique peut aussi apparaître sous les termes de « modèle biodynamique » (Luoma et Rainbow 2005), « modèle bio-cinétique » (Wang et Tan 2019), « modèle bioénergétique » (Lee *et al.* 2016) ou encore « modèle à base bioénergétique » (Norstrom *et al.* 1976). Les modèles TK sont généralement divisés en deux grandes catégories :

- les modèles TK à un compartiment, où l'organisme est considéré comme un compartiment unique et homogène, reposant sur une cinétique d'ordre 1.
- les modèles TK à compartiments multiples, où l'organisme est scindé en différents compartiments, comme par exemple les organes. Le modèle décrit alors les flux de contaminant entre les compartiments. *A minima*, ces modèles sont composés de deux compartiments, un où ont lieu les processus d'absorption, l'autre où a lieu l'élimination (Grech *et al.* 2017). Un troisième compartiment peut être envisagé pour le stockage. Par ailleurs, les modèles cinétiques à base physiologique (PBTK) sont des modèles particuliers puisqu'il s'agit de modèles multi-compartiments qui représentent les différents organes de l'organisme connectés par un flux (le sang). Pour le milieu aquatique, ces modèles sont essentiellement développés pour les poissons (Grech *et al.* 2017).

D'une façon générale, un modèle mathématique décrit une variable en fonction d'une (ou plusieurs) autres variables. Il est constitué de deux parties : la partie déterministe et la partie stochastique (Eq. (1)). La partie déterministe du modèle fournit la valeur ou la courbe moyenne décrivant la relation entre les variables. La partie stochastique du modèle décrit quant à elle tout ce qu'on ne peut pas prévoir, notamment la variabilité autour de la tendance moyenne.

$$y = f(x, \theta) + \varepsilon \qquad (1)$$

Partie déterministe Partie stochastique

avec f la fonction (linéaire ou non) qui décrit la relation entre x et y, y la variable observée, x la variable contrôlée, θ le vecteur des paramètres à estimer et ε les résidus aléatoires (ou stochastiques).

La loi de distribution des ε dépend de la nature des données observées. Si ces dernières sont continues, on considère généralement que ses résidus sont distribués selon une loi Normale de moyenne 0 et d'écart-type σ. Dans ce cas, l'équation (1) peut s'écrire (Eq. (2)) :

$$y \sim \mathcal{N}(f(x, \theta), \sigma) \qquad (2)$$

Pour formaliser la bioaccumulation chez les invertébrés d'eau douce, on utilise généralement le modèle TK à un compartiment, où l'on considère l'organisme entier (e.g. *Hyalella azteca* (Schuler *et al.* 2003), *Gammarus pulex* (Ashauer *et al.* 2012) ou *Daphnia magna* (Massarin *et al.* 2011)). Le modèle TK s'est construit sur l'hypothèse que la cinétique de bioaccumulation résulte de deux processus généraux, l'absorption et l'élimination, chacun d'eux pouvant représenter différents processus. Par exemple l'absorption peut s'effectuer par voie dissoute ou par voie trophique (Luoma et Rainbow 2005). Les pertes peuvent provenir de l'excrétion, de la dilution par la croissance (Spacie et Hamelink 1982) et de processus métaboliques modifiant la forme du contaminant (biotransformation) (Kuhnert *et al.* 2013).

Dans l'hypothèse de cinétiques de premier ordre, ces processus sont décrits par l'équation (3) (partie déterministe du modèle) :

$$\frac{dC(t)}{dt} = \left[(k_w \times C_w(t)) + \left(AE \times IR \times C_f(t)\right)\right] - \left(k_e + k_g + k_m\right) \times C(t) \qquad (3)$$

avec $C(t)$ la concentration du composé dans l'organisme au temps t, k_w le taux d'absorption par l'eau, $C_w(t)$ la concentration dans l'eau au temps t, AE l'efficacité d'assimilation, IR le

taux d'ingestion de nourriture, $C_f(t)$ la concentration dans la nourriture au temps t, k_e le taux d'élimination, k_g le taux de croissance et k_m le taux de biotransformation.

Dans cette équation, les termes k_w, k_e, k_m et AE sont spécifiques du contaminant et de l'organisme, tandis que les termes IR et k_g sont caractéristiques des organismes uniquement, sous réserve toutefois que, pour IR, le contaminant n'ait pas d'effet sur l'alimentation. Dans cette expression, il n'y a qu'une seule source de nourriture. Il est assez facile de compléter le modèle sur ce point : s'il y a plusieurs sources de nourriture, le deuxième terme de l'équation gardera la même forme mais tiendra compte de la proportion de chaque source de nourriture dans l'alimentation (Wang et Rainbow 2008). Ce modèle repose implicitement sur deux hypothèses : (*i*) que pour chaque voie d'exposition l'accumulation est due à une diffusion à travers une membrane (branchiale, digestive), et (*ii*) qu'il y a conservation de la masse, en d'autres termes que le composé absorbé n'est pas dégradé par l'organisme. Certains auteurs regroupent l'ensemble des pertes par dépuration et dilution par la croissance dans une constante unique (k_{e+} k_g) égale à la somme des deux (Janssen *et al.* 2010).

Depuis l'article fondateur de Luoma et Rainbow (2005), plusieurs études utilisant ce concept et ciblant les invertébrés ont été publiées. Elles concernent principalement des éléments-trace (arsenic, métaux), et quelques contaminants organiques (**Tableau 6**). A l'exception des nanoparticules d'argent (Zhao et Wang 2010), aucun composé organique d'intérêt émergent n'a été étudié à l'aide de ce type de modèle. Pourtant, la détection et la compréhension de la bioaccumulation dans les organismes aquatiques sont des étapes critiques du « parcours » de ces composés d'intérêt émergent (Babut 2016). Ce sont essentiellement quelques composés organiques au devenir assez connu qui ont été étudiés (HAP ou PCB). Les organismes pour lesquels des modèles TK ont été décrits sont des vers polychètes, des mollusques bivalves, et moins fréquemment des crustacés, principalement amphipodes (**Tableau 6**).

Tableau 6. Exemple d'études utilisant le concept de modèle TK.

Substances	Organismes	Remarques	Références
PCB, HAP	*Dreissena polymorpha, Mytilus edulis* et *M. californianus, Elliptio complanata*	Données cinétiques théoriques ; l'objet principal de l'étude concerne les membranes Semi Permeable Membrane Device (SPMD)	(Booij *et al.* 2006)
PCB	*Macoma balthica Corbicula fluminea*	Modes d'alimentation différents. Effet du charbon actif en grain (CAG) sur la biodisponibilité *in situ*.	(McLeod *et al.* 2008)
Ag, Cd, Zn	*Arenicola marina*	Comparaison modèle / mesures *in situ* (estuaires UK)	(Casado-Martinez *et al.* 2009a)
Ag, Cd, Zn	*A. marina*	Isotopes radioactifs – mesures k_u, k_e, pour les deux voies d'exposition, et *AE*. Comparaison mesures *in situ*	(Casado-Martinez *et al.* 2009b)
As	*A. marina*	Isotopes – mesures k_u, k_e, pour les deux voies d'exposition. *IR* dérivé de la taille et % COT. Comparaison avec des mesures *in situ*	(Casado-Martinez *et al.* 2010)
PCB	*Neanthes arenaceodentata*	k_u eau-sédiment ; effet CAG sur la biodisponibilité, croissance et aux de lipides	(Janssen *et al.* 2010)
Nano-particules d'Ag	*Daphnia magna*	Absorption dépendante de la concentration d'exposition ; *AE* dépend de la spéciation (nanoAg>Ag), de même que k_e. Elimination par deux voies.	(Zhao et Wang 2010)
PCB	*N. arenaceodentata M. balthica Mytilus edulis*	Traits bioécologiques favorisant l'exposition ; lien avec l'accumulation en fonction des traits et de scénarios d'exposition impliquant CAG ou non	(Janssen *et al.* 2011)
Ni	*Gammarus pulex*	Accumulation à partir de l'eau ; détermination expérimentale de k_u et k_e. Influence des ions majeurs. Le modèle est modifié pour tenir compte de la dépendance à la concentration (saturation)	(Lebrun *et al.* 2011)
Cu	*G. pulex*	Accumulation à partir de l'eau ; détermination expérimentale de k_u et k_e. Influence des ions majeurs. Le modèle tient compte de la saturation (en cas de forte exposition)	(Lebrun *et al.* 2012)
HAP	*D. polymorpha*	Exposition long terme *in situ*. Modèle / pyrène : hypothèse que le niveau d'accumulation dépend de l'état physiologique des organismes	(Bourgeault et Gourlay-Francé 2013)
Ag, As, Cd, Cu, Zn	*A. marina*	Exposition au laboratoire (sédiments naturels) comparés à accumulation *in situ*. Plateau non atteint en 28 jours au laboratoire.	(Casado-Martinez *et al.* 2013)
Cd / ^{109}Cd	*Hyalella azteca*	Exposition au laboratoire, Tetramin ® vs périphyton frais ; comparaison AE, IR, efficacité du modèle.	(Golding *et al.* 2013)
PBDE	*G. pulex*	Exposition en microcosme (eau et nourriture). Absorption majoritaire par l'eau. Détermination expérimentale de k_u et k_e ; faible métabolisme du BDE47, le plus accumulé.	(Lebrun *et al.* 2014)
Pb	*G. pulex*	Accumulation par l'eau ; effet du Ca^{2+} ; comparaison à organismes *in situ*.	(Urien *et al.* 2015)

Une des limitations importantes du modèle TK utilisé jusqu'à présent est la biotransformation des composés organiques. Concernant les éléments traces métalliques, ils peuvent être partiellement pris en charge par des protéines (Croteau *et al.* 2002, Baudrimont *et al.* 2003). La formulation générale du modèle à l'échelle de l'organisme (Eq. (3)) n'est plus valable si le métal lui-même n'est pas transformé, mais associé à une molécule organique. Par contre, le modèle peut tenir compte de la biodisponibilité interne si nécessaire (Croteau et Luoma 2009). Pour les composés organiques, peu d'études TK intègrent la biotransformation chez les invertébrés benthiques d'eau douce. Seulement une dizaine d'études de laboratoire sont reportées dans la littérature (Lydy *et al.* 2000, Lee *et al.* 2002, Giessing *et al.* 2003, Schuler *et al.* 2003, Mäenpää *et al.* 2009, Ashauer *et al.* 2012, Carrasco-Navarro *et al.* 2015, Kuo et Chen 2016, Miller *et al.* 2017, Fu *et al.* 2018). Ce manque de données, pourtant d'une importance primordiale dans les études d'évaluation de risque environnemental, peut s'expliquer par une absence ou faible activité de protéines impliquées dans la métabolisation de composés chez les invertébrés, contrairement aux poissons. De plus, la difficulté à concevoir et réaliser des expérimentations pertinentes pourrait expliquer ce manque d'information chez les invertébrés. En effet, les méthodes de chimie analytique disponibles pour quantifier les métabolites sont encore limitées, et elles le sont aussi en terme de niveau de détection, d'autant plus qu'il faut suffisamment de matrice d'invertébrés pour les analyses puisqu'ils sont de plus petite taille que les poissons. Enfin, l'estimation du paramètre relatif à la biotransformation (k_m) présente certaines limites, comme la nécessité de fixer d'autres paramètres du modèle dans certains cas ou encore l'obtention de valeurs négatives. Si la biotransformation n'est pas prise en compte dans les modèles TK actuels, une surestimation des données prédites de bioaccumulation risque d'être observée, dans le cas de la transformation du composé parent en métabolite(s). C'est d'ailleurs ce qui pourrait expliquer la forte surestimation des concentrations de pyrène accumulées par les dreissènes encagées dans l'expérimentation réalisée par (Bourgeault et Gourlay-Francé 2013)[7]. Lebrun *et al.* (2014) concluent à l'inverse que la biotransformation n'est pas importante dans le cas du gammare et du BDE 47, mais ce PBDE pouvant provenir lui-même de la métabolisation de composés plus bromés (Hakk et Letcher 2003) ; il aurait pu être intéressant dans leur cas de s'intéresser aussi à d'autres congénères.

[7] Cette surestimation peut également provenir du fait que les paramètres utilisés dans le modèle TK de cette étude ont été estimés à partir d'expériences réalisées en conditions contrôlées (Fisher *et al.* 1993), et non sur des données *in situ* (facteurs environnementaux).

Pour les contaminants organiques hydrophobes, l'absorption par la voie trophique est d'une plus grande importance du fait de leur forte adsorption sur la matière organique ou les aliments (Gross-Sorokin *et al.* 2003). L'importance de l'absorption alimentaire par les invertébrés aquatiques a été de plus en plus étudiée au cours des dernières années (Ashauer *et al.* 2010b, Ashauer *et al.* 2012, Carrasco Navarro *et al.* 2012, Englert *et al.* 2017). Généralement, lorsque des études reportent des modèles TK via la voie trophique, elles ne considèrent qu'une seule voie d'exposition, soit par le sédiment, soit plus rarement par des éléments de la litière, comme les feuilles (Ashauer *et al.* 2012, Lebrun *et al.* 2014). Or dans le milieu, les invertébrés sont aussi bien confrontés à la contamination via l'eau, le sédiment et les éléments de la litière simultanément.

De plus, à côté de ces limites « fonctionnelles » du modèle TK original appliqué aux composés organiques, l'estimation précise des valeurs des paramètres cinétiques reste difficile à obtenir.

1.2.2 Estimation des paramètres d'un modèle TK

Les paramètres d'un modèle TK sont estimés à partir de données expérimentales (cinétiques) comportant deux phases. La phase d'accumulation consiste à exposer les organismes pendant un certain temps à un ou plusieurs contaminant(s). La phase de dépuration consiste à transférer les organismes précédemment exposés dans un milieu exempt de toute contamination pour qu'ils éliminent le ou les composés. Le modèle est ensuite ajusté aux données expérimentales à l'aide de méthodes d'inférence pour estimer les paramètres (calibration du modèle).

Recommandations de l'OCDE

Pour estimer les paramètres d'un modèle TK, deux guides européens sont utilisés selon l'espèce aquatique considérée : la ligne directrice 305 de l'OCDE (OCDE 2012, 2016) pour les poissons et la ligne directrice 315 (2008) pour les oligochètes. La démarche adoptée pour d'autres invertébrés est similaire à celle utilisée pour les oligochètes, qui recommande une estimation des paramètres suivant un modèle non linéaire en plusieurs étapes (estimation séquentielle), ou une estimation simultanée des paramètres du modèle par des équations différentielles de premier ordre, comme préconisé également chez les poissons.

Estimation séquentielle

L'estimation séquentielle des paramètres d'un modèle TK s'effectue en deux temps (**Figure 19**) : estimation du taux d'élimination (k_e) avec les données expérimentales de la phase de

dépuration (Eq. (4)), puis ce paramètre est fixé pour estimer le taux d'absorption (k_u) avec les données expérimentales de la phase d'accumulation (Eq. (5)) :

$$\begin{cases} \frac{dC(t)}{dt} = -k_e \times C(t) & \Leftrightarrow C(t) = C_{ss} \times (e^{-k_e \times t}) \quad (4) \\ \frac{dC(t)}{dt} = k_u \times C_u - k_e \times C(t) & \Leftrightarrow C(t) = \frac{k_u \times C_u}{k_e} \times (1 - e^{-k_e \times t}) \quad (5) \end{cases}$$

où C_{ss} est la concentration du contaminant dans l'organisme à l'état stable (« steady state ») et C_u est la concentration du contaminant dans le milieu.

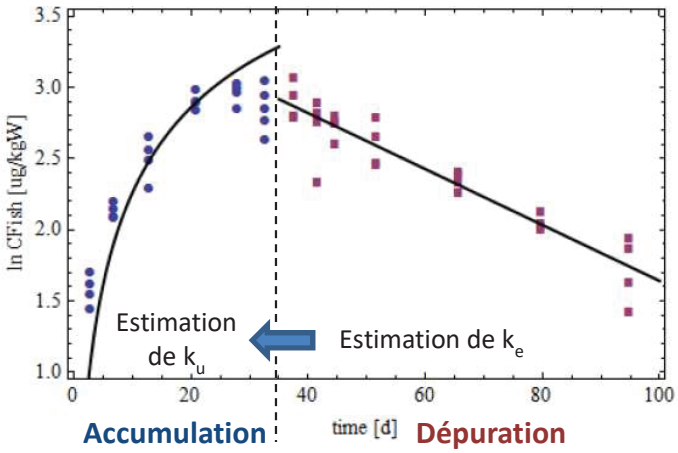


Figure 19. Exemple d'ajustement séquentiel (OCDE 2012).

L'estimation séquentielle a donc deux limites importantes : d'une part le fait de fixer un paramètre pour en estimer d'autres, ce qui biaise l'estimation des incertitudes. D'autre part, elle ne considère pas l'ensemble des données expérimentales simultanément, alors que les paramètres (k_u et k_e) sont corrélés, et que le k_e est estimé à partir des données de dépuration uniquement alors que le processus d'élimination a également lieu lors de la phase d'accumulation (il est commun aux deux modèles utilisés pour caractériser les deux phases, Eqs (4) et (5)). De ce fait, les données expérimentales de la phase d'accumulation ne sont pas prises en compte pour estimer ce paramètre.

Estimation simultanée

L'estimation simultanée suggère quant à elle deux possibilités :

1. Les paramètres k_u et k_e sont estimés simultanément mais en ne considérant que les données expérimentales de la phase d'accumulation ;
2. Les paramètres k_u et k_e sont estimés en même temps en ajustant le modèle simultanément à l'ensemble des données expérimentales (accumulation et

dépuration, **Figure 20**) via l'Equation (3).

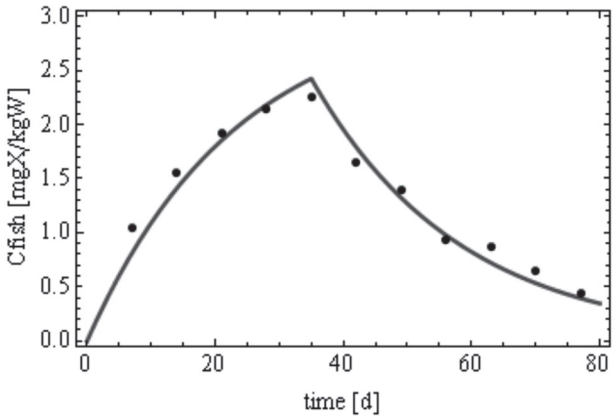


Figure 20. Exemple d'ajustement simultané (OCDE 2012).

Une limite apparaît pour la première possibilité, pour laquelle les données de dépuration sont négligées. D'ailleurs, elle n'est généralement utilisée que lorsque le composé s'élimine très lentement. L'approche simultanée (deuxième possibilité) semble être la mieux adaptée dans le cadre de l'ERE, du fait qu'il s'agit d'une estimation plus robuste, incluant une unique mesure directe de l'incertitude sur les paramètres et autour des prédictions du modèle. De par les progrès méthodologiques et leur mise à disposition dans les logiciels informatiques courants, cette approche est de plus en plus utilisée ces dernières années.

De nos jours, deux méthodes d'inférence sont utilisées pour estimer les paramètres d'un modèle, simultanément ou séquentiellement : l'inférence fréquentiste qui est historiquement la plus utilisée, et l'inférence Bayésienne.

Inférence fréquentiste

Principe

L'inférence fréquentiste est fondée sur un grand nombre de répétitions d'échantillonnages. Pour estimer les paramètres d'un modèle (linéaire ou non linéaire) dans le cadre fréquentiste, la méthode des moindres carrés (Legendre et Gauss, début du XIXe siècle) reste la plus utilisée. Brièvement, la méthode des moindres carrés consiste à minimiser l'impact des erreurs expérimentales, en sélectionnant la meilleure combinaison de valeurs de paramètres qui maximise la vraisemblance $p(Y|\theta)$, à savoir la probabilité des données Y sachant les paramètres θ du modèle (**Figure 21**).

Les intervalles de confiance à 95 %, obtenus en fréquentiste pour chaque paramètre, encadrent une valeur réelle que l'on cherche à estimer à l'aide de mesures prises par un

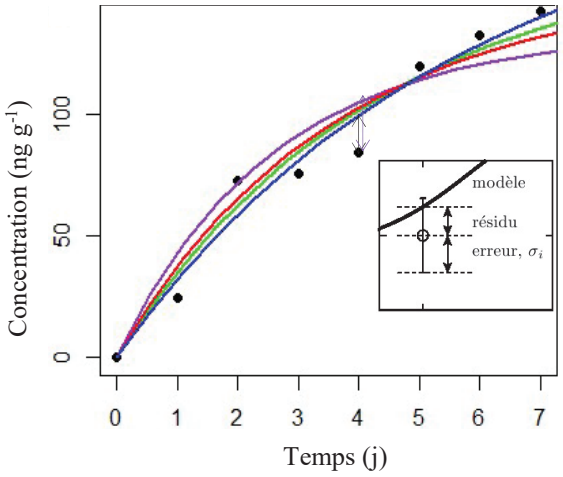


Figure 21. Exemple de différents ajustements d'un modèle aux données. Le meilleur ajustement est celui qui présente une somme des résidus la plus faible.

procédé aléatoire basé sur des échantillonnages répétés. Autrement dit, "si on reproduisait un grand nombre de fois l'échantillonnage des données et que l'on estimait à chaque fois le paramètre et son intervalle de confiance, 95 % des intervalles de confiance calculés contiendraient la vraie valeur du paramètre". Dans l'évaluation du risque environnemental, les intervalles de confiance sont vivement recommandés pour quantifier les incertitudes. Toutefois, les intervalles de confiance obtenus dans cette approche doivent être considérés avec précaution puisque les corrélations entre les paramètres ne sont pas prises en compte.

Avantages et limites

L'inférence fréquentiste a l'avantage majeur d'être plus ou moins facile à implémenter dans un logiciel, d'autant plus que l'analyse des résultats est aisée à comprendre. En effet, cette méthode d'inférence est la plus utilisée aujourd'hui, des outils statistiques ont donc été largement développés. Elle repose uniquement sur les observations, sans considérer les connaissances *a priori*. Il existe trois grandes limites dans l'utilisation cette approche :

- Les données de nature différentes ne peuvent pas être considérées simultanément (surtout pour des modèles d'erreurs non gaussiens), nécessitant de fixer certains paramètres pour estimer les autres. Cela introduit donc un biais dans l'évaluation des incertitudes.
- Les paramètres sont décrits par des valeurs fixes et non des distributions de probabilité, pouvant représenter un inconvénient majeur dans le cadre de l'évaluation du risque environnemental.

- Les intervalles de confiance pour chaque paramètre sont calculés indépendamment les uns des autres, négligeant ainsi la potentielle corrélation entre les paramètres et donc surestimant les combinaisons de paramètres probables.

Inférence bayésienne

Principe

Depuis 1989, le projet « Bayesian inference Using Gibbs Sampling » (BUGS) a permis le développement et la mise à disposition de logiciels flexibles permettant d'appliquer l'inférence Bayésienne sur des modèles complexes. Depuis la mise en place de ce projet, les études disponibles dans la littérature ne cessent d'augmenter (**Figure 22**).

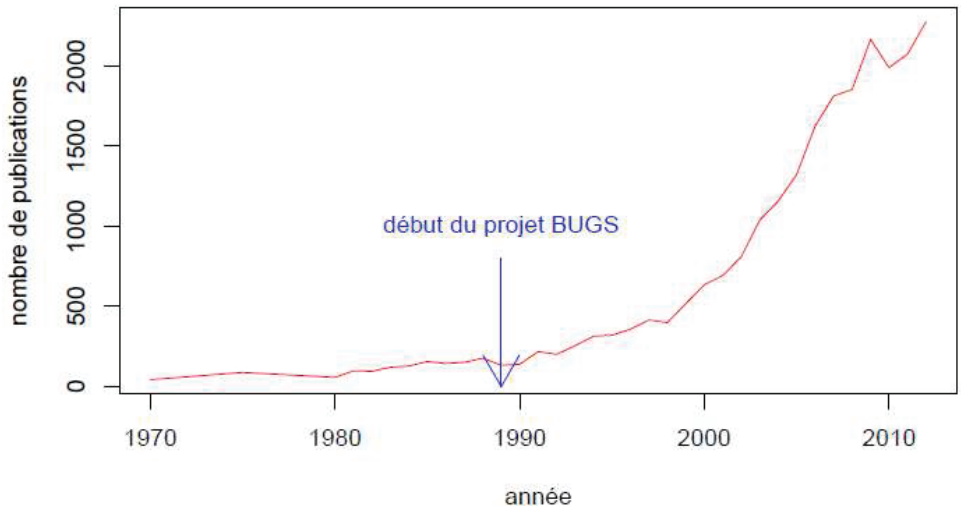


Figure 22. Recherche dans le « Web of knowledge » d'articles contenant le mot « bayesian » dans le titre. Source : M. L. Delignette-Muller, *Mise en oeuvre de l'inférence bayésienne avec JAGS et rjags* , 30 mars 2017.

L'inférence bayésienne s'appuie sur le théorème de Bayes (Eq. (6)) :

$$P(\theta|Y) = \frac{P(\theta) \times P(Y|\theta)}{P(Y)} \qquad (6)$$

avec $P(\theta|Y)$, la probabilité des paramètres sachant les données (distribution *a posteriori*), $P(\theta)$ la probabilité des paramètres (distribution *a priori*), $P(Y|\theta)$ la probabilité des données Y sachant les paramètres θ (vraisemblance) et $P(Y)$ la probabilité des données. La distribution *a posteriori* des paramètres est donc proportionnelle au produit de la distribution *a priori* sur les paramètres et de la vraisemblance (Eq.(7)) :

$$P(\theta|Y) \propto P(\theta) \times P(Y|\theta) \quad (7)$$

Le cadre Bayésien permet de prendre en compte les informations *a priori* sur les paramètres à partir de données provenant de précédentes expériences, de données disponibles dans la littérature et de connaissances à dire d'expert. Il permet également d'ajuster simultanément différents modèles pouvant avoir des paramètres en commun, sur différents types de données (e.g. bioaccumulation et croissance). Tous les paramètres sont estimés simultanément, ce qui permet de prendre en compte leur éventuelle corrélation. De cette distribution jointe peut être extraite la distribution marginale *a posteriori* de chaque paramètre, que l'on peut résumer par la moyenne, médiane, écart-type et intervalles de crédibilité à 95 % pour chacun des paramètres (**Figure 23**). Dans l'approche Bayésienne, il est question d'intervalle de crédibilité puisqu'il y a 95 % de chance que le paramètre se trouve dans cet intervalle.

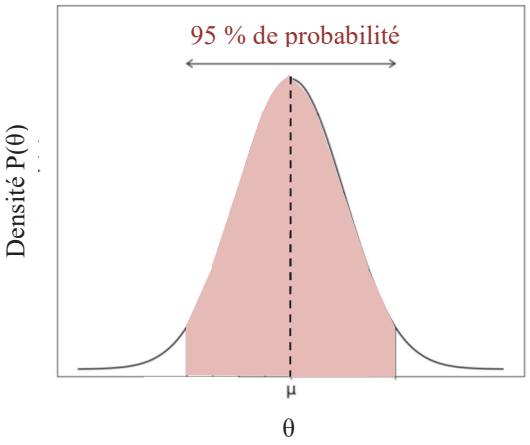


Figure 23. Distribution marginale *a posteriori* d'un paramètre, avec μ la valeur moyenne et l'intervalle de crédibilité à 95 % donné par les percentiles 2.5 et 97.5 %.

Les prédictions du modèle peuvent être obtenues par re-simulation du modèle avec les distributions *a posteriori* obtenues. Le principe de l'inférence Bayésienne est résumé dans la **Figure 24**.

Avantages et limites

Cette approche présente plusieurs avantages, mentionnés ci-dessous :

- Distributions *a priori* des paramètres

Les distributions *a priori* permettent de résumer l'information disponible sur les paramètres. Ces informations sont généralement fournies dans la littérature scientifique, ou lors d'une précédente expérience au laboratoire. Aussi, les spécialistes peuvent donner un *a priori* sur la distribution que peuvent prendre les paramètres. Par exemple, un biologiste

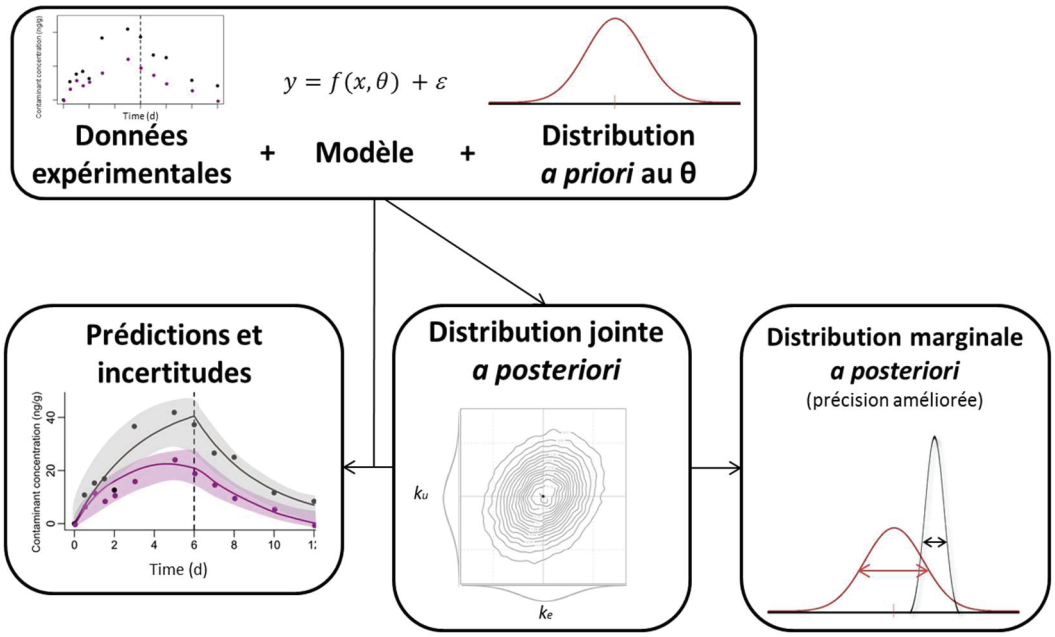


Figure 24. Principe général de l'inférence Bayésienne.

pourra informer qu'un paramètre du modèle ne peut pas être négatif de par sa définition biologique. Selon la source et les conditions d'origine des informations, une distribution préalable informative, semi-informative ou non informative peut être utilisée. Si un paramètre a déjà été estimé dans des études précédentes, ou si des données antérieures sont disponibles, une distribution *a priori* gaussienne peut être utilisée (avec la valeur moyenne estimée et la précision d'un écart-type égal à deux fois la valeur estimée pour tenir compte des différences potentielles entre les conditions expérimentales). Toutefois, si aucune information n'est disponible mais un ordre de grandeur (positif uniquement par exemple), il est possible d'appliquer un *a priori* faiblement informatif via une distribution uniforme par exemple. Si aucune information n'est disponible sur l'ordre de grandeur d'un paramètre, son prior peut être défini sur l'échelle du logarithme décimal afin de donner la même probabilité à des valeurs petites ou grandes.

- Distribution jointe *a posteriori*

La distribution jointe provient de l'estimation simultanée de tous les paramètres, prenant donc en compte les éventuelles corrélations entre eux, contrairement à l'inférence fréquentiste qui ne les prend pas en compte dans leurs estimations. La distribution jointe permet aussi d'extraire l'incertitude autour des paramètres du modèle.

- Données de natures différentes

L'inférence Bayésienne peut considérer simultanément des données de différents types

(e.g. continues, binaires, quantales) rencontrées en écotoxicologie, ce qui génère des estimations plus précises des paramètres et de leur incertitude. Par exemple, Billoir *et al.* (2011) ont utilisé simultanément toutes les données écotoxicologiques disponibles (reproduction, croissance et survie) pour estimer les paramètres d'un modèle DEBtox d'effet du cadmium sur la daphnie, dont certains paramètres étaient commun à plusieurs traits, et les modèles décrivant chacun des traits ayant des modèles d'erreurs différents (i.e. pas tous gaussien).

- Parties stochastiques non conventionnelles

Lorsque des données de natures différentes sont utilisées, les liens stochastiques[8] diffèrent selon le type de données, pouvant parfois être décrites par des distributions non conventionnelles[9] (e.g. modèle stochastique suivant une loi Gamma-Poisson (Delignette-Muller *et al.* 2014) ou binomial conditionnel (Forfait-Dubuc *et al.* 2012). L'utilisation de tels modèles stochastiques peut s'avérer compliquée en inférence fréquentiste.

Les deux grandes limites de l'inférence Bayésienne sont la définition des distributions *a priori* (informatives ou non informatives) et la mise en pratique de cette approche, particulièrement au niveau des outils statistiques à disposition qui sont moins nombreux que pour l'inférence fréquentiste.

Méthode de simulation (Chaîne de Markov-Monte Carlo)

L'inférence Bayésienne utilise l'algorithme de type Chaînes de Markov-Monte Carlo (MCMC) pour appliquer le théorème de Bayes et obtenir la distribution jointe *a posteriori*[10]. Une chaîne de Markov est une succession de variables aléatoires (θ_1, ..., θ_i) telle que leur distribution θ_i ne dépend que de la valeur la plus récente (θ_{i-1}). A chaque tirage θ_i, le modèle est ajusté aux données de sorte que l'on se rapproche de plus en plus de la distribution d'intérêt, correspondant à la distribution *a posteriori* du ou des paramètre(s), comme l'illustre la **Figure 25**.

[8] Les liens stochastiques décrivent tout ce qu'on ne peut pas prévoir, notamment la variabilité autour de la tendance moyenne, voir Eq. (1).

[9] Les distributions conventionnelles : pour les données binaires, une distribution Binomiale pourra être attribuée, pour des données de comptage (quantales) une distribution de Poisson, et pour des données continues une distribution gaussienne.

[10] Les MCMC ont données un nouvel élan à la statistique bayésienne puisqu'elles élargissent les possibilités des lois utilisées, ne se restreignant plus qu'aux lois conjuguées ($f(\theta)$ est une loi conjuguée pour la fonction de vraisemblance $f(y|\theta)$ si $f(\theta|y)$ est de la même forme que $f(\theta)$).

Si le critère à minimiser, par exemple les résidus (i.e. la somme des carrés des écarts), est plus petit que celui pour θ^{i-1} alors le processus reste à θ^{i} et explore l'espace des paramètres à partir de θ^{i}. Si le critère à minimiser est plus grand, le processus revient à θ^{i-1} et explore l'espace des paramètres à partir de θ^{i-1}. Au bout d'un certain nombre d'itérations (répétitions du processus), le critère à minimiser ne sera jamais plus petit que celui trouvé en θ^{i}, le processus restera donc sur le même θ^{i}. Différents algorithmes peuvent être utilisés pour l'échantillonnage aléatoire, comme par exemple l'algorithme de Métropolis Hastings ou l'échantillonneur de Gibbs. En règle générale, trois chaînes MCMC sont utilisées avec des valeurs initiales très différentes les unes des autres pour vérifier la convergence de l'algorithme (superposition des distributions des chaînes). L'analyse visuelle des traces des chaînes (**Figure 25**) ou le calcul de critères de convergence tels que le critère de Gelman et Rubin (1992) permettent de vérifier la convergence des chaînes.

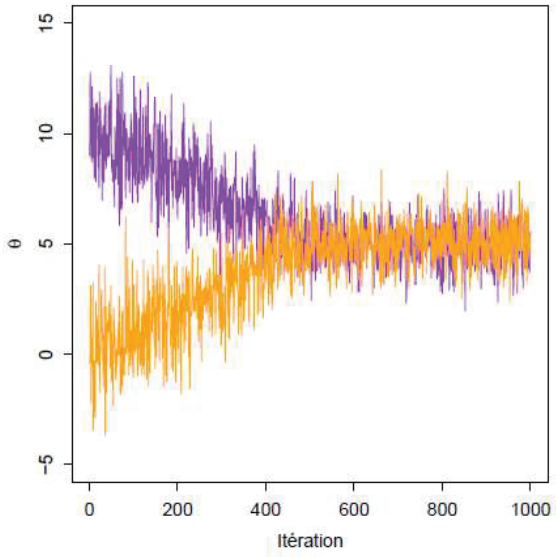


Figure 25. Exemple de deux chaînes Markov pour un paramètre du modèle (source : Fabien Subtil).

1.3 RESUME

La présence de polluant dans l'environnement soulève la question de leur toxicité pour les organismes vivants. En évaluation du risque, le risque implique la probabilité combinée des dangers et de l'exposition. Les invertébrés aquatiques ont un rôle clé dans le transfert des contaminants le long de la chaîne trophique (bioamplification) puisqu'ils vivent au contact des sédiments. En effet, les sédiments sont le réservoir des contaminants organiques hydrophobes, principalement des polluants organiques persistants (POP) au potentiel bioaccumulateur, mobile, toxique et persistant. On citera en particulier des contaminants d'intérêt tels que les PCB, les retardateurs de flamme comme les PBDE ou encore l'HBCD, et les HAP.

Des outils mathématiques, ou modèles TK/TD, peuvent être utilisés en évaluation du risque environnemental pour relier la dose externe du polluant à la dose interne dans l'organisme (TK), jusqu'à sa toxicité pour le biote (TD). Le modèle TK en particulier est la première étape dans l'évaluation du risque environnemental, puisqu'il permet de comprendre et décrire ce processus complexe et variable qu'est la bioaccumulation (lien entre la dose externe et dose interne). Le modèle TK utilisé aujourd'hui a été largement appliqué pour les métaux, et commence à se répandre pour les études concernant les contaminants organiques. Toutefois, le devenir des contaminants organiques, en particulier leur biotransformation, dans les organismes est peu étudié avec ces modèles.

De plus, les paramètres du modèle TK sont généralement estimés en plusieurs étapes, négligeant ainsi les corrélations des paramètres et par conséquent entraînant un biais dans les incertitudes. Deux approches d'inférence peuvent être utilisées pour estimer les paramètres : l'inférence fréquentiste est classiquement utilisée, contrairement à l'inférence Bayésienne qui l'est plus rarement. L'approche fréquentiste a cependant des limites importantes, notamment celle de ne pas considérer simultanément des données de nature différentes. L'inférence Bayésienne semble pouvoir dépasser ces limites. Malgré ses nombreux avantages, son application en science est récente (années 1980) du fait de sa complexité de calcul. Aujourd'hui, son utilisation est encore très limitée dans l'évaluation du risque environnemental.

Chapitre 2 : Matériels et méthodes

Ce chapitre décrit le design expérimental adopté et les méthodes utilisées lors de ce travail pour répondre aux objectifs évoqués en introduction. Pour rappel, la problématique générale de cette thèse est de développer un cadre de modélisation et d'inférence générique applicable à différentes espèces d'invertébré exposés à plusieurs contaminants organiques afin d'améliorer l'estimation des paramètres de ce modèle et ainsi d'estimer correctement les incertitudes autour des prédictions. Différentes expériences ont été envisagées afin de répondre à cette problématique :

- exposition des trois espèces d'invertébrés au PCB 153 par les sédiments ou les feuilles, dans le but de calibrer le cadre générique de modélisation et d'inférence à une substance non métabolisable pour différentes espèces ;
- exposition de *G. fossarum* à un HAP, le pyrène, afin d'obtenir des données relatives à sa biotransformation et d'intégrer ce processus au cadre générique précédemment élaboré ;
- exposition des trois espèces d'invertébrés à des retardateurs de flamme bromés, l'HBCD et le BDE 99, dans le but d'appliquer le cadre de modélisation et d'inférence à d'autres contaminants.

L'estimation simultanée des paramètres s'effectuera par inférence Bayésienne à l'aide du logiciel R, à partir de données expérimentales obtenues au laboratoire ou disponibles dans la littérature scientifique.

Dans ce chapitre, la section 2.1 développe le plan expérimental global et les stratégies adoptées pour cette étude. La section 2.2 décrit le prélèvement et le dopage des matrices d'exposition (sédiments, feuilles), tandis que la section 2.3 se focalise sur la collecte ou élevage des organismes (chironomes, gammares, radix) et leur maintien au laboratoire. La section 2.4 présente les différents designs expérimentaux adaptés aux différentes espèces et contaminants. Les sections 2.5 et 2.6 exposent les différentes techniques analytiques utilisées pour la caractérisation physico-chimique des sédiments ainsi que pour le dosage physico-chimique des contaminants dans les différentes matrices (eau, sédiment, feuille, organisme). La section 2.7 discute du cadre de modélisation ainsi que de l'estimation des paramètres.

2.1 PLAN EXPERIMENTAL GENERAL

2.1.1 Approche globale

Tout au long de la thèse, le même plan expérimental a été suivi pour chaque expérience réalisée, comportant différentes étapes :

1. Définition des hypothèses biologiques
2. Prélèvement et dopage de la matrice d'exposition, préparation des chambres d'exposition
3. Prélèvement ou élevage des organismes tests
4. Exposition des organismes aux matrices contaminées au laboratoire
5. Dosages des contaminants dans les différentes matrices
6. Modélisation et estimation des paramètres TK

2.1.2 Stratégies

Développer un cadre de modélisation TK générique appliqué aux invertébrés benthiques d'eau douce nécessite des tests sur diverses espèces et contaminants. Pour cela, différentes hypothèses sont émises pour que le cadre de modélisation s'adapte à n'importe quel couple espèce/contaminant. Les designs expérimentaux ont donc été adaptés en fonction des hypothèses à tester, comme développé dans cette section.

Choix des organismes tests

Le choix s'est initialement porté sur trois *phylum*, représentant des habitats (voies d'exposition) et des capacités métaboliques *a priori* différentes : une larve d'insecte (*Chironomus riparius*), un crustacé amphipode (*Gammarus fossarum*) et un mollusque (*Radix auricularia*). En effet, le chironome au stade larvaire (L4 notamment) vit la plupart du temps dans le sédiment, alors que le gammare et le radix sont des organismes épibenthiques. Le choix du chironome permet d'émettre l'hypothèse du sédiment comme voie d'exposition majoritaire et de considérer la croissance comme processus de dilution de la contamination. La sélection du gammare permet de considérer différentes voies d'exposition (eau, litière et/ou sédiment), et celle du radix uniquement par l'eau et/ou le sédiment.

Choix des substances et leurs concentrations d'expositions

Le PCB 153 fait ici office de composé de référence. La concentration d'exposition des organismes souhaitée est de 100 ng g^{-1} ps dans les sédiments et éléments de litière. Cette

concentration a été choisie en se basant sur des valeurs de concentrations retrouvées dans les sédiments européens, présentée section 1.1.4 du Chapitre 1, et en anticipant les pertes éventuelles lors du dopage.

L'hexabromocyclododécane (HBCD) est un retardateur de flamme ayant un potentiel de bio-isomérisation γ- en α-HBCD chez les invertébrés (section 1.1.4). La concentration nominale d'exposition par le sédiment sélectionnée est de 20 ng g^{-1} ps, en cohérence avec les teneurs environnementales énumérées en section 1.1.4 du Chapitre 1.

Le 2,2′,4,4′,5-pentabromodiphényl-éther (BDE 99) est également un retardateur de flamme, suspecté d'être métabolisé en un composé moins bromé, le BDE 47 (section 1.1.4 du Chapitre 1). Le test gammare impliquant cette substance vise à tester cette hypothèse, où la concentration souhaitée d'exposition des organismes au sédiment contaminé est de 6 ng g^{-1} ps, comme le suggère la valeur seuil indicative.

Enfin, le pyrène a été choisi également pour tester le processus de biotransformation en son métabolite majoritaire, le 1-OH-pyrène, chez le gammare (section 1.1.4 du Chapitre 1). La concentration nominale d'exposition des organismes dans le milieu est de 80 ng g^{-1} ps, en cohérence avec les teneurs environnementales présentées en section 1.1.4 du Chapitre 1.

Hypothèses testées

Du fait des propriétés hydrophobes des contaminants organiques sélectionnés, différentes voies d'exposition trophique ont été testées afin d'étudier leur contribution respective. Une voie d'exposition commune, le sédiment, a été testée pour toutes les expérimentations réalisées lors de ce projet. En complément, une exposition par les feuilles a également été testée pour le gammare (excepté dans le cas de l'exposition à l'HBCD du fait des résultats obtenus pour le PCB 153 et le BDE 99), afin de recueillir des données permettant d'estimer les taux d'ingestion (IR) de cette espèce. Ainsi, au maximum trois voies d'exposition (eau, sédiment, feuille) et trois voies d'élimination (excrétion, croissance, biotransformation ou bio-isomérisation) sont envisagées dans les hypothèses (**Tableau 7**).

Tableau 7. Résumé des expériences réalisées au cours de cette thèse.

Contaminant	PCB 153			HBCD		BDE 99		Pyrène
Espèce	Chironome	Gammare	Radix	Chironome	Gammare	Gammare	Radix	Gammare
Hypothèse de voie de contamination	Sédiment et eau	Eau, feuilles et sédiment	Eau et sédiment	Eau et sédiment		Eau, feuilles et sédiment	Eau et sédiment	Eau, feuilles et sédiment
Durée totale l'expérience	7 jours	14 jours	18 jours	4 jours	18 jours	14 jours	18 jours	14 jours
Durée de l'exposition	7 jours	7 jours	9 jours	4 jours	9 jours	7 jours	9 jours	7 jours
Durée de la dépuration	-	7 jours	9 jours	-	9 jours	7 jours	9 jours	7 jours
Matrice dopée	Sédiment	Feuilles et sédiment	Sédiment	Sédiment		Feuilles et sédiment	Sédiment	Feuilles et sédiment
Concentration nominale	100 ng g^{-1} ps		75 ng g^{-1} ps	20 ng g^{-1} ps		6 ng g^{-1} ps		80 ng g^{-1} ps
Objectif	Validation du cadre de modélisation et d'inférence			Bio-isomérisation		Biotransformation		

2.2 PRELEVEMENT ET DOPAGE DE LA MATRICE D'EXPOSITION

2.2.1 Prélèvement, stockage et dopage des sédiments

Prélèvement et stockage

Le sédiment utilisé pour les expérimentations a été prélevé dans le parc de Miribel-Jonage. Cette zone de prélèvement est située en amont de l'agglomération lyonnaise, à proximité des champs de captage d'eau potable de Crépieux Charmy. Cette zone est considérée comme une zone propre (**Tableau 8**), et les sédiments recueillis ont donc été considérés comme non contaminés. Deux localisations ont été retenues pour le prélèvement :

- A l'étang des Libellules, situé aux coordonnées géographiques 45°47'55''N 4°59'27''E. Ce sédiment a uniquement été utilisé pour l'expérience des chironomes exposés au PCB 153.
- Dans un cours d'eau phréatique peu profond, le Rizan, situé à la position GPS 45°47'49.5"N 5°00'18.0"E. Selon les données du réseau de contrôle de surveillance national (Eau France 2015) la rivière du Rizan présente un bon état écologique et chimique en 2015 (**Tableau 8**). Ce sédiment a été utilisé pour l'ensemble des autres expériences, par simplicité d'accès au site de prélèvement.

Tableau 8. Etat des eaux de la station « Rizan à Meyzieu » (code station : 06082510). Etat biologique : TBE : très bon état ; BE : bon état ; Ind : État indéterminé : absence actuelle de limites de classes pour le paramètre considéré, ou absence actuelle de référence pour le type considéré (biologie), ou données insuffisantes pour déterminer un état (physicochimie). Etat chimique : Ind : Information insuffisante pour attribuer un état. © Eau France (2015).

Années (1)	Bilan de l'oxygène	Température	Nutriments		Acidification	Polluants spécifiques	Invertébrés benthiques	Diatomées	Macrophytes	Poissons	Hydromorphologie	Pressions hydromorphologiques	ÉTAT ÉCOLOGIQUE	POTENTIEL ÉCOLOGIQUE		ÉTAT CHIMIQUE
			Nutriments N	Nutriments P												
2018	BE	TBE	BE	TBE	TBE	Ind	TBE	TBE					BE			Ind
2017	BE	TBE	BE	TBE	TBE	Ind	TBE	TBE					BE			Ind
2016	BE	TBE	BE	TBE	TBE	Ind	TBE	TBE					BE			Ind
2015	BE	TBE	BE	TBE	TBE	Ind							Ind			Ind

Trois semaines avant le début des expérimentations, un volume d'environ environ 60 L de sédiment est prélevé à l'aide d'une drague manuelle en acier inoxydable (Schiavone et Coquery 2010). Les premiers centimètres de la surface du sédiment sont ainsi collectés puis tamisés à 2 mm au-dessus de bidons en polypropylène (PP) afin de retirer les plus gros organismes (e.g. les corbicules) et les éventuels débris de végétaux (**Figure 26**). Les bidons sont stockés dans une chambre froide à 4°C pour une décantation d'au minimum 48 h avant utilisation.

Figure 26. Tamisage du sédiment (à gauche) ; site de prélèvement à l'étang des Libellules (en haut à droite); site de prélèvement au Rizan (en bas à droite).

Homogénéisation et dopage

Le jour du dopage, l'excès d'eau dans le bidon est prélevé par siphonnage si nécessaire, puis le sédiment est homogénéisé à l'aide d'une perceuse électrique munie d'une hélice à peinture pendant 20 minutes (**Figure 27**).

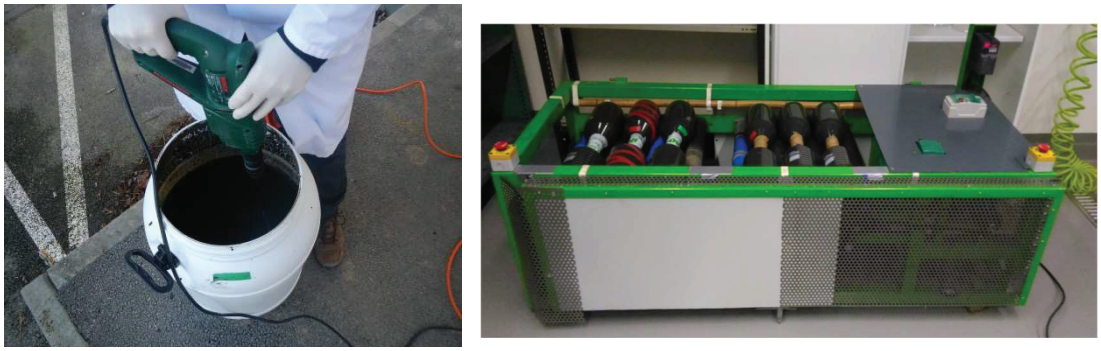


Figure 27. Homogénéisation du sédiment à l'aide d'une hélice à peinture rattachée à une perceuse électrique (gauche) ; système d'agitation pour le dopage du sédiment et des feuilles (droite).

Une fois le sédiment homogénéisé, on le répartit dans des bouteilles de verre (2 L, Pyrex) en versant 1,2 à 1,4 L de sédiment dans chaque bouteille (soit environ 2 kg de sédiment frais). Dans chacune des bouteilles a été ajouté un aliquot de la solution de dopage (préalablement mise sous agitation magnétique) pour atteindre la concentration souhaitée (cf. **Tableau 7**). Un sédiment témoin solvant est également préparé, où le même volume de solvant utilisé dans la solution de dopage (acétone) est ajouté. Les bouteilles contenant le sédiment sont ensuite mises à agitation horizontale (**Figure 27**) pendant 24 h à 12 rpm (50 Hz) afin d'homogénéiser la contamination sans impacter la composition du sédiment. Les bouteilles sont par la suite mises à décanter en chambre froide pendant 72 h. Une semaine avant le début de l'expérience, les sédiments dopés ont été homogénéisés de nouveau 20 minutes puis répartis dans les aquariums en PP (38 x 20 x 24.5 cm).

Préparation des solutions de dopage

Les différents contaminants et solvants utilisés pour le dopage ont été achetés à Sigma-Aldrich (St Quentin-Fallavier, France). Le PCB 153 est pur à 99.9 %, la somme des isomères HBCD (ΣHBCD) à 95 %, le BDE 99 et le pyrène à 99 %. L'acétone utilisée est de grade HPLC.

PCB 153

A partir de la poudre PCB 153, une solution à 1,01 g L^{-1} est préparée dans l'acétone. Pour l'exposition des chironomes et gammares, en ajoutant 75 µL de cette solution par bouteille de sédiment frais, une concentration nominale de 50 ng g^{-1} pf est attendue dans le sédiment s'il n'y a aucune perte (adsorption du contaminant sur les parois des bouteilles par exemple), soit environ 100 ng g^{-1} ps.

Pour l'exposition des radix, comme il s'agit d'une exposition à un mélange par simplicité d'analyses chimiques (PCB 153 et BDE 99), seulement 50 µL de la solution à 1,01 g L^{-1} sont ajoutés dans chaque bouteille de sédiment frais afin de diminuer légèrement la concentration d'exposition (soit environ 75 ng g^{-1} ps sans perte).

HBCD

A partir de la poudre ΣHBCD, une solution à 0,5 g L^{-1} est préparée dans l'acétone. En ajoutant 71,6 µL de cette solution par bouteille de sédiment frais, une concentration nominale de 10 ng g^{-1} pf est attendue dans le sédiment sans perte (soit environ 20 ng g^{-1} ps).

BDE 99

À partir de la poudre de BDE 99, une solution à 0,1 g L^{-1} a été préparée dans l'acétone. Le sédiment a été contaminé en ajoutant 72 µL de cette solution par bouteille. La concentration nominale de 3 ng g^{-1} pf devrait être atteinte sans les pertes éventuelles (correspondant environ à 6 ng g^{-1} ps).

Pyrène

À partir de la poudre de pyrène, une solution-mère à 1 g L^{-1} a été préparée dans l'acétone. Le sédiment a été contaminé à partir de cette solution. En ajoutant 160 µL de la solution à 1 g L^{-1} par bouteille de sédiment, la concentration nominale de 65 ng g^{-1} pf devrait être atteinte sans les pertes éventuelles (170 ng g^{-1} ps).

Préparation des aquariums tests

Environ 3 L de sédiment (contrôle ou contaminé) sont ajoutés dans chaque aquarium, auxquels sont ajoutés délicatement 15 L d'eau de forage (eau souterraine). Le temps d'équilibration du sédiment dans les aquariums est de 7 jours minimum avant l'introduction des organismes pour le début des tests, permettant une reformation des couches oxique et anoxique. L'équilibration se fait dans un bain thermostaté à la température d'exposition (**Figure 28**).

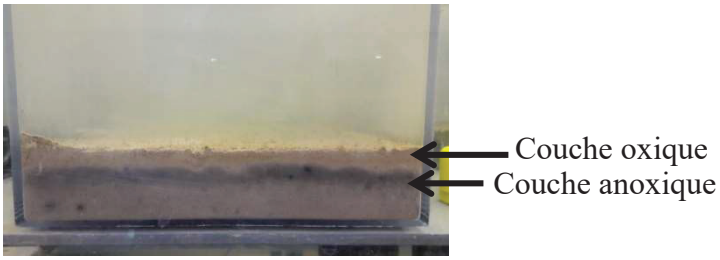


Figure 28. Reformation des couches oxique et anoxique après une semaine de décantation.

2.2.2 Prélèvement, stockage et dopage des feuilles

Prélèvement et stockage

Les feuilles ont servi de nourriture pour les gammares (conditions témoins et contaminées). Les feuilles d'aulne (*Alnus glutinosa*) sont prélevées sur un site *a priori* propre une fois par an à l'automne (**Figure 29**) dans la commune des Ardillats (69430). Elles sont ensuite mises à sécher pendant une semaine et conservées dans des bacs avant utilisation. Pour ces expérimentations, le lot de feuilles d'aulne récoltées en 2016 a été utilisé.

Figure 29. Collecte des feuilles d'aulne par l'équipe Ecotox d'Irstea.

Dopage

Pour le dopage des feuilles avant le début de l'expérimentation, plusieurs lots de feuilles ont été pesés (entre 5 et 15 g ps en fonction de l'expérience et du nombre de gammares par aquarium) avant de les réhydrater avec de l'eau de forage pendant 4 jours dans des seaux. L'eau a été renouvelée tous les 2 jours. Par la suite chaque lot de feuille est transféré dans des bouteilles en verre de 2 L, auxquelles sont ajoutés 1 L d'eau de forage et la solution dopante. Les bouteilles sont ensuite doucement agitées horizontalement pendant 72 heures à 8 rpm. L'eau des bouteilles contenant de l'acétone et potentiellement contaminée est

vidée dans les bidons de déchets appropriés à Irstea. Puis les bouteilles sont remplies de nouveau par de l'eau de forage propre pendant deux jours sans agitation afin d'éliminer toute trace d'acétone et ainsi éviter toute influence du solvant sur l'appétence pour les gammares. Pour chaque expérience, une condition témoin solvant (acétone) a été ajoutée pour vérifier l'impact de la contamination de disques de feuilles par de l'acétone sur l'appétence pour les gammares.

Solutions de dopage

Pour le dopage des feuilles (5 g ps) au PCB 153, un volume de 200 mL d'une solution à 5 µg L^{-1} dans l'acétone est ajouté à 1 L d'eau. On souhaite obtenir une concentration nominale de 50 ng g^{-1} pf dans les feuilles d'aulne (environ 250 ng g^{-1} ps).

Pour le dopage des feuilles (10 g ps) au BDE 99, un volume de 15 mL d'une solution à 10 µg L^{-1} dans l'acétone est ajouté à 1 L d'eau. On souhaite obtenir une concentration nominale de 3 ng g^{-1} pf dans les feuilles d'aulne (environ 15 ng g^{-1} ps).

Préparation des aquariums tests

Les feuilles témoins et contaminées sont ajoutées dans chaque chambre d'exposition quelques minutes après l'introduction des gammares (**Figure 30**).

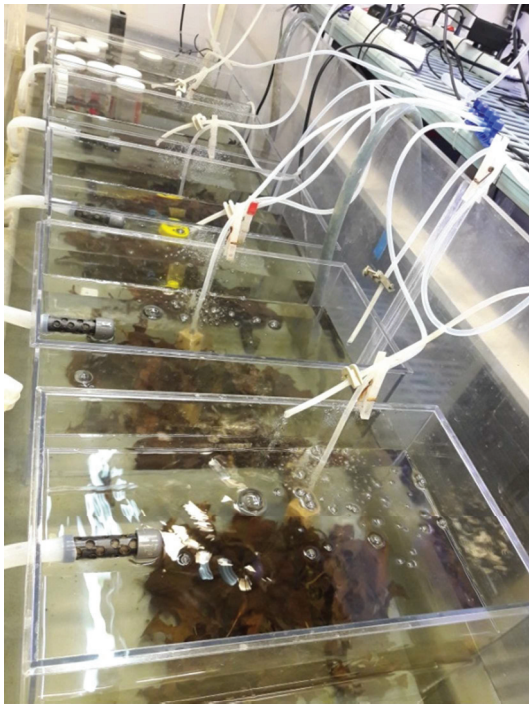


Figure 30. Chambre d'exposition via les feuilles.

2.3 PRELEVEMENT ET ELEVAGE DES ORGANISMES D'ETUDES

Le chironome fait l'objet d'un élevage dans le laboratoire d'écotoxicologie à Irstea depuis de nombreuses années selon un protocole standardisé (OECD 2004a, AFNOR 2010), ce qui permet de mettre en place aisément des tests impliquant un grand nombre de larves. L'approvisionnement en gammares est assuré par prélèvement d'individus calibrés dans une cressonnière préservée de contaminations anthropiques (**Figure 31**, St Maurice-de-Remens, département de l'Ain, 5°26'22''E et 45°95'79''N). Après contact avec un chercheur du LEHNA (Emilien Luquet, Université Lyon 1) qui a développé un élevage de physes, des adultes ont été prélevées dans un étang du parc de Miribel en mai 2017, et implantés au laboratoire. Avant de mettre en place des tests de bioaccumulation pour cette espèce, il était essentiel de stabiliser l'élevage (maintenance des adultes, reproduction) et de déterminer les modalités d'exposition. Cependant, des difficultés persistantes de maintenance de cette espèce au laboratoire ont conduit à abandonner cette option à la fin de l'automne 2017. Une espèce alternative a donc été sélectionnée, le radix (*Radix auricularia*), pour laquelle il était possible de collecter des adultes en quantité suffisante sur le site d'approvisionnement en gammares.

Figure 31. Cressonnière de St Maurice de Rémens : prélèvements de gammares et de radix.

2.3.1 Chironomes

Une quinzaine de jours avant le début de l'expérimentation, des masses de chironomes sont récupérées sur les parois des aquariums à l'aide d'une pince (environ 150 œufs par masse) et sont déposées dans des piluliers remplis avec de l'eau de forage et stockés à 4 °C. Dix jours avant le début de l'expérience, les piluliers contenant les masses de chironomes sont transférés dans une enceinte thermostatée à 21 °C pendant deux jours et

demi. Quand les larves ont éclos, elles sont placées pendant deux jours dans des plats à gratin (entre 4 et 12 masses par plat suivant la taille des plats) préalablement préparés dans l'enceinte thermostatée avec une fine couche de silice (1 mm) et 100 mg de nourriture commerciale finement broyée (Tetramin®) par masse. Le bulleur est retiré pendant une heure, le temps que les chironomes puissent s'enfouir dans la silice, puis remis afin d'éviter le risque d'anoxie. Ces plats sont sous une constante aération (léger bullage de type sucre) avec une photopériode de 16 h jour : 8 h nuit. Après deux jours et demi dans les plats à gratins, les chironomes ont atteint le deuxième stade larvaire (L2). La silice contenant les larves est entièrement transvasée dans de grand seaux (4 à 6 masses par seaux), préalablement préparés en bain marie à 21 °C et contenant 3 à 4 cm de silice, 1 mg de Tétramin® par larve, et remplis au ¾ d'eau de forage sous une aération constante (léger bullage à sucre) avec une photopériode de 16 : 8 h (**Figure 32**). Les larves sont nourries quotidiennement avec 1 mg de Tétramin® par larve. Cinq jours après, les larves sont au quatrième stade larvaire (L4). Les larves sont alors retirées des seaux par tamisage de la silice à 0,5 mm, comptées à l'aide d'une table lumineuse et de pipettes pasteur, puis transférées dans les aquariums tests (**Figure 32**).

Figure 32. Chironomes au stade L2 transvasés dans les seaux (à gauche) et comptage de chironomes au stade L4 sur une table lumineuse avant le début de l'expérimentation (à droite).

2.3.2 Gammares

Les gammares sont collectés à l'aide d'un troubleau (base rectangulaire 25 x 18 cm ; maille 630 µm) en remuant le substrat avec le pied (e.g. sédiment, sable, gravier, débris végétaux, brique) pour les déloger et les piéger dans le troubleau (**Figure 33**). Le contenu du troubleau est déposé sur une colonne de tamis (dégrilleur grosse maille 10 mm, tamis 2,5 mm et tamis 2 mm) pour ne sélectionner que des gammares de taille souhaitée (homogène). La colonne de tamis est placée dans un peu d'eau et rincée plusieurs fois avec des seaux d'eau pour inciter les gammares à descendre dans le dernier tamis. Les gammares du tamis de 2 mm

sont transvasés dans un seau (environ un bécher de 400 mL de gammares par seau). Au laboratoire, les gammares collectés sont ensuite placés dans des aquariums de 20 L (environ 1 500 gammares par aquarium) progressivement renouvelés par de l'eau de forage à raison de 4 L h^{-1} à 12 ± 1 °C. Un bullage en continu est placé dans chaque aquarium afin d'avoir de l'oxygène dissous à saturation. La photopériode est de 16 h jour et 8 h nuit avec une intensité lumineuse comprise entre 500 et 1000 lux. Les organismes sont nourris *ad libitum* avec des feuilles d'aulnes préalablement mises à tremper depuis une semaine. Un ou deux jours avant le début de l'expérimentation, seulement les gammares mâles sont sélectionnés pour éviter la dilution de l'accumulation des contaminants par les pontes des femelles.

Figure 33. Pêche de gammares (gauche), colonne de tamis (centre) et rinçage de la colonne de tamis / collecte dans les seaux (droite).

2.3.3 Radix

Environ 600 radix sont collectés délicatement en mesurant directement sur le terrain leur taille individuelle, à l'aide d'un décimètre. Les radix d'une longueur de coquille entre 1,5 et 1,8 cm (**Figure 34**) sont ramenés au laboratoire et mis à stabuler pendant trois jours dans des aquariums de 20 L (150 organismes par aquarium). Progressivement les aquariums sont renouvelés avec de l'eau de forage à raison de 4 L h^{-1} à 13 ± 1 °C sous une photopériode 16 h : 8 h. Un léger bullage par pipette pasteur est mis en place. Aucune nourriture n'est donnée, en supposant que les radix se nourrissent du biofilm présent sur les parois de l'aquarium. Les aquariums sont recouverts d'un couvercle pour éviter que les organismes s'échappent.

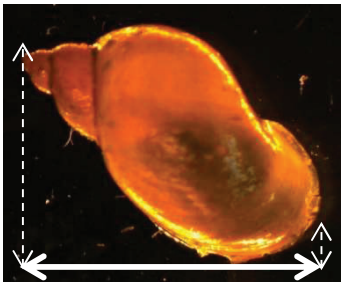


Figure 34. Mesure de la longueur d'une coquille de radix

2.4 EXPOSITION DES ORGANISMES : CINETIQUES DE BIOACCUMULATION

Les différentes expériences sont présentées dans les articles inclus dans cette thèse (chapitres 3, 4 et 5).

Brièvement, les expositions des chironomes se font avec des larves au stade L4. Ce stade ayant une durée relativement courte avant émergence du stade nymphe (une semaine tout au plus selon la température de l'eau), seule la phase d'accumulation a été envisagée. Pour la cinétique du PCB 153, le test a été effectué à 21 °C, et les organismes ont été nourris avec de la Tétramin®. Pour la cinétique de l'HBCD, l'expérimentation s'est effectuée à 20 °C pour retarder l'émergence, et les organismes n'ont pas été nourris. La survie a été mesurée à la fin de l'expérience. La croissance et le taux d'ingestion ont été suivis en mesurant quotidiennement la taille de 10 larves (loupe binoculaire, logiciel Sigma Scan Pro©, **Figure 35**).

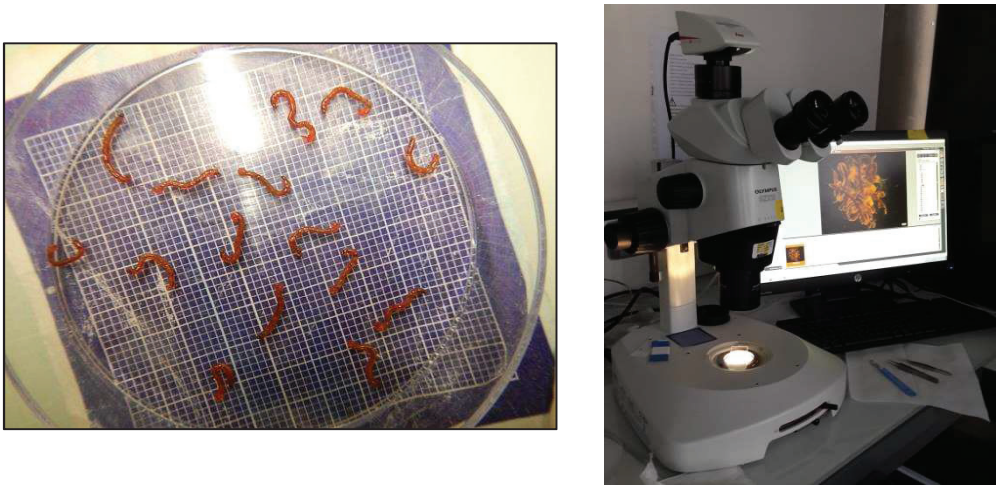


Figure 35. Mesure de la taille des chironomes sous loupe binoculaire.

Les expositions des gammares se font sur des mâles adultes, à 12 °C. Plusieurs conditions ont été mises en place lors des expériences : contamination des organismes par les feuilles (condition E1), contamination des gammares par le sédiment (E2), contamination des feuilles par le sédiment sans organisme (E3). Seulement pour la cinétique de l'HBCD, le temps d'exposition a été rallongé jusqu'à 9 jours et la contamination par les feuilles n'a pas été testée. La survie a été mesurée entre la phase d'exposition et de dépuration (J7 ou J9) et à la fin de l'expérience (J14 ou J18). Pour mesurer leur taille, 10 gammares à J0 et à J14 sont placés dans de l'éthanol puis photographiés sous loupe binoculaire et mesurés par ©Sigma Scan Pro (Annexe A).

Pour l'exposition des radix au mélange PCB 153/BDE 99, aucune nourriture n'a été donnée. Seulement l'exposition par le sédiment a été envisagée, d'une durée de 9 jours (**Figure 36**) à 13 °C sous léger bullage. La dépuration s'effectue dans un milieu propre (sédiment non contaminé) pendant 9 jours. La survie des organismes est mesurée à la fin de la période d'exposition et à la fin de la période de dépuration. Lors des prélèvements, les radix sont décoquillés vivants avant d'être stockés à - 20 °C.

Figure 36. Exposition des radix au mélange PCB 153/BDE 99.

Pour chaque expérience espèce/contaminant, des prélèvements d'eau, de sédiments, de feuilles et d'organismes ont été effectués régulièrement pour le dosage des contaminants et ainsi d'obtenir des cinétiques de bioaccumulation. Ces échantillons sont stockés à - 20 °C en attendant leurs analyses (matrices liquides) ou leur lyophilisation (matrices solides) avant analyses. Les schémas expérimentaux sont présentés en annexe B et dans le matériel supplémentaire des articles.

2.5 CARACTERISTIQUES PHYSICO-CHIMIQUES DES SEDIMENTS

Au cours de ce projet, plusieurs campagnes de prélèvements de sédiment ont été effectuées pour les différentes expérimentations. Pour chacune d'elles, les analyses des caractéristiques physico-chimiques des sédiments ont été effectuées au Laboratoire de chimie des milieux aquatiques (LAMA, UR RiverLy, Irstea - centre de Lyon-Villeurbanne). Les teneurs en matière sèche, en azote particulaire total et en carbone organique particulaire total ont ainsi été mesurées selon les normes correspondantes (NF ISO 10694 1995, NF ISO 11261

1995, NF EN 12880 2000). La teneur en eau dans les échantillons peut être retrouvée à partir de la teneur en matières sèches selon l'équation (8) :

$$Teneur\ en\ eau = 100 \times \frac{m_{pf} - m_{ps}}{m_{ps}} \quad (8)$$

avec la teneur en eau exprimée en %, m_{pf} la masse de sédiment humide (poids frais, g) et m_{ps} la masse de sédiment sec (poids sec, g).

L'analyse de granulométrie des sédiments est toujours en attente à ce jour suite aux pannes successives de l'appareil.

2.6 DOSAGES CHIMIQUES

Les dosages dans les différentes matrices ont été effectués au laboratoire de physico- et toxico-chimie de l'environnement (LPTC, Université de Bordeaux) à Talence (33400).

2.6.1 Préparation des échantillons

D'une façon générale (**Figure 37**), les échantillons solides lyophilisés sont broyés à l'aide du broyeur IKA tube Mill à capsule individuelle de 40 mL. Par la suite une prise d'essais autour de 0,5 g est effectuée pour chaque échantillon, à laquelle est ajouté la solution d'étalon interne (EI) ou la solution de natifs[11], ainsi que 12 mL de solvant (dichlorométhane, DCM). L'extraction s'effectue par micro-onde (Milestone STAR-E) pendant 15 minutes. Par la suite les extraits sont filtrés à l'aide d'un entonnoir avec de la laine de verre, puis reconcentrés sous flux azote à 45 °C et repris dans de l'isooctane. Pour l'étape de purification (PCB, PBDE et HBCD), les extraits sont déposés sur une micro-colonne de silice acidifiée à 40 % puis élués 3 fois avec 5 mL de DCM. Les échantillons sont une nouvelle fois reconcentrés sous flux d'azote et repris dans de l'isooctane (PCB ; PBDE) ou le méthanol (HBCD). La purification des HAP se fait en deux étapes. Une première purification est effectuée en déposant l'extrait sur une micro-colonne d'alumine, préalablement conditionnée avec 5 mL de DCM, puis élué trois fois avec 5mL de DCM. Les extraits sont reconcentrés sous flux d'azote et repris dans de l'isooctane. Une deuxième purification est effectuée avec de la silice, préalablement conditionnée avec 5 mL de pentane, où l'échantillon est élué une première fois avec 2 mL de pentane ajoutés pour élimination les alcanes, puis une deuxième fois avec 3 fois le mélange Pentane/DCM (65 : 35 v : v) pour obtenir l'extrait qui sera de nouveau reconcentré sous flux d'azote et repris dans l'isooctane. Les extraits (100 µL) sont

[11] Solution de natifs : solution contenant les composés d'intérêts purs (plus ou moins).

ensuite mis en vials pour analyse, en ayant ajouté préalablement la solution seringue[12] (sauf pour l'HBCD et l'hydroxy-Pyrène).

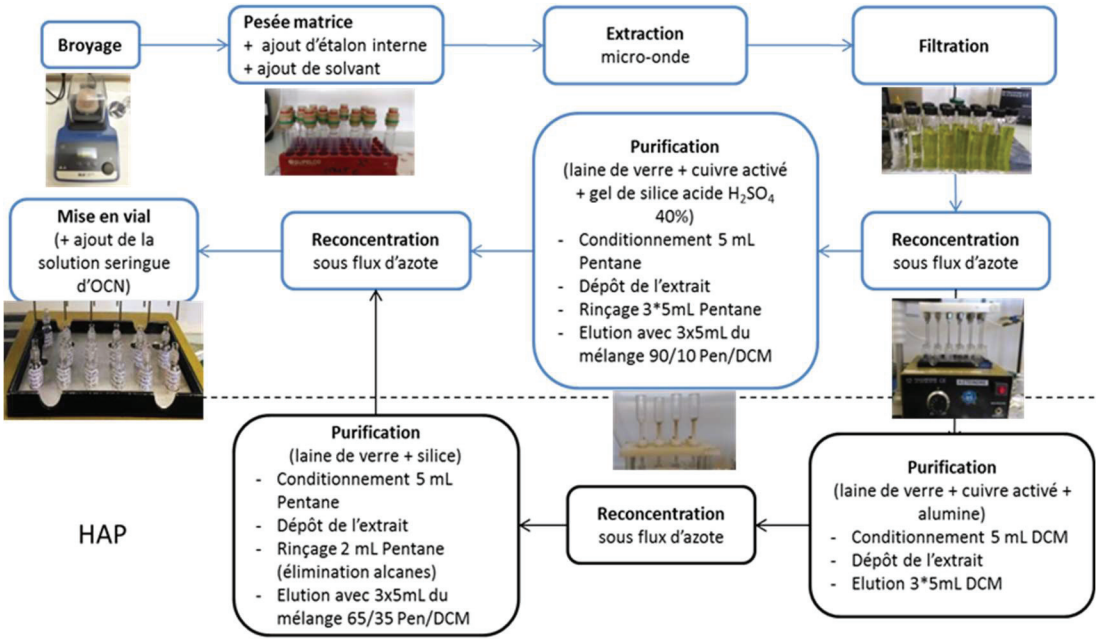


Figure 37. Les différentes étapes de préparation d'échantillons solides avant analyse.

Pour l'analyse du métabolite principale du pyrène, l'hydroxy-pyrène, le protocole de préparation des échantillons est différent des autres composés (**Figure 38**). Brièvement, une prise d'essai de 0,2 g de matrice est placée dans un broyage Potter dans 2 mL d'un tampon acétate (pH = 5). L'étalon interne et le composé natif si nécessaire sont ajoutés aux échantillons (70 µL), ainsi que 20 µL de β-glucoronidase et de β-mercaptoéthanol. Le tout est placé en incubation à 37 °C pendant 16 à 20 h. Les échantillons sont transférés dans des tubes Falcon® 15 mL pour être centrifugés 8 minutes à 5 000 rpm. Le surnageant va subir une purification sur cartouches SPE C18 500 mg / 3 mL et une reconcentration sous flux d'azote à sec. Pour chaque échantillon, au culot est ajouté 2 mL de méthanol puis mis à homogénéiser dans un bain aux ultrasons pendant 10 minutes avant filtration. Une deuxième filtration est effectuée, en ayant préalablement agité de nouveau les échantillons culot aux ultrasons. Avec l'ajout de 500 µL d'un mélange 80 : 20 DCM : MeOH (v : v) dans le surnageant et 3 fois 500 µL de MeOH aux échantillons de culot, une purification est effectuée sur cartouches NH2, séparément pour le surnageant et le culot. Cela s'ensuit d'une reconcentration à sec

[12] Solution seringue : elle est ajoutée en fin de manipulation permet de quantifier les étalons internes et ainsi de calculer le rendement d'extraction, ce qui permet de vérifier si il y a eu des pertes lors de la manipulation.

sous flux d'azote, puis d'une mise en vials (100 µL de méthanol ajouté) des échantillons avant analyses.

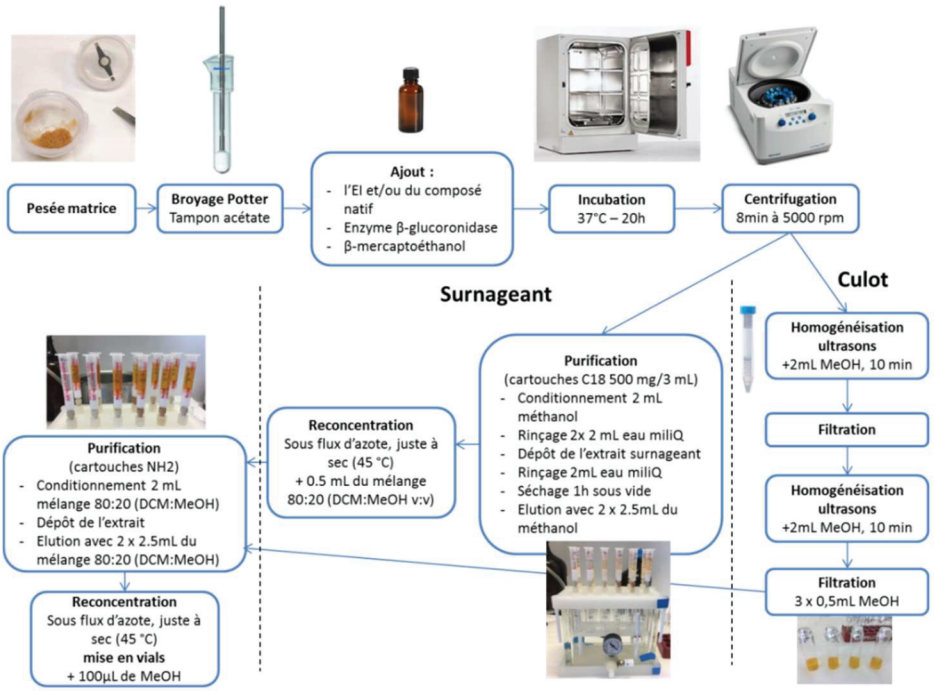


Figure 38. Préparation des échantillons avant analyse du 1-OH-pyrène.

Dans une démarche contrôle/qualité, un blanc de manipulation est ajouté dans chaque série de préparation d'échantillon pour s'assurer d'aucune contamination lors de ces différentes étapes, ou tout au moins de la quantifier. De plus, un échantillon de sable de Fontainebleau dopé est également préparé pour s'assurer du rendement d'extraction de la série d'échantillon. Enfin, quand cela est possible, une matrice de référence (SRM) est également ajoutée à la série d'échantillons pour obtenir le rendement d'extraction (voir section 2.6.4).

Pour les matrices liquides, les échantillons d'eau sont décongelés à température ambiante quelques heures avant leur filtration sous vide (**Figure 39**) pour éliminer la phase particulaire à l'aide d'un entonnoir préalablement bouché par de la laine de verre et d'un papier filtre microfibre de verre de 47 mm (GF/F, Whatman®). Dans une démarche contrôle/qualité, des blancs sont également préparés (eau Vittel® et eau miliQ) ainsi que de l'eau dopée pour chaque série d'analyse.

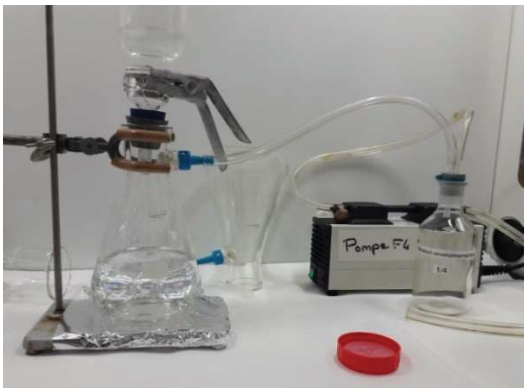


Figure 39. Système de filtration des échantillons d'eau.

2.6.2 Analyses

PCB 153 et PBDE

Les échantillons d'eaux préalablement filtrés sont extraits par micro-extraction sur phase solide (SPME) couplée à une chromatographie gazeuse à détecteur à capture d'électrons (GC-ECD, **Figure 40**). La durée de l'extraction est de 60 minutes et la désorption dure 15 minutes. La technique ECD utilise une source de ^{63}Ni radioactif qui va émettre un rayonnement beta interagissant avec l'azote présent dans la cellule de détection. Un nuage électronique va être formé où les électrons vont réagir avec les composés halogénés présents dans les échantillons, réduisant temporairement le nombre d'électrons libres. Cette réduction temporaire est mesurée par le détecteur et convertie en pic positif. L'ECD est une technique analytique très sensible aux molécules électronégatives telles que les composés halogénés, peu coûteuse, mais qui ne donne pas d'information structurale. Pour les échantillons solides, les méthodes ont été optimisées pour la détection des composés d'intérêt (PCB 153, BDE 99 et -47). Ainsi, le temps d'analyse a pu être diminué à 30 minutes pour les PBDE et 40 minutes pour le PCB 153.

Figure 40. Exemple du GC-µECD utilisé lors des analyses PCB et PBDE (à gauche) et de la chaîne de chromatographie liquide utilisée pour les analyses de l'HBCD (à droite).

HBCD

Les isomères de l'HBCD dans les matrices solides ont été analysés par chromatographie liquide ultra performance (UPLC, Waters, **Figure 40**) couplée à une spectrométrie de masse en tandem (MS/MS). Le temps d'acquisition est de 9 minutes. Brièvement, L'UPLC repose sur l'emploi d'une phase stationnaire composée de particules inférieures à 2 µm. Le débit est alors augmenté (forte pression) ainsi que la vitesse d'analyse, sans altérer les performances chromatographiques. Succinctement, la spectrométrie de masse en tandem consiste en la sélection d'un ion stable particulier par un premier analyseur, puis en l'analyse des ions issus de la décomposition de l'ion stable (dans la cellule de collision) par un second analyseur. Ici les isomères de l'HBCD répondent à la même transition de quantification 640,5 -> 81,0 masse sur charge (*m/z)* et à la même transition de confirmation 640,5 -> 79,0 *m/z*. Seul le temps de rétention permet de les différencier, c'est pourquoi il est primordial d'avoir une bonne séparation des composés.

Pour les échantillons d'eau, une chaîne HPLC plus récente a été utilisée (*Agilent* 1290 Infinity Binary Pump (G4220B)). Le temps d'acquisition est de 8 minutes.

Pyrène et 1-OH-Pyrène

Dans les matrices solides, le pyrène a été analysé par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (GC-MS) sur un GC 7890 couplé à un MS 5975 (Agilent Technologies, Little Falls, DE, USA). Le temps d'acquisition est de 43 minutes. Brièvement, les composés sont séparés le long d'une colonne chromatographique selon les propriétés chimiques des composés et de la phase constituant la colonne. Ainsi les composés ont des temps de rétention différents (temps pour sortir du GC), ce qui permet au spectromètre de masse de capturer, ioniser (fragmentation des molécules), accélérer et de détecter les molécules ionisées au fur et à mesure selon leur rapport *m/z*. Les échantillons d'eau ont quant à eux été analysés par micro-extraction sur phase solide et chromatographie en phase gazeuse couplée à un spectromètre de masse (SPME/GC-MS). La micro-extraction s'effectue avec une fibre SPME PDMS 100 µm (immersion fibre en phase liquide) dans 8 mL d'échantillon, le tout placé en incubation pendant 5 minutes à 40 °C. Les échantillons sont par la suite extraits pendant 60 minutes à 250 rpm. Le temps de désorption est de 3 minutes. L'échantillon a été injecté dans la GC (Agilent Technologies 7890A) à 270 °C en mode « pulsed splitless », avec un temps de purge de 3 minutes à 60 mL min^{-1}. La pression de pulse était de 25 psi pendant 1,5 minutes avec comme gaz vecteur l'hélium avec un débit de 1,3 mL min^{-1} sur une colonne HP-5MS-UI (Agilent Technologies, J&W Scientific) constituée

de 5 % de Phenyl Methyl Siloxane (30 m x 0,25 mm diamètre x 0,25 µm d'épaisseur de phase). La température initiale était de 50 °C pendant 2 minutes, puis a été augmentée de 10 °C par minute jusqu'à atteindre 300 °C. Le temps d'acquisition est de 7 minutes. Le spectromètre de masse (Agilent Technologies MSD 5975C) a été paramétré à une ionisation par impact électronique à 70 eV, une température de source et du quadripôle à 300 et 180 °C respectivement, en mode de détection SIM (Single Ion Monitoring) sur la transition 202 vers 212 *m/z*.

Le 1-OH-pyrène est analysé par couplage LC-MS/MS en mode d'ionisation négative (Infinity 1290 LC - 6460 Triple Quad LC-MS, Agilent Technologies). La colonne utilisée pour les analyses est une Acquity UPLC BEH C18 (1,7 µm x 2,1 mm x 50 mm, Waters), la température de la colonne est fixée à 45 °C. Le volume injecté d'extrait organique et fixé à 5 µL. Les solvants d'élution sont : voie A 100 % eau ultra pure et voie B 100 % méthanol. Le gradient chromatographique est à un débit de 0,6 mL min^{-1} de 70 % voie A et 30 % voie B pendant les 5 premières minutes, puis pendant une minute 30 % des voies A et B, puis 100 % voie B pendant 1 minute, et enfin pendant 2 minutes 70 % voie A et 30 % voie B. Le temps d'acquisition est de 9 minutes. Les paramètres de source d'ionisation sont les suivant : la température du gaz de désolvatation (azote) est fixée à 300 °C, avec un débit de 8 L min^{-1}. La pression du nébuliseur est de 40 psi, une température à 350 °C pour le gaz fourreau avec un débit de 11 L min^{-1} et des tensions de capillaires et de buse à 2 000 V. Les transitions « Multi Reaction Monitoring » (MRM) recherchées sont 217,1 vers 189 *m/z* pour le 1-OH-pyrène avec une énergie de collision de 32 eV ; et 226,1 vers 198 *m/z* (36 eV) pour le 1-OH-pyrène deutéré.

2.6.3 Quantification

La quantification par étalonnage interne nécessite d'ajouter un composé étalon d'une structure proche de celui à doser. L'étalon interne, de concentration connue, est ajouté en début de manipulation, permettant de suivre toutes les étapes du protocole de préparation d'échantillon et analyse.

Avant chaque analyse de série de 15 échantillons, un coefficient de réponse du composé à doser (K_i) est déterminé par rapport aux solutions d'étalon interne et de natifs de concentrations connues (Eq. (9)) :

$$K_i = \frac{m_{natif} \times A_{EI}}{m_{EI} \times A_{natif}} \qquad (9)$$

avec m_{natif} la masse du composé natif, A_{EI} l'aire de l'étalon interne, m_{EI} la masse de l'étalon interne et A_{natif} l'air du composé natif.

Une fois la valeur du coefficient de réponse connue, on peut déterminer la masse du composé à analyser dans chaque échantillon (Eq. (10)):

$$m_{natif} = K_i \times m_{EI} \times \frac{A_{EI}}{A_{natif}} \quad (10)$$

Chaque contaminant analysé dans ces travaux de thèse est quantifié par rapport à un étalon interne associé. Ainsi le PCB 153 est quantifié par rapport au PCB 198 lui-même associé à la solution seringue ophtachloronaphtalène (OCN), les BDE 99 et -47 par rapport au BDE 47 fluoré (F-BDE 47) lui-même associé à la solution seringue OCN (avec le logiciel Masslynx), les trois isomères de l'HBCD par rapport au ^{13}C-α-HBCD (avec le logiciel MassHunter), le pyrène par rapport au fluoranthène deutéré lui-même associé à la solution seringue pyrène d10 et le 1-OH-pyrène est quantifié par rapport à l'étalon deutéré 1-OH-Pyrène (avec le logiciel GCMS data analysis).

Une solution seringue de concentration connue (ou étalon interne de contrôle de récupération) est ajoutée en fin de purification, lors de la mise en vial des échantillons juste avant l'analyse pour le calcul du rendement de récupération (ou d'extraction). En effet, comme les étalons internes sont déposés sur l'échantillon avant extraction, ils subissent les mêmes pertes que les composés d'intérêt. On ne peut donc pas déterminer directement les rendements d'extraction par les étalons internes.

Afin d'évaluer la justesse des manipulations, des matrices de référence certifiés ou des matrices dopées sont utilisés, où la masse obtenue du composé est comparée à celle théorique (Eq. (11)) :

$$rendement\ de\ quantification\ (\%) = \frac{m_{mesurée}}{m_{ajoutée}} \times 100 \quad (11)$$

2.6.4 Contrôle qualité

Limites de détection et de quantification

Les limites de détection (LoD) et de quantification (LoQ) pour chaque méthode analytique ont été déterminées pour chaque série d'analyse à partir de matrices dopées (sable de Fontainebleau dopé) et à partir du blanc de manipulation. La LoD correspond à la plus petite concentration pouvant être détectée avec une incertitude acceptable, mais non quantifiable. La LoQ correspond à la plus petite concentration pouvant être quantifiée de

façon fiable. Dans les matrices dopées, elles sont estimées au voisinage du temps de rétention du composé à analyser à partir du rapport signal sur bruit (S/N), où la LoD est donnée pour un S/N = 3 et la LoQ pour un S/N = 10. Le signal correspond à la hauteur du pic chromatographique du composé analysé, et le bruit correspond à la hauteur maximale de variation du bruit de fond. Dans les blancs, les LoD et LoQ sont déterminées en multipliant l'écart-type des concentrations mesurées par 3 (LoD) ou par 10 (LoQ). Les valeurs obtenues sont présentées en Annexe C.

Blancs de manipulation

Les blancs de manipulation subissent les mêmes étapes que les échantillons dans leurs préparations jusqu'à leur analyse. Un blanc par série est effectué afin de s'assurer d'une bonne manipulation et pour surveiller la contamination éventuelle lors de la préparation des échantillons (**Tableau 9**). Pour tous les blancs de manipulation, les concentrations du composé d'intérêt étaient inférieures à la LoQ.

Tableau 9. Nombre de blancs de manipulation réalisés par composé.

	PCB 153	**HBCD**	**BDE 99**	**Pyrène**	**1-OH-Pyrène**
Matrices solides	n = 10	n = 6	n = 9	n = 10	n = 2
Eaux	n = 3	n = 2	n = 4	n = 1	n = 1

Rendements de récupération

Les rendements de récupération (ou d'extraction) des matrices solides sont résumés dans le **Tableau 10**. A noter que pour l'HBCD, un point contrôle (Li) de concentration connue est utilisé pour contrôler la gamme de calibration utilisée pour la quantification, permettant également de calculer un rendement de récupération. Les rendements de récupération calculés sont compris entre 59 et 118 %, ce qui montre une bonne récupération des étalons internes.

Tableau 10. Rendements de récupération pour les matrices solides.

Composé analysé	Rendement de récupération (%)
PCB 153	61-114
BDE 99	59-118
BDE 47	59-118
α-HBCD	72-108
β-HBCD	75-106
γ-HBCD	78-138
Pyrène	61-116
1-OH-Pyrène	85

Rendements de quantification

Différentes matrices de référence ont été utilisées pour s'assurer de la justesse de manipulation :

- SRM 1941b : sédiment marin certifié pour les HAP et PCB ;
- SRM 2974a : moule (*Mytilus edulis*) certifiée pour certains PCB et PBDE ;
- SRM 1947 : tissu de poisson certifié pour certains PCB, PBDE et HBCD.

Pour les analyses dont aucune SRM n'était disponible au laboratoire (BDE 99 et -47), du sable de Fontainebleau, des gammares et feuilles peu contaminés ont été dopés. Pour les matrices sédimentaires, les rendements sont bons, compris entre 60 et 80 % (**Tableau 11**). Pour les organismes, les rendements sont corrects, entre et 59 et 118 %. Pour l'eau, les rendements sont compris entre 88 et 114 %.

Tableau 11. Rendements de justesse (ou de quantification) pour les différentes matrices de référence (SRM) ou dopées.

	Justesse (%)						
	Eau	**Sable**	**Gammare**	**Feuille**	**SRM 1941b**	**SRM 2974a**	**SRM 1947**
PCB153	89.0 ± 1.0 (n=2)	76.8 ± 11.3 (n=8)	-	-	69.8 ± 7.6 (n=6)	68 (n=1)	64.6 ± 11.8 (n=4)
BDE-99	91 (n=1)	93 ±5.2 (n=8)	104 ±7.5 (n=3)	90.7 ±4.0 (n=3)	-	79.5±16.2 (n=2)	-
BDE-47	-	94.5 ±13.3 (n=8)	109 ±8.4 (n=3)	95.7 ±5.0 (n=3)	-	-	-
α-HBCD	103 (n=1)	90 ±7 (n=6)	-	-	-	107±57 (n=3)	-
β-HBCD	98 (n=1)	74 ±10 (n=6)	-	-	-	70 ±47 (n=3)	-
γ-HBCD	114 (n=1)	85 ±12 (n=6)	-	-	-	-	-
Pyrène	-	128 ±37 (n=10)	-	-	67 ±10 (n=8)	-	-

2.7 MODELISATION ET INFERENCE

2.7.1 Modélisation

Cadre générique

Les modèles TK sont dit génériques lorsqu'ils sont développés de manière à prédire le devenir d'un ensemble de substances dans différentes espèces (Grech *et al.* 2019).

Pour les invertébrés aquatiques, l'organisme est considéré entier, sans distinction des organes. Dans ce cas, le processus de bioaccumulation correspond à la différence nette entre un ou plusieurs flux entrants (absorption), et un ou plusieurs flux sortants (élimination). Deux équations différentielles génériques prenant en compte différentes voies d'absorption et d'élimination, distinguant la phase d'accumulation et celle de dépuration et sur la base de cinétiques de premier ordre, peuvent s'écrire (Eqs. (12) et (13)) :

$$\begin{cases} \dfrac{dC(t)}{dt} = \sum_{i=1}^{n}\left(k_i \times C_i(t)\right) - \sum_{j=1}^{p}\left(k_j \times C(t)\right) & \text{pour } 0 < t < t_c \quad (12) \\ \dfrac{dC(t)}{dt} = -\sum_{j=1}^{p}\left(k_j \times C(t)\right) & \text{pour } t > t_c \quad (13) \end{cases}$$

avec $C(t)$ la concentration (ng g^{-1} pf) dans l'organisme entier au temps t (en jours), n le nombre de sources de contaminants pour l'organisme, k_i le taux d'absorption pour la source de contamination i (j^{-1}), $C_i(t)$ la concentration du contaminant dans la source i au temps t (ng g^{-1} ps), p le nombre de voies d'élimination, k_j le taux d'élimination correspondant au processus j (j^{-1}) et t_c le temps correspondant à la fin de la phase d'exposition (en jours).

En considérant que les concentrations dans les matrices d'exposition sont constantes au cours du temps (cas particulier de conditions de laboratoire), les équations (12) et (13) peuvent être intégrées analytiquement (Eqs. (14) et (15)) :

$$\begin{cases} C(t) = \dfrac{\sum_{i=1}^{n}(k_i \times C_i)}{\sum_{j=1}^{p} k_j} + \left(C_0 - \dfrac{\sum_{i=1}^{n}(k_i \times C_i)}{\sum_{j=1}^{p} k_j}\right) \times e^{-\left(\sum_{j=1}^{p} k_j\right) \times t} & \text{pour } 0 < t < t_c \quad (14) \\ C(t) = \dfrac{\sum_{i=1}^{n}(k_i \times C_i)}{\sum_{j=1}^{p} k_j} \times e^{-\left(\sum_{j=1}^{p} k_j\right) \times (t - t_c)} + \left(C_0 - \dfrac{\sum_{i=1}^{n}(k_i \times C_i)}{\sum_{j=1}^{p} k_j}\right) \times e^{-\left(\sum_{j=1}^{p} k_j\right) \times t} & \text{pour } t > t_c \quad (15) \end{cases}$$

avec C_0 (ou C(t=0)) la concentration en contaminant dans les organismes entiers (ng g^{-1} pf) au début de l'expérience.

Le modèle générique ci-dessus peut être adapté au cas par cas, en fonction des connaissances disponibles sur l'organisme (mode d'alimentation) et le contaminant.

Prise en compte de la croissance

La croissance peut être considérée comme un processus d'élimination, dans la mesure où elle conduit à une dilution du contaminant. Parmi les organismes testés, seul le chironome est supposé grandir pendant les expériences. Pour le gammare et le radix, la croissance est négligée pour la durée des expériences.

Le modèle de croissance le plus utilisé est celui de von Bertalanffy (Eq. (16)) :

$$\frac{dL(t)}{dt} = k_g \times (L_{max} - L(t)) \Leftrightarrow L(t) = L_{max} - (L_{max} - L_0) \times e^{-k_g \times t} \qquad (16)$$

où $L(t)$ est la taille de l'organisme au temps t (jour), L_{max} la taille maximale de l'organisme (mm), L_0 la taille à la naissance de l'organisme (mm) et k_g le taux de croissance (jour^{-1}).

Le taux de croissance k_g peut alors être intégré dans les équations génériques (Eqs. (12) et (13)). Pour l'ensemble des organismes étudiés, le modèle comprenant l'absorption par l'eau, les feuilles et le sédiment ainsi que la dilution par la croissance peut alors s'écrire (Eq. (17)) :

$$\frac{dC(t)}{dt} = k_w \times C_w + k_l \times C_l + k_s \times C_s - (k_e + k_g) \times C(t) \qquad \text{pour } 0 < t < t_c \qquad (17)$$

où k_w le taux d'accumulation par l'eau (j^{-1}), C_w la concentration totale d'exposition dans l'eau (µg L^{-1}), k_l le taux d'ingestion par la nourriture (j^{-1}), C_l la concentration totale d'exposition dans la nourriture (ng g^{-1} ps), k_s le taux d'ingestion par le sédiment (j^{-1}), C_s la concentration totale d'exposition dans le sédiment (ng g^{-1} ps) et k_e le taux d'élimination (j^{-1}).

Prise en compte de la biotransformation

La biotransformation est considérée comme un processus d'élimination pour le composé parent (k_m), qui s'ajoute aux deux précédents (k_e et k_g). Le métabolite x a un taux d'absorption qui est supposé équivalent au taux de biotransformation ($k_{m,x}$), ainsi qu'un taux d'élimination correspondant ($k_{emet,x}$).

A partir de l'équation (17), l'équation la plus complète pour la cinétique du composé parent, comprenant l'absorption par l'eau, le sédiment et les feuilles ainsi que la dilution par la croissance et l'élimination par biotransformation, peut alors s'écrire (Eq. (18)):

$$\frac{dC(t)}{dt} = k_w \times C_w + k_s \times C_s + k_l \times C_l - (k_e + k_g + \sum_{x=1}^{z} k_{m,x}) \times C(t) \quad \text{pour } 0 < t < t_c \quad (18)$$

où $k_{m,x}$ correspond au taux de biotransformation du contaminant parent en son métabolite x et

z est le nombre de métabolites.

La cinétique du ou des métabolites x peut être écrite de la manière suivante (Eq. (19)) :

$$\frac{dC_{met_x}(t)}{dt} = \sum_{x=1}^{p} k_{m,x} \times C(t) - \sum_{x=1}^{p} k_{emet,x} \times C_{met,x}(t) \qquad \text{pour } 0 < t < t_c \qquad (19)$$

où $C_{met,x}(t)$ la concentration du métabolite x (ng g^{-1} pf) au temps t (jours) et $k_{emet,x}$ le taux d'élimination du métabolite x (jour^{-1}).

Les équations (18) et (19) peuvent être intégrées analytiquement de la même façon que l'équation (12).

2.7.2 Ajustement du modèle aux données expérimentales par inférence Bayésienne

L'inférence Bayésienne est utilisée pour estimer les paramètres du modèle, qui est ajustée à toutes les données expérimentales simultanément. Comme évoqué dans la section 1.2.1, les modèles TK sont constitués d'une partie déterministe ($f(x,\theta)$ dans l'Eq. (1)) et d'une partie stochastique (ε). La section précédente (2.7.1) a présenté la partie déterministe du modèle. Dans cette section, les liens stochastiques utilisés vont être présentés.

Stochasticité

La concentration observée du contaminant dans l'organisme au temps t pendant les expériences, notée $C_{obs}(t)$, suit une loi normale (Eq. (20)) :

$$C_{obs}(t) = C(t) + \varepsilon \quad \text{avec } \varepsilon \sim \mathcal{N}(0, \sigma^2) \qquad (20)$$

où $\mathcal{N}$ correspond à la loi normale, $C(t)$ correspond à la concentration du contaminant dans l'organisme au temps t prédite par le modèle selon les équations (14) et (15), et σ l'écart-type de la concentration du contaminant dans l'organisme.

La concentration observée du métabolite x dans l'organisme au temps t pendant les expériences, notée $C_{obs,met_x}(t)$, suit également une loi normale (Eq. (21)) :

$$C_{obs,met_x}(t) = C_{met_x}(t) + \varepsilon_{met} \quad \text{avec } \varepsilon_{met} \sim \mathcal{N}(0, \sigma_{met,x}^2) \qquad (21)$$

où $C_{met_x}(t)$ correspond à la concentration du métabolite x dans l'organisme au temps t prédite par le modèle selon l'équation (19), et $\sigma_{met,x}$ l'écart-type de la concentration du métabolite x dans l'organisme.

La taille observée des organismes au cours du temps t pendant les expériences, notée $L_{obs}(t)$, suit une loi normale (Eq. (22)) :

$$L_{obs}(t) = L(t) + \varepsilon_L \quad \text{avec } \varepsilon_L \sim \mathcal{N}(0, \sigma_L^2) \tag{22}$$

où $L(t)$ la taille prédite par le modèle de von Bertalanffy au temps t (Eq.(16)), et σ_L l'écart-type de la taille de l'organisme.

Représentation graphique

Pour illustrer les liens déterministes et stochastiques entre les différentes variables et paramètres du modèle, des graphiques acycliques orientés (Directed Acyclic Graph-DAG) sont utilisés. Les données observées (ou covariables) sont représentées par des rectangles, alors que les variables aléatoires (données à prédire) sont symbolisées par des ellipses. Ce sont les nœuds du graphe ; les nœuds du même niveau sont contenus dans un cadre. Les liens déterministes (ou logiques) correspondent aux flèches pointillées, alors que les liens stochastiques sont représentés par les flèches pleines. La représentation graphique du modèle le plus complet (Eqs. (18) et (19)) avec variables, paramètres, données et liens est présentée sur la **Figure 41**.

Définition des priors

Les distributions *a priori* ont été définies selon les données disponibles dans la littérature et selon les connaissances disponibles avant les expériences. Le **Tableau 12** résume l'ensemble des distributions *a priori* utilisées pour les différents ajustements des modèles aux données obtenues au laboratoire. En général, peu d'information étaient disponibles dans la littérature, une distribution uniforme sur le logarithme décimal (-5,2) a donc été définie pour la plupart des paramètres cinétiques. Lorsque la distribution marginale obtenue était proche des limites de la distribution *a priori*, l'inférence a été de nouveau réalisée avec une distribution *a priori* possédant des bornes plus larges (e.g. $\log_{10}$-unif (−20, 2)). Pour les paramètres de précision (σ^2), nous utilisons une distribution *a priori* gamma (0.001, 0.001) non informative mais possédant une grande variance, distribution classiquement utilisée (Lambert *et al.* 2005, Richards et Chaloupka 2009).

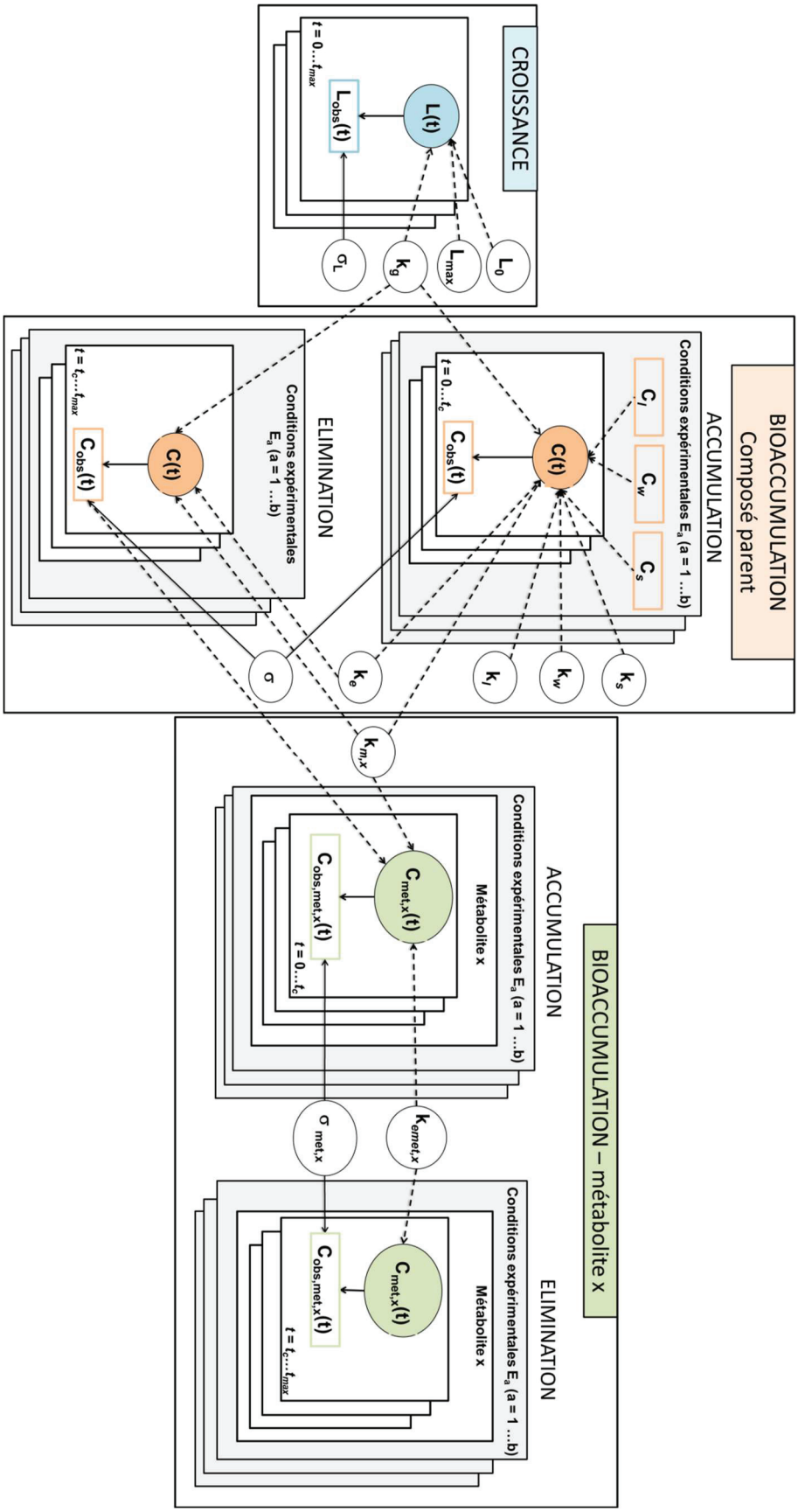


Figure 41. DAG du modèle TK le plus complet avec trois sources de contamination (feuilles C_l, eau C_w et sédiment C_s), et trois sources d'élimination (excrétion, dilution par la croissance et biotransformation).

Tableau 12. Résumé des distributions *a priori.*

Contaminant	Organisme	Paramètre	Prior	Source
PCB 153	Chironome	k_s	Log_{10}-normal (0.113, 5)	Schuler *et al.* (2003)
		k_e	Log_{10}-normal (-0.578, 5)	
		k_g	Log_{10}-normal (0.236, 2)	Péry *et al.* (2002)
		L_0	Log_{10}-normal (0.778, 0.64)	
		L_{max}	Log_{10}-normal (1.056, 0.64)	
	Radix	k_s	Log_{10}-unif (−5, 2)	
		k_e	Log_{10}-unif (−20, 2)	
	Gammare	k_l	Log_{10}-unif (−5, 2)	
		k_s	Log_{10}-unif (−5, 2)	
		k_e	Log_{10}-unif (−5, 2)	
BDE 99	Radix	k_s	Log_{10}-unif (−5, 2)	
		k_e	Log_{10}-unif (−20, 2)	
	Gammare	k_l	Log_{10}-unif (−5, 2)	
		k_s	Log_{10}-unif (−5, 2)	
		k_e	Log_{10}-unif (−5, 2)	
Pyrène	Gammare	k_s	Log_{10}-unif (−5, 2)	
		k_e	Log_{10}-unif (−5, 2)	
		k_m	Log_{10}-unif (−5, 2)	
		k_{emet}	Log_{10}-unif (−5, 2)	

Implémentation du modèle : simulations MCMC

Les logiciels JAGS et R (package « rjags ») ont été utilisés pour réaliser l'inférence des paramètres des modèles, ayant recourt à l'algorithme échantillonneur de Gibbs.

Des valeurs initiales sont attribuées pour chaque paramètre du modèle pour chacune des chaînes MCMC (n = 3). Par la suite, une phase de chauffe, aussi appelée « burn-in phase », est nécessaire pour amorcer les premières simulations qui ne seront pas prises en compte par la suite. Pour cela, un nombre d'itérations est défini, pouvant être augmenté ou diminué en fonction de la vitesse de convergence de l'algorithme. Par ailleurs, de par leur construction, les chaînes MCMC sont généralement autocorrélées. Si l'autocorrélation est trop importante, il est conseillé d'augmenter le nombre d'itérations et la valeur de l'argument d'amincissement *thin.* Cet argument permet de choisir une simulation sur un certain nombre *thin* (par exemple, un *thin* d'une valeur 2 gardera une simulation sur deux, un *thin* de 10 une simulation sur dix, etc.), d'où l'importance d'augmenter parallèlement le nombre d'itérations. La méthode de Raftery et Lewis (1992) a été utilisée pour calculer le nombre d'itérations n minimal et l'amincissement *thin* correspondant pour chacun des modèles testés. Cette méthode permet de définir une taille efficace (N_{min}) suffisante pour estimer correctement la distribution *a posteriori* de chacun des paramètres, qui est proportionnelle au ratio du nombre d'itérations et du *thin*.

Pour vérifier la convergence des chaînes MCMC, une représentation graphique peut tout d'abord être utilisée pour inspecter visuellement la superposition des trois chaînes, et de leur convergence vers des valeurs communes pour chacun des paramètres. De plus, deux critères de convergence seront utilisés : le critère de Gelman *et al.* (1995) et le critère de Geweke (1989). Le critère de Gelman et Rubin réalise une comparaison de variance, en calculant pour chaque paramètre la racine carrée du rapport entre la variance de la distribution *a posteriori* marginale par rapport à la variance intra-chaîne. Ce critère doit être égal à 1 pour s'assurer que la variance inter-chaîne est négligeable face à la variance intra-chaîne. Le critère de Geweke quant à lui se base sur le test de l'égalité des moyennes des valeurs simulées en début et en fin de chaîne. Il faut que les valeurs calculées soient comprises entre -2 et 2 pour s'assurer de la convergence.

Après convergence, les valeurs simulées dans les trois chaînes sont alors assemblées dans un même jeu de données, dans lequel un tirage aléatoire de x simulations est effectué pour alléger les représentations graphiques de la distribution *a posteriori* jointe. De cette distribution jointe *a posteriori* sera issue la distribution marginale pour chacun des paramètres, qui pourra être résumée par sa moyenne, médiane, et son intervalle de crédibilité à 95 %.

Pertinence des estimations obtenues et comparaison des modèles

L'évaluation de la pertinence des estimations s'est effectuée :

- en comparant les distributions *a priori* et *a posteriori* marginales des paramètres. Lorsque la superposition des distributions *a priori* est plus large que les distributions *a posteriori* marginales de chacun des paramètres du modèle, cela montre que les données expérimentales apportent suffisamment d'information pour estimer précisément les paramètres et ainsi resserrer les lois *a priori* ;
- en simulant les prédictions du modèle pour visualiser la qualité d'ajustement des prédictions aux données observées.

Selon le mode de vie de l'espèce, le contaminant considéré et le design expérimental, différentes hypothèses peuvent être émises sur les voies d'absorption et d'élimination. Ainsi, pour un même couple espèce/contaminant, plusieurs hypothèses traduites par différents sous-modèles ont été testées. Afin de comparer les ajustements des sous-modèles testés sur les mêmes données, les valeurs du « Deviance Information Criterion » (DIC) ont été comparées. Ce critère permet de quantifier la précision de l'estimation des paramètres et la pertinence des prédictions. Le DIC calcule la déviance pénalisée par la complexité du modèle (i.e. le nombre de paramètres). Les sous-modèles ayant les valeurs de DIC les plus faibles sont ceux ayant le « meilleur » compromis entre leur capacité de prédiction et leur complexité. Dans la littérature, la différence de DIC pour « choisir » des modèles est controversée : certains auteurs affirment que deux modèles sont différents à partir d'une différence de 10, d'autre à partir d'une différence de 5. Le principe de parcimonie a également été appliqué, ce qui a permis de sélectionner le sous-modèle ayant le minimum de paramètres, qui sont suffisant pour expliquer les données observées.

Les stratégies expérimentales, méthodes d'analyses chimiques, de modélisations et d'inférences ont été présentées dans ce chapitre. Le modèle générique et son carde d'inférence sera ajusté en fonction des données expérimentales, c'est-à-dire de l'espèce testée, du contaminant auquel elle aura été exposée et les différentes sources de contamination et d'élimination (**Tableau 13**).

Tableau 13. Résumé des différentes données collectées et des sous-modèles testés dans les différentes expériences.

Expérience	Hypothèse	Données produites	Equation(s) du modèle (pour $0 < t < t_c$)
Chironome exposé au PCB 153 (Article 1)	Exposition par l'eau ; dilution par la croissance $k_s = 0$	C_w, $C_{obs}(t)$, $L_{obs}(t)$	$\frac{dC(t)}{dt} = k_w \times C_w - (k_e + k_g) \times C(t)$ $L(t) = L_{max} - (L_{max} - L_0) \times e^{-k_g \times t}$
	Exposition par le sédiment, dilution par la croissance $k_w = 0$	C_s, $C_{obs}(t)$, $L_{obs}(t)$	$\frac{dC(t)}{dt} = k_s \times C_s - (k_e + k_g) \times C(t)$ $L(t) = L_{max} - (L_{max} - L_0) \times e^{-k_g \times t}$
	Exposition par l'eau et le sédiment, dilution par la croissance	C_w, C_s, $C_{obs}(t)$, $L_{obs}(t)$	$\frac{dC(t)}{dt} = k_w \times C_w + k_s \times C_s - (k_e + k_g) \times C(t)$ $L(t) = L_{max} - (L_{max} - L_0) \times e^{-k_g \times t}$
Radix exposé au mélange PCB 153 / BDE 99 (Note 1, Article 3)	Exposition par l'eau $k_s = 0$	$C_{w,PCB\ 153}$, $C_{w,BDE\ 99}$, $C_{obs,PCB\ 153}(t)$, $C_{obs,BDE\ 99}(t)$	$\frac{dC(t)}{dt} = k_w \times C_w - k_e \times C(t)$
	Exposition par le sédiment $k_w = 0$	$C_{s,PCB\ 153}$, $C_{s,BDE\ 99}$, $C_{obs,PCB\ 153}(t)$, $C_{obs,BDE\ 99}(t)$	$\frac{dC(t)}{dt} = k_s \times C_s - k_e \times C(t)$
	Exposition par l'eau et le sédiment	$C_{w,PCB\ 153}$, $C_{w,BDE\ 99}$, $C_{s,PCB\ 153}$, $C_{s,BDE\ 99}$, $C_{obs,PCB\ 153}(t)$, $C_{obs,BDE\ 99}(t)$	$\frac{dC(t)}{dt} = k_w \times C_w + k_s \times C_s - k_e \times C(t)$

Expérience	Hypothèse	Données produites	Equation(s) du modèle (pour $0 < t < t_c$)
Gammare exposé au PCB 153 (Article 1)	Exposition par l'eau E1 : k_s et $k_l = 0$ E2 : k_s et $k_l = 0$	$C_{w,E1}$, $C_{w,E2}$, $C_{obs,E1}(t)$, $C_{obs,E2}(t)$	$\begin{cases} \frac{dC_{E1}(t)}{dt} = k_w \times C_{w,E1} - k_e \times C_{E1}(t) \\ \frac{dC_{E2}(t)}{dt} = k_w \times C_{w,E2} - k_e \times C_{E2}(t) \end{cases}$
	Exposition par les feuilles E1 : k_s et $k_w = 0$ E2 : k_s et $k_w = 0$	$C_{l,E1}$, $C_{l,E2}$, $C_{obs,E1}(t)$, $C_{obs,E2}(t)$	$\begin{cases} \frac{dC_{E1}(t)}{dt} = k_l \times C_{l,E1} - k_e \times C_{E1}(t) \\ \frac{dC_{E2}(t)}{dt} = k_l \times C_{l,E2} - k_e \times C_{E2}(t) \end{cases}$
	Exposition par les feuilles (E1) ou le sédiment (E2) E1 : k_s et $k_w = 0$ E2 : k_l et $k_w = 0$	$C_{l,E1}$, C_s, $C_{obs,E1}(t)$, $C_{obs,E2}(t)$	$\begin{cases} \frac{dC_{E1}(t)}{dt} = k_l \times C_{l,E1} - k_e \times C_{E1}(t) \\ \frac{dC_{E2}(t)}{dt} = k_s \times C_s - k_e \times C_{E2}(t) \end{cases}$
	Exposition par les feuilles (E1) ou le sédiment et les feuilles (E2) E1 : k_s et $k_w = 0$ E2 : $k_w = 0$	$C_{l,E1}$, $C_{l,E2}$, C_s, $C_{obs,E1}(t)$, $C_{obs,E2}(t)$	$\begin{cases} \frac{dC_{E1}(t)}{dt} = k_l \times C_{l,E1} - k_e \times C_{E1}(t) \\ \frac{dC_{E2}(t)}{dt} = k_s \times C_s + k_l \times C_{l,E2} - k_e \times C_{E2}(t) \end{cases}$
	Exposition par l'eau et les feuilles E1 : $k_s = 0$ E2 : $k_s = 0$	$C_{l,E1}$, $C_{l,E2}$, $C_{w,E1}$, $C_{w,E2}$, $C_{obs,E1}(t)$, $C_{obs,E2}(t)$	$\begin{cases} \frac{dC_{E1}(t)}{dt} = k_w \times C_{w,E1} + k_l \times C_{l,E1} - k_e \times C_{E1}(t) \\ \frac{dC_{E2}(t)}{dt} = k_w \times C_{w,E2} + k_l \times C_{l,E2} - k_e \times C_{E2}(t) \end{cases}$
	Exposition par l'eau et les feuilles (E1) ou par l'eau et le sédiment E1 : $k_s = 0$ E2 : $k_l = 0$	C_s, $C_{l,E1}$, $C_{w,E1}$, $C_{w,E2}$, $C_{obs,E1}(t)$, $C_{obs,E2}(t)$	$\begin{cases} \frac{dC_{E1}(t)}{dt} = k_w \times C_{w,E1} + k_l \times C_{l,E1} - k_e \times C_{E1}(t) \\ \frac{dC_{E2}(t)}{dt} = k_w \times C_{w,E2} + k_s \times C_s - k_e \times C_{E2}(t) \end{cases}$
	Exposition par l'eau et les feuilles (E1) ou par l'eau, le sédiment et les feuilles E1 : $k_s = 0$	C_s, $C_{l,E1}$, $C_{l,E2}$, $C_{w,E1}$, $C_{w,E2}$, $C_{obs,E1}(t)$, $C_{obs,E2}(t)$	$\begin{cases} \frac{dC_{E1}(t)}{dt} = k_w \times C_{w,E1} + k_l \times C_{l,E1} - k_e \times C_{E1}(t) \\ \frac{dC_{E2}(t)}{dt} = k_w \times C_{w,E2} + k_s \times C_s + k_l \times C_{l,E2} - k_e \times C_{E2}(t) \end{cases}$

Expérience	Hypothèse	Données produites	Equation(s) du modèle (pour $0 < t < t_c$)
Gammare exposé au BDE 99 (Article 3)	Exposition par les feuilles (E1) ou le sédiment (E2) E1 : k_s et $k_w = 0$ E2 : k_l et $k_w = 0$	$C_{l,E1}$, C_s, $C_{obs,E1}(t)$, $C_{obs,E2}(t)$	$\begin{cases} \frac{dC_{E1}(t)}{dt} = k_l \times C_{l,E1} - k_e \times C_{E1}(t) \\ \frac{dC_{E2}(t)}{dt} = k_s \times C_s - k_e \times C_{E2}(t) \end{cases}$
Chironome exposé à l'HBCD (Article 3)	Exposition par le sédiment, dilution par la croissance $k_w = 0$	C_s, $C_{obs}(t)$, $L_{obs}(t)$	$\frac{dC(t)}{dt} = k_s \times C_s - (k_e + k_g) \times C(t)$ $L(t) = L_{max} - (L_{max} - L_0) \times e^{-k_g \times t}$
Gammare exposé à l'∑HBCD (Article 3)	Exposition par le sédiment $k_w = 0$	C_s, $C_{obs,\sum HBCD}(t)$,	$\frac{dC(t)}{dt} = k_s \times C_s - k_e \times C(t)$
Gammare exposé au pyrène (Note 2)	Exposition par les feuilles (E1) ou le sédiment (E2) $k_w = 0$	$C_{l,E1}$, C_s, $C_{obs,E1}(t)$, $C_{obs,E2}(t)$, $C_{obs,met,E1}(t)$, $C_{obs,met,E2}(t)$	$\begin{cases} \frac{dC_{E1}(t)}{dt} = k_l \times C_{l,E1} - (k_e + k_m) \times C_{E1}(t) \\ \frac{dC_{met,E1}(t)}{dt} = k_m \times C_{E1}(t) - k_{emet} \times C_{met,E1}(t) \end{cases}$ $\begin{cases} \frac{dC_{E2}(t)}{dt} = k_s \times C_s - (k_e + k_m) \times C_{E2}(t) \\ \frac{dC_{met,E2}(t)}{dt} = k_m \times C_{E2}(t) - k_{emet} \times C_{met,E2}(t) \end{cases}$

Chapitre 3 : Cadre Bayésien pour estimer les paramètres d'un modèle TK générique par les invertébrés benthiques: preuve de concept avec le PCB 153

3.1 OBJECTIF

L'objectif de ce chapitre est de proposer un cadre d'inférence Bayésienne pour estimer simultanément tous les paramètres d'un modèle TK chez plusieurs espèces d'invertébrés. Pour cela, des cinétiques d'accumulation et d'élimination du PCB 153 chez les deux invertébrés *C. riparius* et *G. fossarum* ont été réalisées au laboratoire. Les résultats sont présentés dans l'article Ratier et al. (2019) qui constitue ce chapitre : "*A Bayesian framework for estimating parameters of a generic toxicokinetic model for the bioaccumulation of organic chemicals by benthic invertebrates: Proof of concept with PCB 153 and two freshwater species",* publié dans *Ecotoxicology and Environnemental Safety*. Les informations supplémentaires associées à l'article sont présentées à la suite de l'article. Des résultats complémentaires ont également été ajoutés en fin de chapitre (Note 1), présentant l'applicabilité de ce cadre de modélisation et d'inférence à une autre espèce d'invertébrés : *Radix auricularia*.

3.2 ARTICLE 1

A Bayesian framework for estimating parameters of a generic toxicokinetic model for the bioaccumulation of organic chemicals by benthic invertebrates: proof of concept with PCB153 and two freshwater species.

Aude Ratier[a], Christelle Lopes[b,*], Pierre Labadie[c], Hélène Budzinski[c], Nicolas Delorme[a], Hervé Quéau[a], Laurent Peluhet[c], Olivier Geffard[a], Marc Babut[a].

[a]Irstea, UR RiverLy, centre de Lyon-Villeurbanne, 5 Avenue de la Doua, CS20244, 69625 Villeurbanne Cedex, France.

[b]Univ Lyon, Université Lyon 1, CNRS, Laboratoire de Biométrie et Biologie Evolutive UMR5558, F-69622 Villeurbanne, France.

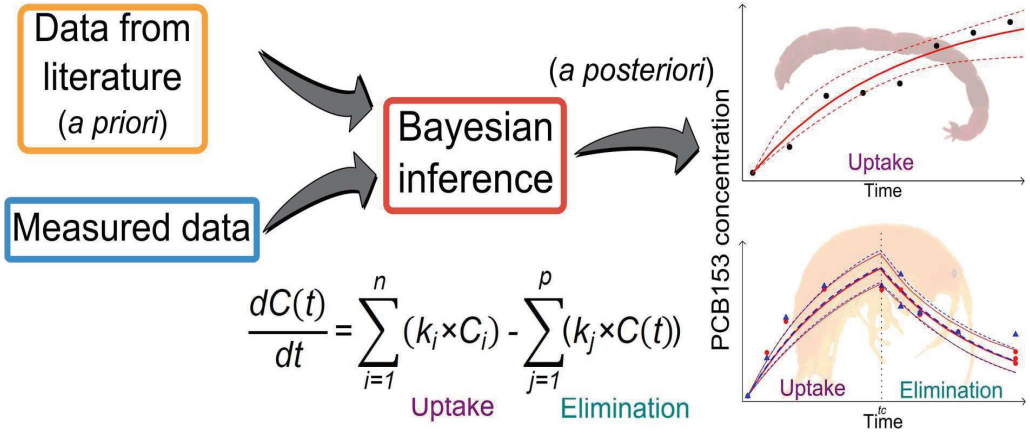
[c]CNRS, Environnements et Paléoenvironnements Océaniques et Continentaux (EPOC), UMR 5805, Laboratoire de Physico- et Toxico-Chimie de l'environnement (LPTC), Université de Bordeaux, 351 cours de la Libération, 33405 Talence, France.

[*] Corresponding author: christelle.lopes@univ-lyon1.fr

Highlights

- A generic TK model in a Bayesian framework was proposed
- Each uptake and elimination route was considered as a module in the model
- Model parameter estimates are relevant regarding species difference

Graphical abstract



Abstract

Toxicokinetic (TK) models are relevant and widely used to predict chemical concentrations in biological organisms. The importance of dietary uptake for aquatic invertebrates has been increasingly assessed in recent years. However, the model parameters are estimated on limited specific laboratory data sets that are bounded by several uncertainties. The aim of this study was to implement a Bayesian framework for simultaneously estimating the parameters of a generic TK model for benthic invertebrate species from all data collected. We illustrate our approach on the bioaccumulation of PCB153 by two species with different life traits and therefore exposure routes: *Chironomus riparius* larvae exposed to spiked sediment for 7 days and *Gammarus fossarum* exposed to spiked sediment and/or leaves for 7 days and then transferred to a clean media for 7 more days. The TK models assuming first-order kinetics were fitted to the data using Bayesian inference. The median model predictions and their 95% credibility intervals showed that the model fit the data well. From a methodological point of view, this paper illustrates that simultaneously estimating all model parameters from all available data by Bayesian inference, while considering the correlation between parameters and different types of data, is a real added value for TK modeling. Moreover, we demonstrated the ability of a generic TK model considering uptake and elimination routes as modules to add according to the availability of the data measured. From an ecotoxicological point of view, we show differences in PCB153 bioaccumulation between chironomids and gammarids, explained by the different life traits of these two organisms.

Keywords: Bioaccumulation – Benthic invertebrates – PCB153 – Bayesian inference – Toxicokinetic model

1. Introduction

In environmental risk assessment (ERA), models based on toxicokinetic (TK) approaches are widely recognized as providing diagnostics (models for understanding) and prognostics (models for prediction), sometimes used by decision-makers (e.g., Pavan, 2006; EPA, 2006; IPCS, 2010). TK models are relevant and widely used to predict chemical concentrations in biological organisms from those to which they are exposed in their environment. This process, also called bioaccumulation, depends on environmental conditions (temperature, light, food availability), contaminant properties (octanol-water partition coefficient, water solubility, dissociation and volatilization, sorption in sediment) (Mamy, 2015) and biological characteristics of the species (life traits, diet, lifecycle). TK models describe the process of bioaccumulation as the net balance between the uptake of contaminants from different sources (water, diet) and their elimination by different processes (excretion, growth and/or biotransformation) (MacKay and Fraser, 2000). Different TK models have been proposed, such as compartmental models and physiologically based toxicokinetic (PBTK) models (Grech, 2017; Landrum, 1992). Compartmental models describe toxicant fluxes between compartments, which may or may not have a physiologic or anatomic meaning. A PBTK model subdivides the body into compartments representing real tissues or organs connected through a fluid, usually blood (Bois and Brochot, 2016). For aquatic invertebrates, compartmental models were originally developed for metals and then for some organic contaminants where the organism is often considered as a single compartment.

For soluble contaminants, it is usually assumed that the water column is the main exposure and uptake route. Nevertheless, dietary uptake is of greater

importance for hydrophobic contaminants due to their high adsorption on organic matter or food (GrossSorokin, 2003). Moreover, it has been shown for several aquatic invertebrates, such as the insect *Chironomus riparius*, that exposure to sediment cannot be ignored (Leppänen and Kukkonen, 1998; Sidney, 2016). The importance of dietary uptake for aquatic invertebrates has been increasingly assessed in recent years (Ashauer 2010, Carrasco-Navarro, 2015; Englert, 2017; Miller, 2017; Rösch, 2017). *Chironomus* sp. and *Gammarus* sp. are freshwater invertebrates widely used in ecotoxicology, due to their widespread presence throughout the Northern hemisphere and their capacity to accumulate various organic and inorganic contaminants (Amiard, 1987; Ashauer, 2012; Bertin, 2014; Lebrun, 2011; López-Doval, 2012; Lydy, 1999). These organisms are also an important food source for fish, amphibians and birds (Macneil, 1999), hence the transfer of contaminants within the aquatic food web.

Nowadays, TK model parameters are often determined from short-term exposures of organisms under controlled laboratory conditions (Ashauer, 2010). OECD Guideline 315 (OECD, 2008) suggests two methods to estimate the uptake and elimination rates. The most frequently used sequential method estimates the elimination rate using nonlinear regression depuration data which is then fixed to estimate the uptake rate with the uptake data. As elimination also occurs during the accumulation phase, separately estimating parameters that are linked does not allow taking into account their correlation on uncertainty. However, the precision of parameter estimates is a relevant point to strengthen environmental assessments (Lin, 2004; Richards and Chaloupka, 2009). The simultaneous method estimates both the uptake and elimination rates together, and is considered a potentially more reliable and more realistic model. Only recent studies (Ashauer, 2010; Miller, 2016,

2017) have applied simultaneous methods for parameter approximation. Sequential or simultaneous methods can be deployed in a frequentist or Bayesian approach. Apart from the problem of the correlation between all the model's parameters, the frequentist approach (sequential or simultaneous) cannot simultaneously use different kinds of data (e.g., bioaccumulation and growth data) to estimate common parameters. Bayesian inference bypasses these limits by estimating all model parameters from all kinds of data (Gelman, 1995) and thus provides a more comprehensive approach and a better quantification of uncertainty in parameter estimates as well as a better consideration of variability in model predictions (Bernillon and Bois, 2000). The application of Bayesian inference to TK models in aquatic invertebrates remains limited (Lin, 2004).

The aim of this study was to propose a Bayesian framework to simultaneously estimate all the parameters of a generic TK model from uptake and elimination data together. As a first development step, we applied this concept to two aquatic invertebrate species. The resulting joint posterior distribution giving the probability distribution of all parameters together will enable a more accurate assessment of uncertainty around estimates and thus TK model predictions. We illustrate our approach with the bioaccumulation of the well-known contaminant PCB153 by two freshwater benthic invertebrate species with different life traits: the diptera *C. riparius* and the amphipod crustacean *Gammarus fossarum*.

2. Model

2.1 Generic TK model

A first-order kinetic bioaccumulation model that accounts for different uptake pathways and elimination processes can be expressed as follows (Eq. (1)):

$$\frac{dC(t)}{dt} = \sum_{i=1}^{n}(k_i \times C_i(t)) - \sum_{j=1}^{p}(k_j \times C(t)) \quad (1)$$

where $C(t)$ is the contaminant concentration at time t (days) in the whole organism (ng g_{org}^{-1} where the mass of the organism is expressed in wet weight (ww)), n is the number of contamination sources, k_i the uptake rate from the contamination source i, $C_i(t)$ the contaminant concentration in the contamination source i at time t (days), p the number of elimination processes and k_j the elimination rate related to process j.

If we consider that $C_i(t)$ are constant over time, Eq. (1) can be analytically integrated by distinguishing uptake (Eq. (2)) from elimination phases (Eq. (3)):

$$\begin{cases} C(t) = \frac{\sum_{i=1}^{n}(k_i \times C_i)}{\sum_{j=1}^{p} k_j} + \left(C_0 - \frac{\sum_{i=1}^{n}(k_i \times C_i)}{\sum_{j=1}^{p} k_j}\right) \times e^{-\left(\sum_{j=1}^{p} k_j\right) \times t} & \text{for } 0 < t < t_c \quad (2) \\ C(t) = \frac{\sum_{i=1}^{n}(k_i \times C_i)}{\sum_{j=1}^{p} k_j} \times e^{-\left(\sum_{j=1}^{p} k_j\right) \times (t-t_c)} + \left(C_0 - \frac{\sum_{i=1}^{n}(k_i \times C_i)}{\sum_{j=1}^{p} k_j}\right) \times e^{-\left(\sum_{j=1}^{p} k_j\right) \times t} & \text{for } t > t_c \quad (3) \end{cases}$$

where C_0 is the contaminant concentration in the whole organism at the beginning of exposure (ng g_{org}^{-1}) and t_c the time at the end of the uptake phase (days).

2.2 Application of the model to the two species studied

2.2.1 Chironomids

For chironomids, we consider that the exposure sources are water (respiration) and sediment (ingestion), while elimination occurs due to excretion and growth dilution; Eq. (1) can thus be rewritten as follows (Eq. (4)):

$$\frac{dC(t)}{dt} = k_w \times C_w + k_s \times C_s - \left(k_e + k_g\right) \times C(t) \quad (4)$$

where k_w is the uptake rate from the water (L g_{org}^{-1} d^{-1}), C_w the contaminant concentration in water (ng L^{-1}), k_s the uptake rate from the sediment (g_{sed} g_{org}^{-1} d^{-1}), C_s the contaminant concentration in sediment (ng g_{sed}^{-1} dw), k_e the elimination rate (d^{-1}) and k_g the growth rate (d^{-1}).

The chironomid growth rate is obtained from the von Bertalanffy growth equation (Eq. (5)), one of the most widely used models for describing the growth of benthic invertebrates (von Bertalanffy, 1938; K. Nakamura, 1973):

$$L(t) = L_{max} - (L_{max} - L_0) \times e^{(-k_g \times t)} \quad (5)$$

where L(t) is the chironomid size (mm) at time t (d), L_{max} is the asymptotic size (mm), L_0 is the size at birth (mm) and k_g is the growth rate (d^{-1}).

Given that, for highly hydrophobic compounds, contamination from water could be restricted, a sub-model considering sediment as the only contamination source was also fitted:

$$\frac{dC(t)}{dt} = k_s \times C_s - (k_e + k_g) \times C(t) \quad (6)$$

2.2.2 Gammarids

Gammarids feed on detritus such as litter (Forrow and Maltby, 2000). As a consequence, exposure to chemicals could occur from water, litter (leaves) and sediment consumption, since sediment particles deposit on the surface of leaves when gammarids forage (Bertin, 2016). Furthermore, we assumed that gammarids would not grow during the experiment, as shown by Galic and Forbes (2017), for the adult size considered here. As a result, Eq. (1) can be rewritten as follows (Eq. (7)):

$$\frac{dC(t)}{dt} = k_w \times C_w + k_s \times C_s + k_l \times C_l - k_e \times C(t) \quad (7)$$

where k_l is the uptake rate from the leaves (ng g_{org}^{-1} d^{-1}) and C_l the contaminant concentration in leaves (ng g^{-1}).

3. Materials and methods

3.1 Chemicals, reagents and quality control

Solid 2,2′, 4,4′, 5,5′ hexachlorobiphenyl (PCB153) was purchased from Sigma-Aldrich (St Quentin-Fallavier, France). A working solution was prepared in acetone at 1.01 g L^{-1} for the contamination of sediment and leaves. The native SRM2262 solution and the internal standard PCB198 (99%) used for the

quantification of PCB153 were provided by LGC Promochem (NIST) and Ultra Scientific, respectively. Native PCB153 recovery was determined using spiked samples for water (89 ± 1%), technical sand (75 ± 11%), sediment (NIST SRM1941b Organics in Marine Sediment, 64 ± 8%) and fish (NIST SRM 1947 Lake Michigan Fish Tissue, 65 ± 12%) reference materials. The limit of detection (LoD) was determined as the concentration with a signal-to-noise ratio of 3 (LoD = 0.003 ng L^{-1} for water, between 0.003 and 0.040 ng g^{-1} dw for sediment, leaves and organisms). Replicate procedural blanks (n = 13) were analyzed for each series of samples where the PCB153 concentration was always below the LoD.

3.2. Matrix spiking

3.2.1 Sediment spiking

In January and March 2017, 60 L of natural sediment was collected from a watercourse in the Miribel-Jonage nature park (Vaulx-en-Velin, eastern central France near Lyon, 4°59′27″E and 45°47′55″N for the chironomid experiment and 5°00′51″E and 45°79′71″N for the gammarid experiment). The sediment was collected using a manual dredger, sieved at 2 mm, pooled in a polypropylene (PP) jar, and stored at 4 ± 2 °C until they were used. For chironomid and gammarid experiments, respectively, the sediment was characterized by a water content of 67.9 and 51.0%, a particulate organic carbon content of 11.9 and 2.87% on dry weight matter, and 0.370 and 0.250% particulate nitrogen content. The sediment was homogenized and mixed with mechanical action (paint propeller connected to an electric drill) for 20 min.

Then 1.2 L of sediment was added in 20 and nine Pyrex bottles (2 L) for the chironomid and gammarid experiments, respectively. Each bottle was spiked with a solution of PCB153 in an acetone carrier at a nominal concentration of 100 and

50 ng g^{-1} dry weight (dw) for chironomid and gammarid experiments, respectively. The amount of carrier added to the sediment was minimal (0.07 and 0.08 $\mu L/g_{sed}$ for chironomid and gammarid experiments, respectively). Then each bottle was rotated for 24 h (chironomids) to 72 h (gammarids) at 15 revolutions per minute (rpm) at room temperature (21 °C). After 48 h storage at 4 °C, contaminated sediment in each bottle was transferred in a polypropylene jar and homogenized and restless with mechanical action for 20 min before being added to aquaria.

3.2.2 Leaf spiking

Alder leaves (*Alnus glutinosa*) were collected in November 2016 and stored in plastic boxes. Prior to exposing gammarids to PCB153, the alder leaves were placed in a bucket filled with several liters of ground water for 7 days at 21 °C. The water was renewed every 2 days to remove the exudates from the leaves. Several batches of 5 g_{dw} leaves were placed in Pyrex bottles (2 L) containing 1 L of groundwater and were spiked at a nominal concentration of wet weight basis 50 ng_{PCB153} $kg^{-1}_{leaf,ww}$ with a solution of 5 µg L^{-1} of PCB153 in acetone. These batches were rotated for 72 h at 10 rpm at room temperature (21 °C). Then leaves were rinsed with ground water for 3 days in Pyrex bottles before being placed in aquaria.

3.3 Organism exposure to PCB153

3.3.1 Chironomid exposure

A total of seven aquaria (38-20-24.5 cm in polystyrene) were prepared with 3 L of homogenized spiked sediment and 15 L of groundwater. Each aquarium was allowed to settle for 10 days before introducing the chironomids. A control aquarium was prepared in the same way with reagent control sediment (Fig. S1).

Benthic invertebrate C. riparius were obtained from laboratory cultures carried out according to standard methods (OECD, 2004; AFNOR, 2010). A total of 400

fourth-instar larvae (7-day-old larvae post-hatching, L4) were added to each aquarium. Chironomids were exposed to spiked sediment for 7 days at 21 ± 0.2 °C in aerated and static water. A 16:8-h light:dark cycle was maintained throughout the experiment. Larvae were fed every day with 400 mg commercial food Tetramin® per aquarium. The water quality parameters were monitored and are presented in Annex S1. Chironomid survival, length and wet weight were determined at each sampling time. To determine the total length, ten larvae were photographed using an IEEE 1394 Digital CCD camera (F2, FOculus, Germany) mounted on an Olympus BX51 light and SZX12 stereo zoom microscopes at low magnifications. The mean lengths were determined using digital image analysis software (SigmaScan Pro software).

3.3.2 Gammarid exposure

Three weeks before the start of the experiment, about 3,000 male gammarids were collected with a hand net at a reference site (Saint-Maurice de Rémens, France, 5°26′22″E - 45°95′79″N). Gammarids were brought to the laboratory and acclimated 3 weeks in aquaria with continuously renewed groundwater under constant aeration, a 16:8-h light:dark photoperiod was maintained and the temperature was kept at 12 °C. Organisms were fed ad libitum with alder leaves. Only male gammarids (11.4 ± 0.9 mm) were selected, in order to eliminate potential biases due to neonate release by females.

Gammarid experiments were composed of two phases: uptake and elimination. For the uptake phase, different exposure routes were tested: gammarids were exposed to spiked leaves (E1 condition) or to spiked sediment (E2 condition) for 7 days at 12 ± 0.2 °C under a 16:8-h light:dark cycle maintained throughout the experiment. A third condition (E3) was tested, similar to E2 but without organisms, in order to determine whether there was a contamination transfer from sediment to

leaves (Fig. S1). The overlying water was renewed daily under constant aeration. A control aquarium for E2 was prepared with homogenized reagent sediment (0.08 µL of acetone/g_{sed}).

At the beginning of the experiment, 300 individuals were added per aquarium (test and control). Gammarids exposed to the contaminated leaves (E1) were distributed in three aquariums each containing 15 L of groundwater and one batch of previously spiked leaves per aquarium. Organisms exposed to spiked sediment (E2) were distributed in three aquariums each containing 3 L of spiked sediment, 15 L of groundwater and one batch of previously clean re-hydrated leaves. After 7 days of exposure, gammarid survival for each condition was determined and the organisms were transferred to a clean medium: 270 organisms per aquarium with groundwater for the E1 condition or with clean sediment and groundwater for the E2 condition. During depuration, gammarids were fed with clean leaves (5 g dw). The water quality parameters were monitored and are presented in Annex S1. Gammarid survival, length and wet weight were determined at the end of the uptake and elimination phases.

3.4 Sample collection

The overlying water (OW) was sampled in 1-L polyethylene (PE) bottles. Subsamples from sediment were deposited in 180-mL PE tubes. Organisms were collected in 50-mL Falcon® tubes. Every day, chironomids were collected by sieving sediment at 500 µm. The OW and sediment samples were collected at days 0, 4 and 7. The OW, sediment and organism control samples were collected at days 0 and 7. At days 0, 1, 2, 4, 7, 8, 9, 11 and 14, 90 gammarids were collected for each condition (E1 and E2). The OW, sediment, leaf and organism control samples were collected at days 0, 7 and 14. All samples were stored at −21°C and lyophilized at −65°C

(Christ-Alpha 1-4LD, Bioblock Scientific) under a pressure of 0.050 mbar for 48 h for organisms, 72 h for leaves and 7 days for sediment.

3.5 PCB153 analyses

Water samples were filtered using 47 mm GF/F glass microfiber filters (Whatman®), and approximately 10 mL of filtered samples were extracted using a SPME procedure. Approximately 0.5 g of sediment samples and 0.2 g of leaves and organisms were extracted by microwave-assisted extraction (Milestone SRL, Sorisole, Italy) with 12 mL of DCM at 80 °C for 15 min. The extracts were filtered, concentrated under nitrogen flow at 40 °C and cleaned up on columns containing activated copper and acidified silica gel (40% H_2SO_4 w/w) previously conditioned with 5 mL of pentane; after extract loading, PCB153 was eluted with three times 5 mL of a pentane/DCM (90/10, v/v). The eluate was further concentrated, solvent exchanged to isooctane and taken to a final volume of 100 µL.

PCB153 was analyzed using 6890N Agilent Technologies gas chromatography (Massy, France) connected to an electron capture detector (ECD). Analytes were injected (1 µL) in pulsed splitless mode and separated with a J&W HP-5MS column (5% phenyl – 95% methylpolysiloxane; 60 m × 0.25 mm × 0.1 µm). Helium (vector gas, 1.3 mL min^{-1}) and nitrogen (auxiliary gas, 60.0 mL min^{-1}) were used. The injector temperature was set at 280 °C and the detector temperature at 300 °C. The kiln temperature program was: 90 °C for 2 min (80 °C for water samples), 15 °C min^{-1} to 178 °C (20 °C min^{-1} to 190°C), 2 °C min^{-1} to 230 °C (210 °C), 30 °C min^{-1} (15 °C min^{-1}) to 300 °C, 300 °C for 3.8 min (5 min). PCB153 was quantified relative to internal standard (PCB198, 9.6–11.8 ng).

3.6 Data analysis

Significant differences were considered according to the Wilcoxon test with an

α risk of 5%. Graphical representations were made with the statistical software R (version 3.3.3, R Core Team, 2017).

4. Link between model and data: Bayesian inference

4.1. Stochasticity

For both chironomids and gammarids, we assumed a gaussian distribution of the contaminant concentration in the organism:

$$C_{obs}(t) \sim N(C(t), 1/\sigma^2) \quad (8)$$

where N stands for the Normal law, $C_{obs}(t)$ corresponds to the contaminant concentration in the organism at time t measured during the experiments, C(t) is the contaminant concentration at time t predicted by the model and σ is the standard deviation of contaminant concentration in the organism.

For chironomid size, we also assumed a normal distribution:

$$L_{obs}(t) \sim N(L(t), 1/\sigma_L^2) \quad (9)$$

where $L_{obs}(t)$ is the length measured at time t during the experiments, L(t) is the length predicted by the von Bertalanffy model at time t, and σ_L is the standard deviation of organism size.

4.2. Graphical representation

Figure 1 represents the directed acyclic graphs (DAGs) for generic (a) chironomids (b) and gammarids (c), which symbolize the deterministic links between parameters and variables for the complete generic (Eq. (1)), chironomids (Eq. (4)) and gammarids (Eq. (7)) models and the stochastic links between the observed and predicted data.

4.3. Definition of priors

Before conducting an experimental study, a prior distribution is defined for each parameter according to information available from the literature and/or previous experiments. Depending on the source and the conditions that the information comes from, informative, semi-informative or noninformative prior distribution can be used. If a parameter was already estimated in previous studies or if previous data are available, a normal prior distribution can be used (with the mean value estimated and the precision with a standard deviation twice the value estimated to take into account the potential differences in experimental conditions). However, if no information is available but an order of magnitude is (positive only, for example), it is possible to apply a weakly informative prior, as a uniform distribution. If any information is available on the order of magnitude of a parameter, its prior can be defined on the decimal logarithm scale in order to give the same probability to lower or higher estimates. For variance parameters, we use a noninformative (0.001, 0.001) gamma prior, as is usually done (Lambert, 2005; Richards and Chaloupka, 2009).

For chironomids, priors were defined from the values given by Schuler et al. (2003) where Chironomus tentans were exposed to PCB153-spiked sediment. They found a mean k_s value of 0.054 g_{sed}. $g_{org}^{-1}.h^{-1}$ and a mean k_e value of 0.011 h^{-1}. We thus assumed a $\log_{10}$-normal (0.113, 5) prior for k_s (in g_{sed} g_{org}^{-1} d^{-1}) and a $\log_{10}$-normal (−0.578, 5) prior for k_e (in d^{-1}). For k_w, we assumed a $\log_{10}$-uniform (−5, 2) prior. We used a $\log_{10}$-normal (0.236, 2) prior for k_g (in d^1) according to Péry et al. (2002), corresponding to a growth rate of 1.72 d^{-1}. Priors for L_0 and L_{max} were assumed to follow $\log_{10}$-normal distributions and were set, respectively, at (0.778, 0.64; in days) corresponding to an initial size of 6 mm, and (1.056, 0.64; in days)

corresponding to a mean limit size of 11.4 mm (Péry, 2002). We assumed a non-informative (0.001, 0.001) gamma prior for the precision.

For gammarids, little information was available in the literature. As a consequence, we used a non-informative (−5, 2) $\log_{10}$-uniform prior for uptake and elimination rate constants (k_s, k_l, k_w, k_e). We also assumed a non-informative (0.001, 0.001) gamma prior for precision.

4.4. Implementation of the model – MCMC simulations

Model computation was performed with JAGS and R software (R Core Team, 2017; Plummer, 2016). The models were fitted to bioaccumulation data using Bayesian inference via Markov Chain Monte Carlo (MCMC) sampling. For each model tested, we started by running a short sampling (5,000 iterations after a burn-in phase of 10,000 iterations) using the Raftery and Lewis (1992) method to set the necessary thinning and number of iterations to reach an accurate estimation of each model parameter.

For chironomids, MCMC sampling was based on 150,000 iterations for three chains after discarding the first 5,000 iterations. Samples from every 40th iteration were stored to reduce autocorrelation. For gammarids, 26,000 iterations were done after discarding the first 10,000 iterations. Samples from every seventh iteration were stored to reduce autocorrelation in the sample.

To monitor the convergence of the chains, we used a visual inspection as well as the Gelman criterion (Gelman, 1995). The R codes are available in supporting information (Annex S2).

4.5. Posterior distributions and relevance of model predictions

From the joint posterior distribution, we can obtain the marginal posterior distribution for each parameter, which can be summarized by the mean or median

and standard deviation. The accuracy of model parameter estimation can be visualized by comparing prior and posterior distributions: a thin posterior distribution reflects that the data contributed enough information to precisely estimate parameters.

To check the relevance of model predictions, we represent, for each experiment, observed data superimposed on the model simulated with the median of the posterior distribution for each parameter and the 95% credibility band of the predicted data considering parameter uncertainties and stochasticity. To obtain the 95% credibility band, the predicted data were simulated with the model for each MCMC iteration and the stochastic model considered for observed data (Eqs. (8) and (9)).

4.6. Model comparisons

Several hypotheses were considered and tested for chironomids (Eqs. (4) and (6)) and for gammarids (Table S1) according to the experimental data available. To compare the different sub-models fitted, we analyzed the precision of each parameter estimation and the relevance of model predictions through the deviance information criterion (DIC), a Bayesian measurement that weighs the quality of model fit with its complexity. Sub-models with lower DIC values are expected to effectively balance between predictive capacity and complexity 358 (Spiegelhalter, 2002). For Bayesian inference, JAGS 4.2.0 for Windows and the rjags package for R software were used.

5. Results

5.1. Chironomus riparius

5.1.1. Sediment, water and chironomid contamination

The PCB153 concentrations in control and spiked sediment at day 0 were, respectively, 1.01 ± 0.25 and 83.3 ± 20.8 ng g_{sed}^{-1} versus 100 ng g_{sed}^{-1} (dw) expected. At the end of the experiment, the PCB153 concentration in spiked sediment was 89.6 ± 22.4 ng g_{sed}^{-1} (dw). No significant difference was observed for the concentrations in the sediment monitored during the experiment (p-value = 0.333).

At the beginning of the experiment, the PCB153 concentrations in water were 0.077 ± 0.009 ng L^{-1} and 0.230 ± 0.025 ng L^{-1} in the control and exposed aquaria, respectively, while they were 0.259 ± 0.028 ng L^{-1} and 3.85 ± 0.420 ng L^{-1}, respectively, at the end of the experiment.

PCB153 concentrations in *C. riparius* exposed to spiked sediment increased from 0.089 ± 0.031 to 142 ± 50.0 ng g_{org}^{-1} in 7 days.

5.1.2. Chironomid survival and growth

An acceptable survival rate was observed during the experiment for the test condition (88%) and for the control (76%). No adverse effect of spiked sediment on chironomid growth was observed (p-value = 0.248).

5.1.3. Parameter estimates

Two models were fitted to uptake data: Equation (4), which considers water and sediment exposure routes, and Equation (6), which considers sediment only. Similar marginal posterior distributions were obtained for each parameter with both models (Table S2, Fig. S2). Since the DICs for both models were similar (87.66 for

Eq. (4) and 87.71 for Eq. (6)), we selected the most parsimonious one (with the fewest parameters), Eq. (6), which accounts for exposure from sediment only.

The inference process quickly converged, and thin posterior distributions were obtained for each parameter, meaning that data contribute sufficient information to accurately estimate model parameters (Fig. S2). Median values and 95% credibility intervals for each parameter were estimated and are summarized in Table 1.

5.1.4. Model predictions

The model predictions fit the bioaccumulation and growth data well (Fig. 2). For bioaccumulation (Fig. 2a), two of the eight measurements were outside the 95% credibility band of the predicted data, and for growth 23 of the 80 measurements (Fig. 2b).

5.2. Gammarus fossarum

5.2.1. Leaf, sediment, water and gammarid contamination

PCB153 concentrations in the different matrices (water, leaves and sediment) are summarized in Table 2. There was no difference among PCB153 concentrations in sediment throughout the exposure phase (p-value = 0.939). Leaves added to spiked sediment without gammarids (E3 condition) were significantly less contaminated than leaves in spiked sediment with gammarids (E2 condition) (p-value = 0.042).

As shown in Figure 3, we obtained similar PCB153 concentrations in gammarids over time for the two conditions tested (E1 and E2). PCB153 concentrations in G. fossarum exposed to spiked leaves (E1) and sediment (E2) increased from an initial concentration of 0.320 ± 0.110 to 10.9 ± 3.80 and 11.2 ± 3.93 ng g_{org}^{-1}, respectively, at the end of uptake phase. When gammarids

were transferred into a clean media, the E1 and E2 PCB153 concentration in the organisms decreased to 4.71 ± 1.65 and 6.41 ± 2.24 ng g_{org}^{-1} respectively, at day 14.

5.2.2. Growth and survival

High survival rates were observed during the experiments. Survival after uptake and elimination periods were, respectively, 93 and 91% in control aquaria, 96 and 97% for E1 and 96 and 94% for E2.

5.2.3. Model parameters

Several models were fitted according to the exposure routes considered (Table S1). The models with similar lowest DIC values were those corresponding to hypotheses #3, 4, 6 and 7 in Table S1 (DIC values are reported in Table S2 in the SI). Similar model parameter estimations and marginal posterior distributions for each parameter were obtained for hypotheses #3, 4 and 6 (Table S2, Fig. S3). However, when the water exposure route was considered (hypothesis #7), marginal posterior distributions displayed two peaks for uptake rate constants k_l and k_s (Fig. S3), and the median values estimated for k_l and k_s considerably decreased (Table S2). We concluded accordingly that considering water as a contamination source did not contribute relevant information to accurately estimate model parameters. This conclusion is consistent with the fact that PCB153 concentrations measured in leaves and sediment were around 10,000 times higher than the concentration in water, in accordance with the hydrophobic character of this substance. Consequently, the model corresponding to hypothesis #6 was also eliminated. Between hypotheses #3 and 4, both considering contamination from leaves and sediment, we decided to keep the model corresponding to hypothesis #3. Indeed, this model is simpler than the one corresponding to hypothesis #4, in that it ignores that PCB153 transfers from sediment to leaves, while DICs are similar.

The inference process for the gammarid model corresponding to hypothesis #3 quickly converged, and thin posterior distributions were obtained for all parameters (Fig. S3). Median values and 95% credibility intervals for each parameter were estimated and are summarized in Table 1. The median estimation of k_s was around five times higher than that of k_l.

5.2.4. Model predictions

The model predictions fit well with uptake and elimination data (Fig. 3). For bioaccumulation in the E1 condition, two of the 11 measurements were out the 95% credibility band of the predicted data, and two of the 10 measures for the E2 condition.

6. Discussion

6.1. Robustness of Bayesian inference

We used Bayesian inference to simultaneously estimate all the model parameters together to enable a more accurate assessment of uncertainty around model predictions. One of the major advantages of the Bayesian analysis is the possibility of using data from different experiments simultaneously and even different types of data (e.g., uptake and elimination data, or bioaccumulation and growth data) to estimate parameters common to the different models. This was illustrated here by estimating the elimination rate from uptake and elimination data for gammarids (Fig. 3, Table 1), as well as by estimating the chironomid growth rate from bioaccumulation and growth data (Fig. 2, Table 1).

To evaluate the model performance, we used four criteria: (*i*) marginal posterior distributions for each model parameter, which generally provides more

information compared to prior distributions; (*ii*) goodness of fit to experimental data; (*iii*) DIC value; and (iv) the principle of parsimony.

For both chironomid and gammarid models, thin posterior distributions were obtained, meaning that data provided enough information to estimate parameters precisely (Fig. S2-a and S3-a). The simultaneous estimate of model parameters assesses the uncertainty on parameters considering the correlation between them. This is an improvement compared to the common approach in TK modeling, where model parameters are often estimated sequentially, without accounting for autocorrelation or confounding factors. The existing knowledge on parameter values derived from the literature can also be accounted for, through the definition of prior distributions, which is not the case in the common approaches. Moreover, in the common framework it is not easy to consider the overall uncertainty of predictions, as recommended in the context of environmental risk assessments (Lin, 2004).

For both species, model predictions fit well with experimental data. The measurements out the 95% credibility band of the predicted data for both species could indeed be due to the low number of data points and their proximity. For chironomids, Schuler et al. (2003) obtained a k_s mean value of 1.30 ± 0.014 $g_{sed}\ g_{org}^{-1}\ d^{-1}$, and a k_e mean value of 0.264 ± 0.006 d^{-1} for *Chironomus tentans* exposed to PCB153-spiked sediment. Here, we obtained lower values, especially for k_s. This could hypothetically be due to (i) the difference between the species tested, (ii) the difference in experimental conditions (shorter exposure duration and lower sediment concentration in Schuler et al. (2003)) and (iii) growth dilution, which was ignored in Schuler et al. (2003). The literature had demonstrated the importance of considering the growth rate for fourth-instar larvae of chironomids (Péry, 2002; Bertin, 2014). In the present study we estimated this model parameter

at k_g = 0.123 [0.029–0.356]d^{-1}; in the literature, the values vary between 0.355 and 1.72 (Péry, 2002; Bertin, 2014). Furthermore, Watts and Pascoe (2000) observed that fourth-instar larvae of *C. tentans* were much larger than those of *C. riparius*. To our knowledge, this study is the first reporting the bioaccumulation of PCB153 from several potential food sources for gammarids. Previous studies with gammarids examined PCB uptake from water exposure (Sanders and Chandler, 1972; Lynch and Johnson, 1982), whereas accumulation through diet remains unexplored (Pinkney, 1985).

Statistical model selection is commonly based on the parsimony principle, by which hypotheses should be kept as simple as possible. The idea is that by adding parameters to a model we could improve the fit to some degree, but at the same time parameter estimates worsen because there is less information available per parameter. In addition, the computations typically require more time by adding parameters. In this study, we applied this principle when similar DICs were obtained, so the models with the least parameters were selected.

6.2. Modeling and biological implications

One advantage of the generic model developed in this study is that it allows us to consider each uptake or elimination route as a module to add according to the availability of the data measured. The different models tested can then determine which routes are the most important in the accumulation of contaminant by the organism. Sidney et al. (2016) showed that for hydrophobic PCBs, particle ingestion was the dominant uptake route whatever species was tested (*C. riparius*, *Hyalella azteca, Lumbriculus variegatus* and *Sphaerium corneum*). This is consistent with our results for chironomids and gammarids, which confirmed that sediment is the major PCB contamination source.

The model considering the water and sediment exposure route (Eq. (4)) gave similar results to the model considering only the sediment exposure route (Eq. (6)) (i.e., similar marginal posterior distributions for k_s and k_e, predicted concentrations and DIC values). As a consequence, we concluded that not considering water exposure in the chironomid model contributes no more information and confirms that sediment is the major exposure route.

For gammarids, several hypotheses were tested, and the most parsimonious model was the one that did not account for the water exposure route (hypothesis #3). Furthermore, considering or not the transfer of PCB153 from sediment to leaves in E2 condition did not change the value and the precision of the parameters (hypothesis #4 and #3, Table S2), demonstrating that these data do not contribute additional valuable information. Indeed, previous experiments with perfluorinated alkyl compounds hypothesized that due to gammarid activity, suspended particles of contaminated sediment were deposited on the surface of leaves and were then ingested by gammarids (Bertin, 2016). These results confirm that sediment is the major contamination source.

6.3. Species comparison

Model parameter estimates are therefore consistent with the life traits of these two species: an uptake rate from sediment approximately ten times higher for chironomids (living in the sediment) than gammarids (living at the surface of sediment) and similar elimination rate constants (Fig S4).

6.4. Model limitations and implications for future use

Two limits could be highlighted in the use of the Bayesian approach in TK models: (*i*) the complexity of computation and (*ii*) the choice of prior distributions. Due to its complexity, the use of the Bayesian approach is limited in TK models.

However, for invertebrates, TK models could be considered simpler and its Bayesian computation also stem from the organism being considered a unique compartment. The majority of the problems encountered in the Bayesian approach have resulted from the choice of prior distributions. It is crucial to define prior distributions according to previous data similar to the experiment rather than to consider prior distributions selected in this paper as “generic.” Nevertheless, considering previous data (*a priori*) in the TK model could be useful to limit the cost and the number of experiments.

Further investigations will apply this Bayesian framework to more complex processes, including biotransformation or concentration dependency, where the frequentist approach could have limitations. Moreover, calculating prediction intervals has an advantage in that they can also be calculated around simulations with fluctuating input concentrations, even for scenarios that differ from the calibration experiments, and in that the correlation among parameters is accounted for (Ashauer et al., 2010). In particular for European regulations, this approach could make it possible to predict the concentration in the biota because the concentration in sediment is known, and uncertainties are thus accounted for.

7. Conclusions and perspectives

In this paper, we proposed a generic TK model in a Bayesian framework to estimate toxicokinetic parameters. This approach could be useful in order to calculate a more accurate estimation of prediction uncertainty. We demonstrated the ability of Bayesian analysis to simultaneously estimate model parameters considering several exposure routes from a PCB153 environmental exposure experiment under controlled conditions in two invertebrate species, *C. riparius* and

G. fossarum. From a methodological point of view, this paper illustrates that considering the correlation between parameters and different types of data is a real added value for TK modeling. We demonstrated the ability of a generic TK model to consider uptake and elimination routes as modules that can be added, depending to the availability of measured data. From an ecotoxicological point of view, we showed differences in PCB153 bioaccumulation between chironomids and gammarids, which could be explained by the different life traits of these two organisms. We also confirmed that sediment is the major route of exposure for invertebrates exposed to highly hydrophobic organic contaminants. Further investigations will apply this Bayesian framework to other benthic invertebrate species, and other organic contaminants, so as to address more complex processes, including biotransformation.

Acknowledgments

This study was supported by the French Agency for Biodiversity. The authors are thankful to Grand Parc Miribel-Jonage for providing the sediment used in experiments. The authors are also grateful to Marie-Laure Delignette-Muller (LBBE, UMR CNRS 5558, France) for Bayesian inference discussions as well as Myriam Arhror and Matthieu Masson (Irstea Lyon, France) for sediment characteristic analysis. The authors are also grateful to anonymous reviewers and to Ms. L. Northrup for editing the manuscript.

References

AFNOR. 2010. Determination of the Toxicity of Fresh Water Sediments to Chironomous Riparius - Part 1: Natural Sediments Water Quality.

Amiard, J. C., C. Amiard-Triquet, B. Berthet, and C. Metayer. 1987. Comparative study of the patterns of bioaccumulation of essential (Cu, Zn) and non-essential (Cd, Pb) trace metals in various estuarine and coastal organisms. Journal of Experimental Marine Biology and Ecology **106**:73-89.

Ashauer, R., A. Hintermeister, I. Caravatti, A. Kretschmann, and B. I. Escher. 2010. Toxicokinetic and toxicodynamic modeling explains carry-over toxicity from exposure to diazinon by slow organism recovery. Environmental Science and Technology **44**:3963-3971.

Bernillon, P. and F. Y. Bois. 2000. Statistical issues in toxicokinetic modeling: A Bayesian perspective. Environmental Health Perspectives **108**:883-893.

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

Bertin, D., P. Labadie, B. J. D. Ferrari, A. Sapin, J. Garric, O. Geffard, H. Budzinski, and M. Babut. 2016. Potential exposure routes and accumulation kinetics for poly- and perfluorinated alkyl compounds for a freshwater amphipod: Gammarus spp. (Crustacea). Chemosphere **155**:380-387.

Bois, F. Y. and C. Brochot. 2016. Modeling Pharmacokinetics. Pages 37-62 *in* E. Benfenati, editor. In Silico Methods for Predicting Drug Toxicity. Springer New York, New York, NY.

Carrasco-Navarro, V., I. Jæger, J. O. Honkanen, J. V. K. Kukkonen, J. Carroll, and L. Camus. 2015. Bioconcentration, biotransformation and elimination of pyrene in the arctic crustacean Gammarus setosus (Amphipoda) at two temperatures. Marine Environmental Research **110**:101-109.

Englert D, Zubrod JP, Pietz S, Stefani S, Krauss M, Schulz R, et al. 2017. Relative importance of dietary uptake and waterborne exposure for a leaf-shredding amphipod exposed to thiacloprid-contaminated leaves. Scientific Reports 7:16182.

EPA, E.P.A.U. 2006. Approaches for the Application of Physiologically Based Pharmacokinetic (PBPK) Models and Supporting Data in Risk Assessment (Final Report) (Washington, D.C.).

Forrow, D. M. and L. Maltby. 2000. Toward a mechanistic understanding of contaminantinduced changes in detritus processing in streams: Direct and indirect effects on detritivore feeding. Environmental Toxicology and Chemistry **19**:2100-2106.

Galic, N. and V. E. Forbes. 2017. Effects of temperature on the performance of a freshwater amphipod. Hydrobiologia **785**:35-46.

Gelman, A., J. Carlin, H. Stern, and D. Rubin. 1995. Bayesian Data Analysis, New York, NY, USA.

Grech, A., C. Brochot, J. L. Dorne, N. Quignot, F. Y. Bois, and R. Beaudouin. 2017. Toxicokinetic models and related tools in environmental risk assessment of chemicals. Science of the Total Environment **578**:1-15.

Gross-Sorokin, M. Y., E. P. M. Grist, M. Cooke, and M. Crane. 2003. Uptake and depuration of 4-nonylphenol by the benthic invertebrate Gammarus pulex: How important is feeding rate? Environmental Science and Technology **37**:2236-2241.

IPCS, I.P.o.C.S. 2010. Characterization and Application of physiologically Based Pharmacokinetic Models in Risk Assessment (Geneva, Switzerland).

Lambert, P. C., A. J. Sutton, P. R. Burton, K. R. Abrams, and D. R. Jones. 2005. How vague is vague? A simulation study of the impact of the use of vague prior distributions in MCMC using WinBUGS. Statistics in Medicine **24**:2401-2428.

Landrum, P. F., M. J. Lydy, and H. Lee. 1992. Toxicokinetics in aquatic systems: Model comparisons and use in hazard assessment. Environmental Toxicology and Chemistry **11**:1709-1725.

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

Leppänen, M. T. and J. V. K. Kukkonen. 1998. Relative importance of ingested sediment and pore water as bioaccumulation routes for pyrene to oligochaete (Lumbriculus variegatus, Muller). Environmental Science and Technology **32**:1503-1508.

Lin, H. I., D. W. Berzins, L. Myers, W. J. George, A. Abdelghani, and K. H. Watanabe. 2004. A Bayesian approach to parameter estimation for a crayfish (Procambarus spp.) bioaccumulation model. Environmental Toxicology and Chemistry **23**:2259-2266.

López-Doval, J. C., J. V. K. Kukkonen, P. Rodrigo, and I. Muñoz. 2012. Effects of indomethacin and propranolol on Chironomus riparius and Physella (Costatella) acuta. Ecotoxicology and Environmental Safety **78**:110-115.

Lydy, M. J., J. B. Belden, and M. A. Ternes. 1999. Effects of temperature on the toxicity of Mparathion, chlorpyrifos, and pentachlorobenzene to Chironomus tentans. Archives of Environmental Contamination and Toxicology **37**:542-547.

Lynch, T. and H. Johnson. 1982. Availability of a hexachlorobiphenyl isomer to benthic amphipods from experimentally contaminated natural sediments. American Society for Testing and Materials, STP 766, Philadelphia, PA.

MacKay, D. and A. Fraser. 2000. Bioaccumulation of persistent organic chemicals: Mechanisms and models. Environmental Pollution **110**:375-391.

Macneil, C., J. T. A. Dick, and R. W. Elwood. 1999. The dynamics of predation on Gammarus spp. (Crustacea: Amphipoda). Biological Reviews **74**:375-395.

Mamy, L., D. Patureau, E. Barriuso, C. Bedos, F. Bessac, X. Louchart, F. Martin-Laurent, C. Miege, and P. Benoit. 2015. Prediction of the fate of organic compounds in the environment

from their molecular properties: A review. Critical Reviews in Environmental Science and Technology **45**:1277-1377.

Miller, T. H., G. L. McEneff, L. C. Stott, S. F. Owen, N. R. Bury, and L. P. Barron. 2016. Assessing the Reliability of Uptake and Elimination Kinetics Modelling Approaches for Estimating Bioconcentration Factors in the Freshwater Invertebrate, Gammarus Pulex. Science of the Total Environment **547**:396-404.

Miller, T. H., N. R. Bury, S. F. Owen, and L. P. Barron. 2017. Uptake, biotransformation and elimination of selected pharmaceuticals in a freshwater invertebrate measured using liquid chromatography tandem mass spectrometry. Chemosphere **183**:389-400.

OECD. 2004. Water Chironomid Toxicity Test Using Spiked Sediment. In: OECD Guidelines for the Testing of Chemicals. 1-21.

OECD. 2008. Test No. 315: Bioaccumulation in Sediment-dwelling Benthic Oligochaetes. In: OECD Guidelines for the Testing of Chemicals. Section 3. 1-33.

Pavan, M., A.P. Worth, and T.I. Netzeva. 2006. Review of QSAR Models for Bioconcentration. European Commission (Joint Research Centre).

Péry, A. R. R., R. Mons, P. Flammarion, L. Lagadic, and J. Garric. 2002. A modeling approach to link food availability, growth, emergence, and reproduction for the midge Chironomus riparius. Environmental Toxicology and Chemistry **21**:2507-2513.

Pinkney, A. E., G. V. Poje, R. M. Sansur, C. C. Lee, and J. M. O'Connor. 1985. Uptake and Retention of14C-Aroclor® 1254 in the Amphipod, Gammarus tigrinus, Fed Contaminated Fungus, Fusarium oxysporum. Archives of Environmental Contamination and Toxicology **14**:59-64.

Plummer, M. 2016. rjags: Bayesian Graphical Models using MCMC.

R Core Team. 2017. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria.

Raftery, A. E. and S. M. Lewis. 1992. [Practical Markov Chain Monte Carlo]: Comment: One Long Run with Diagnostics: Implementation Strategies for Markov Chain Monte Carlo. Statist. Sci. **7**:493-497.

Richards, R. G. and M. Chaloupka. 2009. Temperature-dependent bioaccumulation of copper in an estuarine oyster. Science of the Total Environment **407**:5901-5906.

Rösch, A., M. Gottardi, C. Vignet, N. Cedergreen, and J. Hollender. 2017. Mechanistic Understanding of the Synergistic Potential of Azole Fungicides in the Aquatic Invertebrate Gammarus pulex. Environmental Science and Technology **51**:1278412795.

Sanders, H. O. and J. H. Chandler. 1972. Biological magnification of a polychlorinated biphenyl (Aroclor® 1254) from water by aquatic invertebrates. Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology **7**:257-263.

Schuler, L. J., M. Wheeler, A. J. Bailer, and M. J. Lydy. 2003. Toxicokinetics of sedimentsorbed benzo[a]pyrene and hexachlorobiphenyl using the freshwater invertebrates Hyalella azteca, Chironomus tentans, and Lumbriculus variegatus. Environmental Toxicology and Chemistry **22**:439-449.

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

Spiegelhalter, D. J., N. G. Best, B. P. Carlin, and A. V. D. Linde. 2002. Bayesian measures of model complexity and fit. Journal of the Royal Statistical Society: Series B (Statistical Methodology) **64**:583-639.

von Bertalanffy, L. 1938. A quantitative theory of organic growth (inquires on growth laws. II). Human Biology **10**:181-213.

Watts, M. M. and D. Pascoe. 2000. A comparative study of Chironomus riparius meigen and Chironomus tentans fabricius (Diptera:Chironomidae) in aquatic toxicity tests. Archives of Environmental Contamination and Toxicology 39:299-306.OCDE. *Test No. 315: Bioaccumulation in Sediment-Dwelling Benthic Oligochaetes*. 2008. doi:doi:https://doi.org/10.1787/9789264067516-en.

Table 1. Summary of the toxicokinetic model parameters: priors, median and percentile values determining the 95% credibility interval.

Organisms	Parameters	Priors	Median	Percentiles	
				2.5%	97.5%
Chironomus riparius	k_s	Log_{10}-normal (0.113, 5)	**0.473**	0.359	0.804
	k_e	Log_{10}-normal (−0.578, 5)	**0.121**	0.041	0.392
	k_g	Log_{10}-normal (0.236, 2)	**0.123**	0.029	0.356
	L_0	Log_{10}-normal (0.778, 0.64)	**6.75**	4.85	8.71
	L_{max}	Log_{10}-normal (1.056, 0.64)	**18.5**	13.3	40.7
	σ	Gamma (0.001, 0.001)	**11.8**	6.53	27.5
	σ_L	Gamma (0.001, 0.001)	**1.12**	0.672	2.18
Gammarus fossarum	k_l k_s	Log_{10}-unif (−5, 2)	**0.013**	0.010	0.016
		Log_{10}-unif (−5, 2)	**0.071**	0.057	0.087
	k_e	Log_{10}-unif (−5, 2)	**0.178**	0.131	0.229
	σ	Gamma (0.001, 0.001)	**1.48**	1.11	2.12

Table 2. Summary of PCB153 concentrations in water, leaves and sediment according to gammarid experiments (control, E1, E2 and E3). Standard deviations (sd) are calculated on analytical replicates (n=2 when sd are given, except for leaves in E3 condition at day 7 and for sediment in E2 condition at day 0 where n=3).

	Water (ng L^{-1})			Leaves (ng $g_{leaves\text{-}1}$)			Sediment (ng g_{sed}^{-1})		
Days	**0**	**7**	**14**	**0**	**7**	**14**	**0**	**7**	**14**
Control	0.10	-	0.10	1.46 ± 0.18	1.13	1.09	0.29 ± 0.22	-	0.21 ± 0.11
E1[a]	0.30	0.10	0.10	260 ± 6.07	245 ± 30.1	3.86	-	-	-
E2[b]	0.10	0.20	0.00	1.46 ± 0.18	44.9 ± 12.7	1.72 ± 0.01	56.6 ± 8.68	30.0 ± 3.12	0.23 ± 0.12
E3[c]	0.10	0.80	-	1.46 ± 0.18	5.52 ± 0.87	-	56.6 ± 8.68	45.1 ± 1.44	-

[a] spiked leaves; [b] spiked sediment; [c] spiked sediment without gammarids

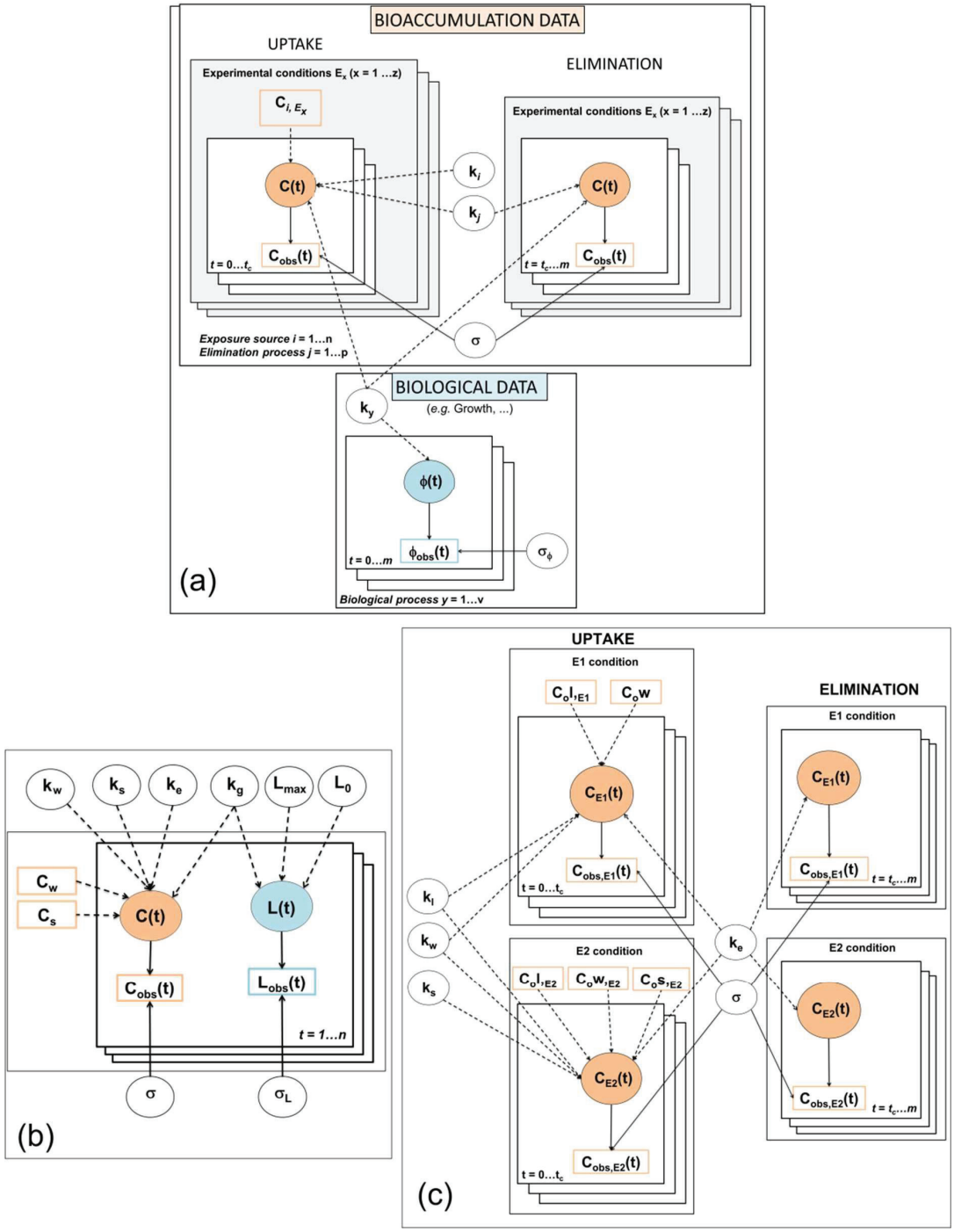


Figure 1. Directed acyclic graph (DAG) for (a) generic (b) chironomid and (c) gammarid models. Observed variables, such as the contaminant concentration in organisms, sediment and leaves, are represented by rectangle nodes. Model parameters and variables are represented by circular nodes. Dotted arrows represent deterministic links (Eqs. (1), (4) and (7)), while solid arrows represent stochastic links between predicted and observed data.

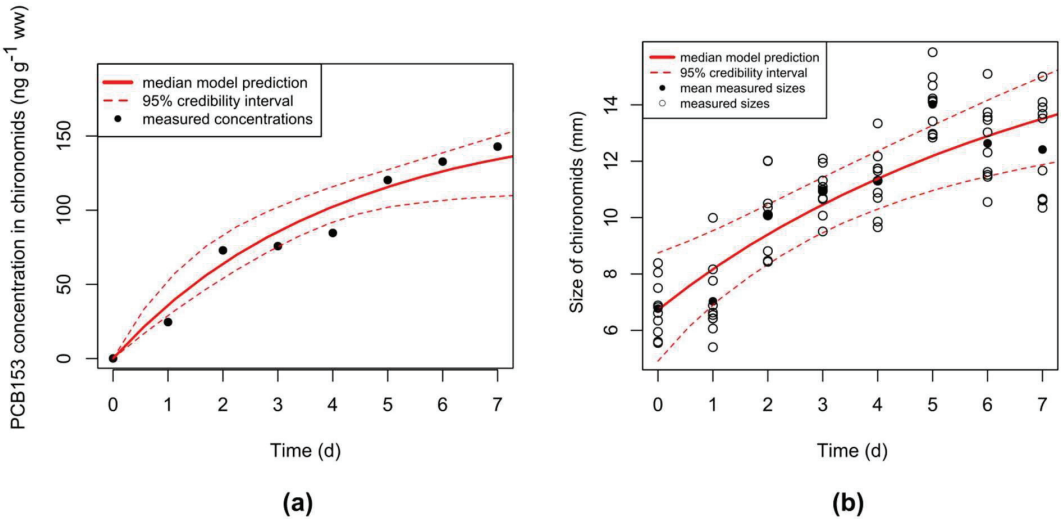


Figure 2. Observed data (dots) and model predictions (solid and dashed lines) for (a) PCB153 concentrations (ng g_{org}^{-1}) in chironomids (Eq. (6)) and (b) chironomid size (mm) (Eq. (5)) from days 0 to 7. The observed data are single values (n=1). On Figure 2-b, mean sizes at each day are symbolized by filled dots.

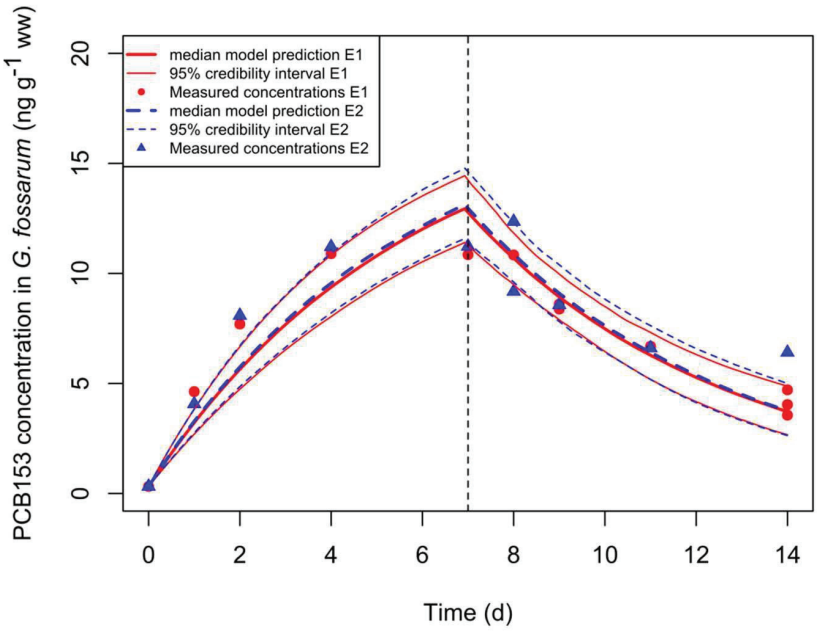


Figure 3. Measured (dots and triangles) and predicted (solid and dashed curves, from Eqs. (12) and (14)) PCB153 concentrations (ng g_{org}^{-1}) in gammarids during the uptake (days 0–7) and the elimination (days 7–14) phases (separated with the black dashed vertical line). The measured data are single values (n=1).

3.3 MATÉRIEL SUPPLÉMENTAIRE

Supporting information

A Bayesian framework for estimating parameters of a generic toxicokinetic model for the bioaccumulation of organic chemicals by benthic invertebrates: proof of concept with PCB 153 and two freshwater species.

Aude Ratier[a], Christelle Lopes[b,*], Pierre Labadie[c], Hélène Budzinski[c], Nicolas Delorme[a], Hervé Quéau[a], Laurent Peluhet[c], Olivier Geffard[a], Marc Babut[a].

[a] Irstea, UR RiverLy, centre de Lyon-Villeurbanne, 5 Avenue de la Doua, CS20244, 69625 Villeurbanne Cedex, France.
[b] Univ Lyon, Université Lyon 1, CNRS, Laboratoire de Biométrie et Biologie Evolutive UMR5558, F-69622 Villeurbanne, France.
[c] Université Bordeaux 1, Environnements et Paléoenvironnements Océaniques et Continentaux (EPOC), UMR 5805 CNRS, Laboratoire de Physico- et Toxico-Chimie de l'environnement (LPTC), 351 cours de la Libération, 33405 Talence, France.

*: Corresponding author: christelle.lopes@univ-lyon1.fr

Table S1. Summary of the different sub-models fitted according to the hypotheses tested on gammarid exposure pathways (E1: spiked leaf condition; E2: spiked sediment condition).

Hypothesis		Model according to available data
1. 1- If only water exposure route is considered	E1: k_s=0, k_l =0 E2: k_s=0, k_l=0	$\begin{cases} \frac{dC_{E1}(t)}{dt} = k_w \times C_{w,E1} - k_e \times C_{E1}(t) & (10) \\ \frac{dC_{E2}(t)}{dt} = k_w \times C_{w,E2} - k_e \times C_{E2}(t) & (11) \end{cases}$
2. If only leaf exposure route is considered	E1: k_s=0, k_w =0 E2: k_s=0, k_w=0	$\begin{cases} \frac{dC_{E1}(t)}{dt} = k_l \times C_{l,E1} - k_e \times C_{E1}(t) & (12) \\ \frac{dC_{E2}(t)}{dt} = k_l \times C_{l,E2} - k_e \times C_{E2}(t) & (13) \end{cases}$
3. If leaf (E1) or sediment (E2) exposure routes are considered	E1: k_s=0, k_w =0 E2: k_l=0, k_w=0	$\begin{cases} \frac{dC_{E1}(t)}{dt} = k_l \times C_{l,E1} - k_e \times C_{E1}(t) & (12) \\ \frac{dC_{E2}(t)}{dt} = k_s \times C_s - k_e \times C_{E2}(t) & (14) \end{cases}$
4. If leaf (E1) or sediment and leaf (E2) exposure routes are considered	E1: k_s=0, k_w =0 E2: k_w=0	$\begin{cases} \frac{dC_{E1}(t)}{dt} = k_l \times C_{l,E1} - k_e \times C_{E1}(t) & (12) \\ \frac{dC_{E2}(t)}{dt} = k_s \times C_s + k_l \times C_{l,E2} - k_e \times C_{E2}(t) & (15) \end{cases}$
5. If water and leaf exposure routes are considered	E1: k_s=0 E2: k_s=0	$\begin{cases} \frac{dC_{E1}(t)}{dt} = k_w \times C_{w,E1} + k_l \times C_{l,E1} - k_e \times C_{E1}(t) & (16) \\ \frac{dC_{E2}(t)}{dt} = k_w \times C_{w,E2} + k_l \times C_{l,E2} - k_e \times C_{E2}(t) & (17) \end{cases}$
6. If water and leaf (E1) or water and sediment (E2) exposure routes are considered	E1: k_s=0 E2: k_l=0	$\begin{cases} \frac{dC_{E1}(t)}{dt} = k_w \times C_{w,E1} + k_l \times C_{l,E1} - k_e \times C_{E1}(t) & (16) \\ \frac{dC_{E2}(t)}{dt} = k_w \times C_{w,E2} + k_s \times C_s - k_e \times C_{E2}(t) & (18) \end{cases}$
7. If water and leaf (E1) or water, leaf and sediment (E2) exposure routes are considered	E1: k_s=0	$\begin{cases} \frac{dC_{E1}(t)}{dt} = k_w \times C_{w,E1} + k_l \times C_{l,E1} - k_e \times C_{E1}(t) & (16) \\ \frac{dC_{E2}(t)}{dt} = k_w \times C_{w,E2} + k_s \times C_s + k_l \times C_{l,E2} - k_e \times C_{E2}(t) & (7) \end{cases}$

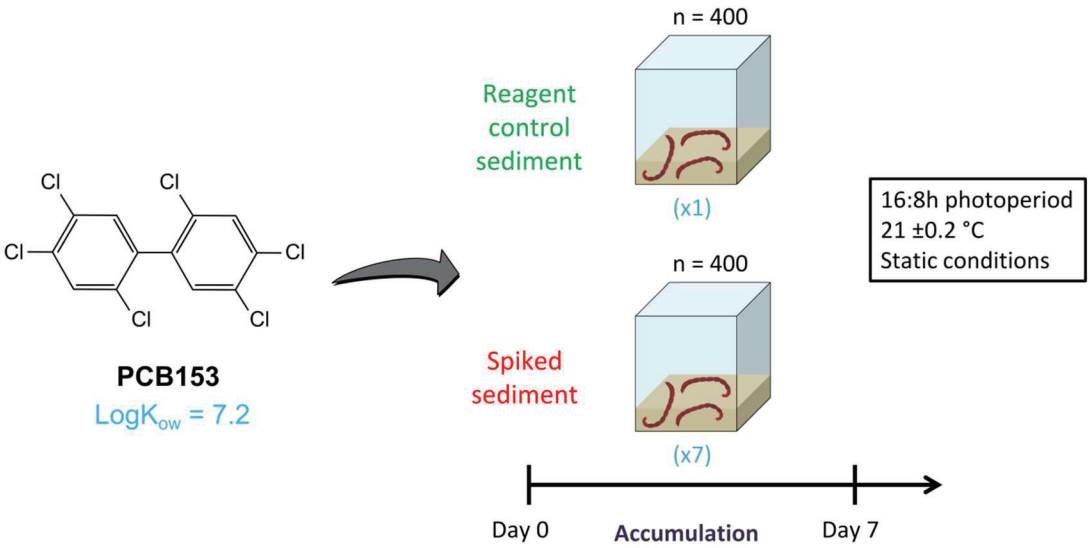


Figure S1. Experimental design for chironomids: accumulation test with reagent control and spiked sediment.

Table S2. Groundwater characteristics

Parameter	Unit	Value
HCO_3^-	mg/L	224
SiO_2	mg/L	8,02
COT	mg/L	1,33
Cl^-	mg/L	15,1
SO_4^{2-}	mg/L	38,0
Na^+	mg/L	10,7
K^+	mg/L	2,26
Mg^{2+}	mg/L	7,63
Ca^{2+}	mg/L	79,0
NH_4^+	mg/L	< 0,02
NO_2^-	mg/L	< 0,05
NO_3^-	mg/L	9,56
PO_4^{3-}	mg/L	< 0,10
pH	-	8.2
Conductivity	µS	447

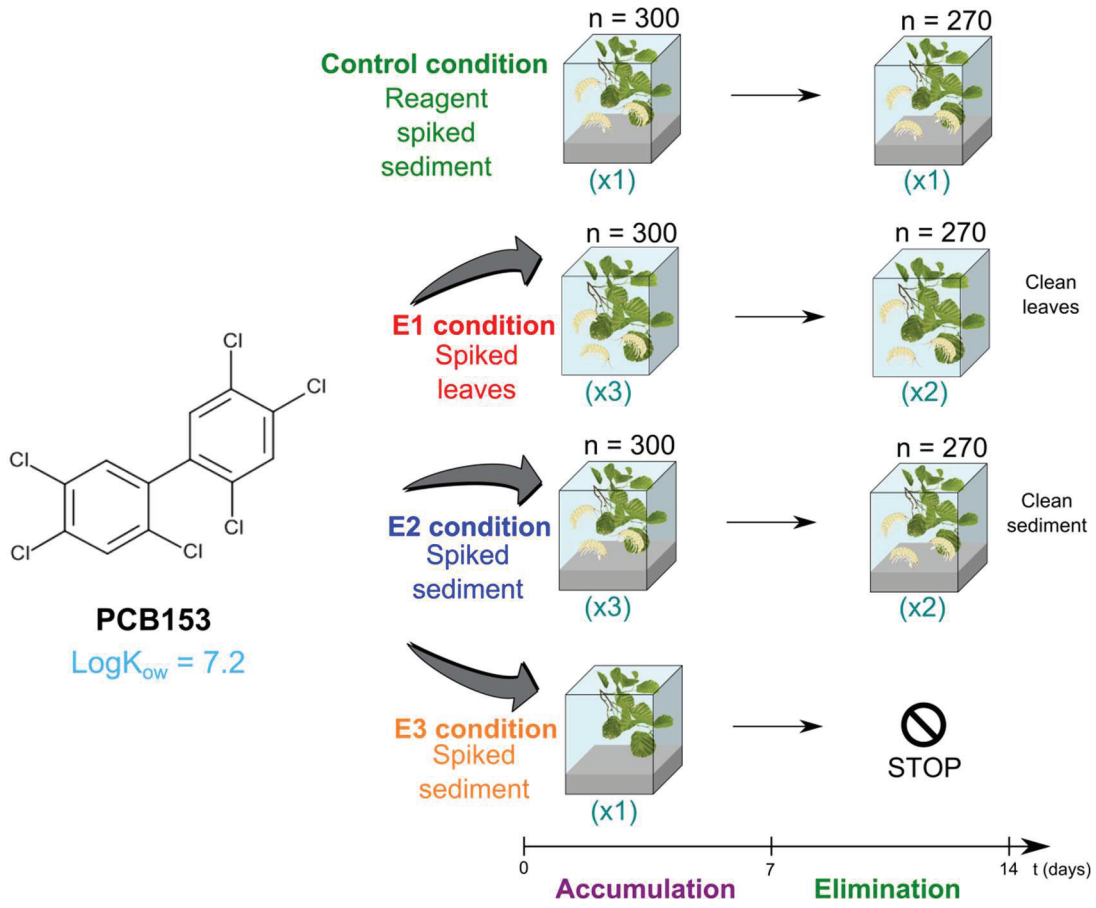


Figure S2. Experimental design for gammarids: accumulation and depuration test spiked leaves (E1), spiked sediment (E2) and accumulation test with spiked sediment without gammarids (E3).

Annex 1 – R Codes of the two models (R software (version 3.3.3 2017-03-06))
R Codes and corresponding .csv data files are available on DOI 10.5281/zenodo.2633012.

Table S3. Parameter estimated for chironomids depending on the model tested.

Parameter	Model Eq.(4) DIC = 87.66			Model Eq.(6) DIC = 87.71		
	50%	2.5%	97.5%	**50%**	2.5%	97.5%
k_s	**0.465**	0.031	0.785	**0.473**	0.359	0.804
k_w	**0.008**	0.00001	5.42	**-**	-	-
k_e	**0.124**	0.042	0.344	**0.121**	0.041	0.392
k_g	**0.124**	0.030	0.366	**0.123**	0.029	0.356
L_0	**6.74**	4.860	8.74	**6.75**	4.85	8.71
L_{max}	**18.4**	13.23	40.8	**18.5**	13.3	40.7
σ	**12.0**	6.53	27.5	**11.8**	6.53	27.5
σ_L	**1.11**	0.672	2.17	**1.12**	0.672	2.18

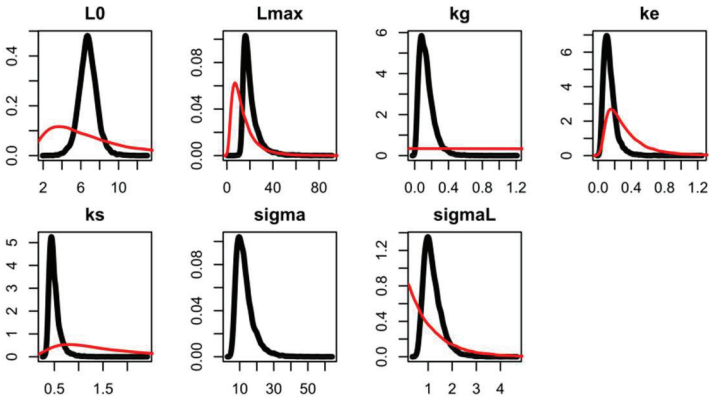


Figure S3. Prior (red curve) and posterior (black curve) marginal distributions of model parameters for chironomids (Eq. 6).

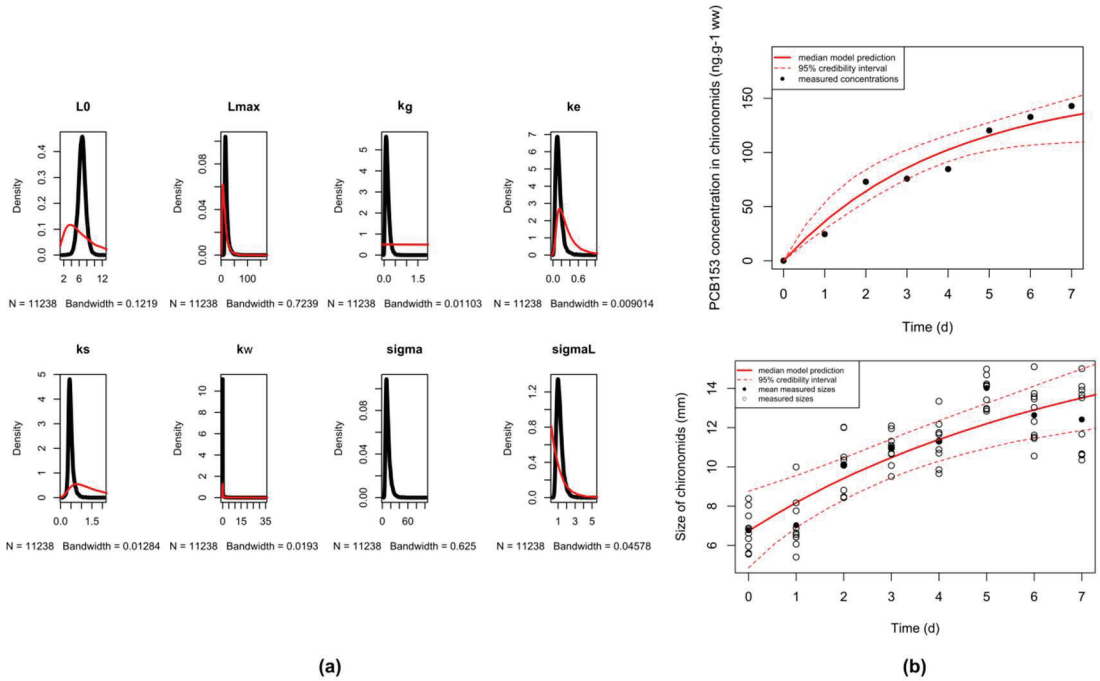


Figure S4. For the chironomid model (Eq. (4)), (a) prior (red curve) and posterior (black curve) marginal distributions, (b) measured (points) and predicted (solid and dashed curves) (top) PCB 153 concentrations (ng g^{-1} ww) in chironomids during the accumulation phase from day 0 to 7, and length of chironomids (mm) (bottom).

Table S4. Parameter estimated for gammarids depending on the model tested.

Parameter	Model Eq. (10,11) DIC = 91.6			Model Eq. (12,13) DIC = 135			Model Eq. (12,14) DIC = 80.2			Model Eq. (12,15) DIC = 80.2		
	50%	2.5%	97.5%	**50%**	2.5%	97.5%	**50%**	2.5%	97.5%	**50%**	2.5%	97.5%
k_l	**-**	-	-	**0.011**	0.003	0.030	**0.013**	0.010	0.016	**0.013**	0.010	0.016
k_w	**18.6**	14.0	23.7	**-**	-	-	**-**	-	-	**-**	-	-
k_s	**-**	-	-	**-**	-	-	**0.071**	0.057	0.087	**0.058**	0.046	0.073
k_e	**0.187**	0.127	0.255	**0.128**	0.00002	0.449	**0.178**	0.131	0.229	**0.178**	0.132	0.231
σ	**1.92**	1.44	2.75	**5.20**	3.86	7.52	**1.48**	1.11	2.12	**1.49**	1.11	2.13

Parameter	Model Eq. (16,17) DIC = 92.2			Model Eq. (16,18) DIC = 80.4			Model Eq. (16,7) DIC = 80.4		
	50%	2.5%	97.5%	**50%**	2.5%	97.5%	**50%**	2.5%	97.5%
k_l	**0.00007**	0.00001	0.001	**0.001**	0.00001	0.015	**0.003**	0.00001	0.015
k_w	**18.5**	13.9	23.9	**13.3**	0.00003	19.2	**12.1**	0.00002	19.1
k_s	**-**	-	-	**0.027**	0.008	0.081	**0.029**	0.008	0.068
k_e	**0.188**	0.128	0.258	**0.179**	0.133	0.232	**0.179**	0.132	0.231
σ	**1.95**	1.46	2.79	**1.49**	1.11	2.14	**1.49**	1.11	2.16

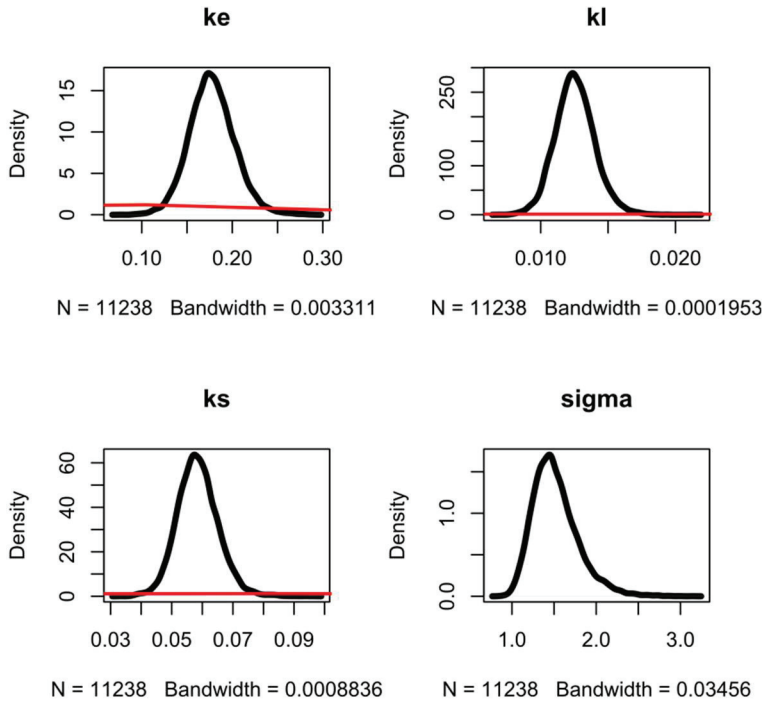


Figure S5. Prior (red curve) and posterior (black curve) marginal distributions of model parameter for gammarids (Eq. (12,14)).

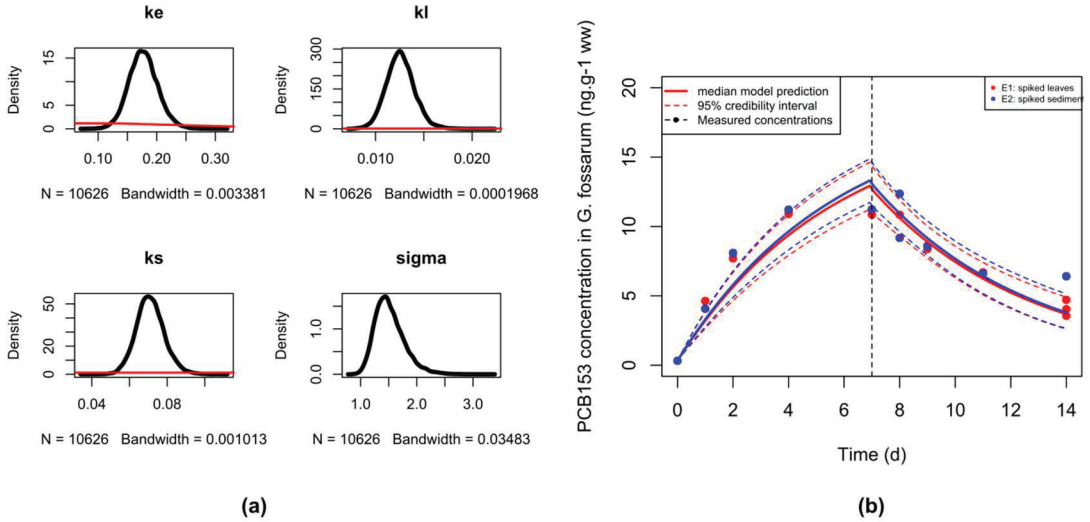


Figure S6. For the gammarid model (Eq. (12,15)), (a) prior (red curve) and posterior (black curve) marginal distributions, (b) measured (points) and predicted (solid and dashed curves) PCB 153 concentrations (ng g^{-1} ww) in gammarids during the accumulation phase from day 0 to 7 (to the left of the vertical black dashed line) and the depuration phase from day 7 to day 14 (to the right of the vertical black dashed line).

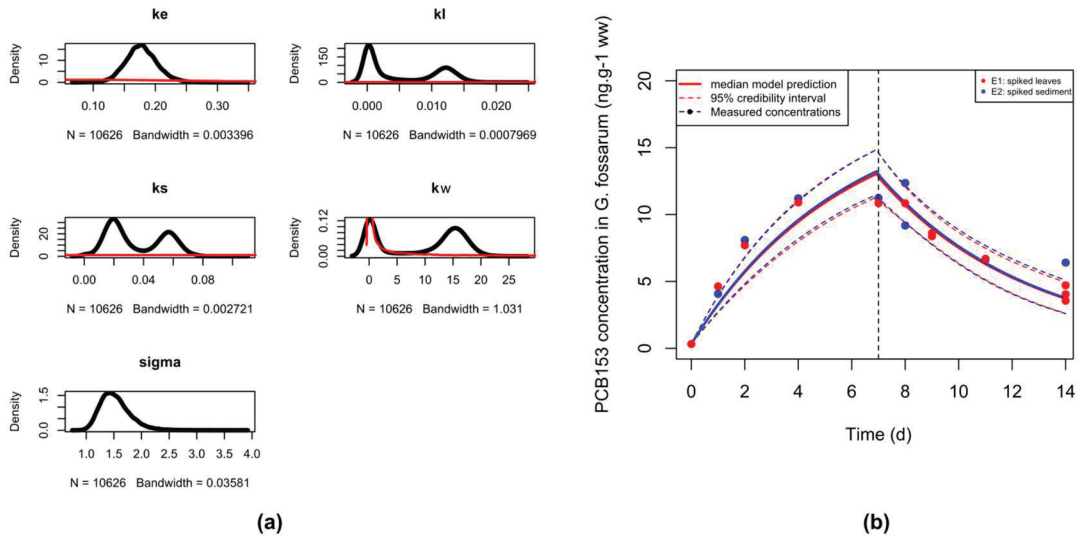


Figure S7. For the gammarid model Eq. (16,18) (a) prior (red curve) and posterior (black curve) marginal distributions, (b) measured (points) and predicted (solid and dashed curves) PCB 153 concentrations (ng g^{-1} ww) in gammarids during the accumulation phase from day 0 to 7 (to the left of the vertical black dashed line) and the depuration phase from day 7 to day 14 (to the right of the vertical black dashed line).

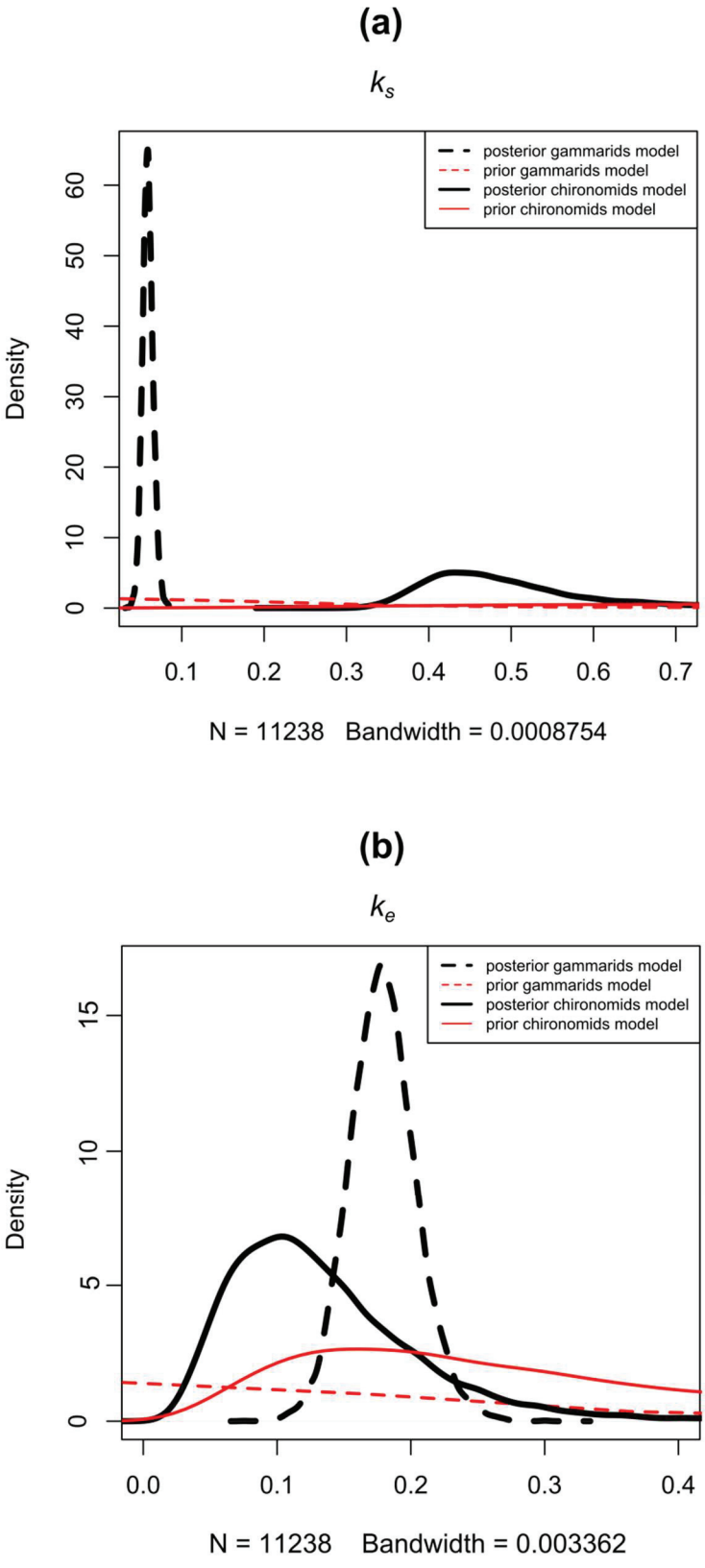


Figure S8. Superposition of posterior (black curves) and prior (red curves) distributions for gammarid (dotted curves) and chironomid models (solid curves) for (a) the uptake rate constant from sediment and (b) the elimination rate constant.

3.4 NOTE 1 : *RADIX AURICULRIA* EXPOSE AU PCB 153

3.4.1 Introduction

Une troisième espèce d'invertébrés a été exposée au PCB 153, *Radix auricularia*. Il s'agit d'un mollusque gastéropode pulmoné ; il est herbivore et détritivore, essentiellement exposé via le biofilm en surface des végétaux et des sédiments. L'objectif ici est de vérifier l'applicabilité du cadre d'inférence du modèle générique à cette espèce exposée au même contaminant (PCB 153) que les deux espèces précédentes.

3.4.2 Matériels et méthodes

Design expérimental

Le design expérimental complet a été décrit précédemment (Chapitre 2) incluant le dopage du sédiment (section 2.2.1), le prélèvement des organismes (section 2.3.3), l'exposition des radix au PCB 153 (section 2.4) ainsi que les dosages chimiques (section 2.6). La figure B.1. présente le schéma expérimental (Annexe B).

Brièvement, les radix ont été exposés à du sédiment contaminé en PCB 153 à une concentration nominale de 100 ng g^{-1} ps pendant 9 jours. Par la suite, ils ont été transférés en milieu non contaminé pendant 9 autres jours. Le test a été réalisé à 13 °C avec une photopériode de 16 h : 8 h sous un léger bullage. Les organismes n'ont pas été nourris puisque l'on suppose qu'ils se nourrissent du biofilm qui se forme sur les parois des aquariums ou en surface du sédiment. Des échantillons d'eau, de sédiment et d'organisme (coquille et corps séparés) ont été prélevés aux jours 0, 1, 2, 4, 7, 9, 10, 11, 14, 16 et 18. La survie des organismes a été mesurée à la fin de la période d'exposition et à la fin de la période de dépuration. Lors des prélèvements, les radix ont été décoquillés vivants avant d'être stockés à - 20°C.

Modélisation et inférence

Pour cette espèce, le sédiment a été considéré comme la seule voie d'exposition (ingestion), alors que l'élimination a lieu uniquement par excrétion. En effet, compte tenu du caractère hydrophobe du PCB 153, l'exposition par l'eau n'est pas pertinente comme l'ont montré les résultats de l'article 1 (section 3.2 de ce chapitre) pour les deux autres espèces d'invertébrés étudiées. Par ailleurs, la croissance n'a pas été considérée puisque le poids de l'organisme n'a pas varié durant les 18 jours de l'expérimentation (0,36 ± 0,03 g_{org} pf).

Les équations (12) et (13) peuvent donc être réécrites comme suit (Eqs. (23) et (24)) selon les hypothèses considérées :

$$\begin{cases} \frac{dC(t)}{dt} = (k_s \times C_s) - (k_e \times C(t)) & \text{pour } 0 < t < t_c \quad (23) \\ \frac{dC(t)}{dt} = -\left(k_e \times C(t)\right) & \text{pour } t > t_c \quad (24) \end{cases}$$

Aucune information n'étant disponible pour cette espèce, des distributions *a priori* uniformes ont été définies : $\log_{10}(k_s)$ ~U(-5,2) et $\log_{10}(k_e)$ ~U(-20,2). La concentration observée en PCB 153 dans le radix au temps *t* pendant l'expérience suit une loi normale (Eq. (20)).

3.4.3 Résultats et discussion

Taux de survie

Les taux de survie dans les aquariums témoin et exposés étaient de 91 % pendant la phase d'exposition au sédiment enrichi, mais seulement de 75 % et 62 % respectivement pendant la phase de dépuration, probablement en raison d'un problème de qualité de l'eau de réalimentation des aquariums (coupure d'eau de 24 heures).

Niveaux de contamination

Dans les échantillons d'eau, la concentration en PCB 153 sont en dessous de la limite de quantification (< 0,19 ng L^{-1}). La concentration dans le sédiment est en moyenne de 52,3 ± 3,7 ng g^{-1} ps, qui reste stable durant la phase d'exposition. Dans le sédiment témoin, la concentration de PCB 153 témoigne du bruit de fond anthropique (0,437 ± 0,122 ng g^{-1} ps). Par ailleurs, les mesures faites dans le sédiment des aquariums test en phase de dépuration sont peu variables et restent faibles (0,650 ± 0,185 ng g^{-1} ps) par rapport aux concentrations d'exposition.

Les teneurs en PCB 153 dans les coquilles de radix des aquariums test à J0 et J18 sont respectivement de 0,31 et 0,38 ng g^{-1} ps, et elles sont légèrement plus élevées dans les coquilles des radix exposés à J9 (2,06 ng g^{-1} ps). Les radix témoin présentent une concentration faible dans les tissus mous : < LoQ, 0,40 ng g^{-1} pf et 0,82 ng g^{-1} pf à J0, J9 et J18 respectivement. Pour les radix exposés, les concentrations augmentent d'une concentration initiale < LoQ à 21,8 ng g^{-1} pf à la fin de la phase d'exposition puis se stabilisent entre 20 et 25 ng g^{-1} pf jusqu'à la fin de la période de dépuration à J18 (**Figure 42**). L'arrêt de l'exposition des radix au sédiment enrichi ne se traduit donc pas par une diminution des concentrations tissulaires.

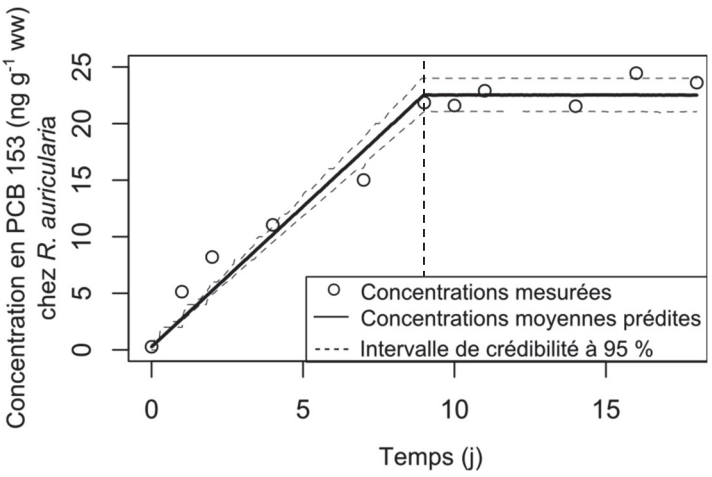


Figure 42. Cinétiques d'accumulation et d'élimination du PCB 153 chez le radix. Le trait vertical pointillé délimite la phase d'exposition de la phase de dépuration. Le trait plein représente les concentrations moyennes prédites dans le radix et les traits pointillés l'intervalle de crédibilité à 95 % des prédictions.

Paramètres toxico-cinétiques et prédictions

Deux sous-modèles ont été testés suite aux niveaux de concentrations mesurés dans les organismes, considérant ($k_e \neq 0$) ou non ($k_e = 0$) l'élimination du PCB 153 (Eqs.(23) et (24) avec $k_e \neq 0$ ou $k_e = 0$). Le processus d'inférence a convergé rapidement pour les deux sous-modèles. L'indice de Gelman fut égal à 1, ce qui démontre une variance inter-chaîne MCMC négligeable par rapport à la variance intra-chaîne. Les distributions *a posteriori* des paramètres montrent des distributions relativement resserrées par rapport aux distributions *a priori* (excepté pour le sous-modèle où $k_e \neq 0$), indiquant que les données apportent suffisamment d'information pour obtenir des estimations précises.

Les DIC obtenus sont identiques pour les deux sous-modèles testés (DIC = 44). Comme les résultats obtenus sont similaires pour les deux sous-modèles (distributions marginales pour chacun des paramètres, concentrations prédites et valeurs de DIC), le sous-modèle le plus parcimonieux (avec le moins de paramètres) est sélectionné, donc celui qui considère une élimination nulle du PCB 153 ($k_e = 0$). Le taux d'accumulation estimé à partir du sédiment chez le radix ($k_{s,radix} = 0{,}047$ [0,044-0,050] j^{-1}) est de l'ordre de grandeur de celui du gammare ($k_{s,gammare} = 0{,}071$ [0,057-0,087] j^{-1}), bien que plus faible. Cela s'explique par le mode de vie analogue de celui du gammare, qui consiste en l'ingestion de biofilm. En revanche, alors que les taux d'accumulation sont similaires entre ces deux espèces, le taux d'élimination est fixé comme nul pour le radix. Cela pourrait s'expliquer par (*i*) un stockage

dans un type spécifique de lipides qui diffère du gammare, (*ii*) une inhibition de certaines fonctions biologiques responsables de l'excrétion ou de la dégradation des contaminants, et (*iii*) un processus de détoxification très lent à faible dose d'exposition, impliquant un mécanisme de concentration-dépendance. Une étude (Elangovan *et al.* 1997) a montré que *Lymnaea stagnalis* accumule et retient l'aluminium dans des quantités plus importantes au niveau des glandes digestives que pour les tissus mous.

En conséquence, l'absence d'élimination du PCB 153 chez le radix impliquerait une bioaccumulation de ce contaminant plus importante chez ses prédateurs.

L'ajustement du modèle aux données observées est présenté **Figure 42**. Un total de 7 points expérimentaux sur les 11 mesurés se situe dans l'intervalle de crédibilité à 95 %, montrant un ajustement correct du modèle aux données mesurées.

3.4.4 Conclusion

Le cadre d'inférence et de modélisation développé dans cette étude s'applique tout aussi bien au gastéropode d'eau douce *R. auricularia* qu'à l'insecte *C. riparius* et au crustacé amphipode *G. fossarum*. Ce cadre peut donc être considéré comme générique, conformément à l'objectif assigné.

Pour résumer, l'approche utilisée dans ce chapitre permet :

- d'estimer simultanément des paramètres toxico-cinétiques ;
- de prendre en compte de différents types de données, comme par exemple les données de croissance et de bioaccumulation ;
- d'obtenir la distribution *a posteriori* jointe, qui prend en compte la corrélation des paramètres du modèle ;
- d'obtenir les incertitudes sur les paramètres et les prédictions du modèle.

Chapitre 4 : Prise en compte de la biotransformation dans le cadre de modélisation et d'inférence développé

4.1 OBJECTIF

Le cadre de modélisation et d'inférence développé dans le chapitre précédent a démontré sa performance, en particulier pour les substances fortement hydrophobes, non métabolisables. Cependant, la biotransformation a un rôle clé dans la bioaccumulation des contaminants chez les invertébrés aquatiques, en particulier dans la diminution de la teneur bioaccumulé du composé parent. Toutefois, dans la littérature, il est difficile d'obtenir une estimation précise du paramètre toxico-cinétique relatif à la biotransformation (k_m), sans devoir fixer d'autre(s) paramètre(s) du modèle.

Ce chapitre présente d'un point de vue méthodologique l'intégration du processus de biotransformation dans le modèle générique et dans son cadre d'inférence associé, afin d'obtenir une estimation précise du k_m à partir de jeux de données disponibles dans la littérature. Ces résultats ont été présentés sous forme d'une communication orale à la conférence SETAC Europe à Helsinki en 2019, et font l'objet de l'article "*Estimation of biotransformation rates for organic contaminants in aquatic invertebrates using a generic toxicokinetic model and Bayesian inference",* à soumettre dans *Aquatic Toxicology*, qui constitue ce chapitre. Les informations supplémentaires associées sont présentées à la suite de cet article. De plus, une note a été ajoutée (Note 2) concernant les résultats expérimentaux de l'exposition de *G. fossarum* au pyrène.

4.2 ARTICLE 2

Estimation of biotransformation rates for organic contaminants in aquatic invertebrates using a generic toxicokinetic model and Bayesian inference.

Aude Ratier[a], Christelle Lopes[b,*], Olivier Geffard[a], Marc Babut[a].

[a] Irstea, UR RiverLy, centre de Lyon-Villeurbanne, 5 Avenue de la Doua, CS20244, 69625 Villeurbanne Cedex, France.

[b] Univ Lyon, Université Lyon 1, CNRS, Laboratoire de Biométrie et Biologie Evolutive UMR5558, F-69622 Villeurbanne, France.

[*] Corresponding author: christelle.lopes@univ-lyon1.fr

Abstract

Toxicokinetic (TK) models describe the process of bioaccumulation as a balance between contaminant uptake from different sources (e.g. water or diet), and their elimination by different processes (excretion, growth and/or biotransformation). Indeed, biotransformation may significantly affect chemicals' fate in organisms, especially their disposition, residence time, and toxicity. For invertebrates, this process is generally neglected, assuming a low metabolic activity. However, some species such as the amphipod *Gammarus sp.* are capable to metabolize a wide range of organic chemicals. In the last decade, some TK models including the biotransformation mechanism were developed, but some limits had risen for kinetic parameters estimation, such as negative values and large uncertainties for biotransformation rate especially. The aim of this study was to implement a Bayesian framework for simultaneously estimating the parameters of a generic TK model accounting for biotransformation applied to benthic invertebrate species. We illustrated this approach by fitting this generic TK model with 22 datasets available in the literature for several invertebrate species exposed to different chemicals. For all datasets, the median model predictions and their 95% credibility intervals showed that the model fit the data well. Uncertainties around biotransformation rate were reduced in comparison to the original study. From a methodological point of view, this paper illustrates that simultaneously estimating all model parameters for both parent chemical and its metabolite(s) from all available data by Bayesian inference, while considering the correlation between parameters and different types of data, is a real added value for TK modeling. The Bayesian inference bypasses the limits of previous models since any model parameters were fixed and no negative value were

obtained. Besides, the 95% credibility intervals around model predictions were given, which gave the uncertainties essential in the ERA.

Keywords: Invertebrate – Biotransformation – Bayesian inference – Toxicokinetic model

Highlights:

- A TK model considering biotransformation in a Bayesian framework was developed
- It was applied to different invertebrate species and chemicals
- Model parameters whithout having to fix their value were simultaneously estimated
- Uncertainties were reduced around kinetic parameters for metabolites
- Quantification of uncertainties arround model predictions essential in ERA

1. Introduction

Biotransformation may significantly affect chemicals' fate in organisms, especially their disposition, residence time, and toxicity (Livingstone 1998). Knowledge of the major quantitative and qualitative similarities and differences in biotransformation pathways between species is necessary for the design of toxicity tests, development of biomarkers, modelling of chemical fate in ecosystems and understanding of the selective role of biotransformation in animal ecology and evolution (Livingstone 1994). In the last years, substantial progress has been observed in measuring and estimating biotransformation rates (k_m) for organic chemicals in aquatic organisms ((Nichols *et al.* 2007, Arnot *et al.* 2008a, Arnot *et al.* 2008b, Katagi 2010). This parameter has its importance due to its influence on the chemical bioaccumulation in organisms. Indeed, as a first step in Environmental Risk Assessment (ERA), models based on toxicokinetic (TK) approaches are used to predict chemical concentrations in organisms from those to which they are exposed in their environment. They describe the process of bioaccumulation as a balance between contaminant uptake from different sources (e.g. water or diet), and processes concurring to lower the internal concentration (excretion, dilution by growth or biotransformation) (MacKay et Fraser 2000). Thus, biotransformation is an additional way of elimination to include in TK models to prevent overestimation of internal concentrations in biota (Van der Linde *et al.* 2001).

Despite the increase concern about metabolites in aquatic organisms, their inclusion in ERA is still limited, mainly focusing on toxicity and scarcely considered in TK models (Nichols *et al.* 2007, Arnot *et al.* 2008a, Arnot *et al.* 2008b, Katagi 2010). Besides, biotransformation mechanism by aquatic invertebrates has been often assumed to be of limited importance unlike fishes (Morrison *et al.* 1996). However,

from some studies conducted during the last decade, evidence has emerged for the existence of large differences in biotransformation rates among invertebrate taxa (Ashauer *et al.* 2012, Jeon *et al.* 2013, Rösch *et al.* 2016, Miller *et al.* 2017, Fu *et al.* 2018). In order to gain knowledge on metabolites' fate in freshwater biota and on mechanistic understanding of differences in species sensitivity or toxic potency of chemicals, few studies provided indicative values for biotransformation rate. For example, due to the lack of experimental data in the past for metabolites, Van der Linde *et al.* (2001) were the first to report alternative modeling, also called the difference method, to estimate the biotransformation rate. In this approach, the biotransformation rate is calculated as the difference of the sum of the rate constants of other dissipation processes from the total depuration rate constant. Their work was followed by Arnot *et al.* (2008b) and (Chen et Kuo 2018), where biotransformation rate was estimated with the physico-chemical data available in databases. Briefly, they estimated normalized biotransformation rates for a 10-g fish at 15 °C based on molecular structure, log K_{ow}, and molecular weight of the chemical. Chen and Kuo (2018) also calculated biotransformation rate from the whole-body biotransformation half-life which was modeled with the fraction of freely dissolved chemical, the Abraham parameters and McGowan volume. However, large uncertainties and possible negative values were estimated. Thus, alternative modeling approach for determining this model parameter directly from experiments was investigated (Ashauer *et al.* 2012, Kuo et Chen 2016). Kuo et Chen (2016) were the first to report a generic theoretical framework to estimate biotransformation rate values from experimental uptake data. Nonetheless, as all examples in their study focused on worm species, further validations across different biological species would be useful.

The purpose of the present study is to implement a unified modeling framework to account for biotransformation into a generic TK model for aquatic invertebrates. We used Bayesian inference for estimating model parameters, so as to account for potential correlations among these and obtain an accurate assessment of uncertainty. We will illustrate our approach by fitting the generic model to 22 experimental datasets available in the literature for different invertebrate species exposed to different chemicals with several number of metabolites throuh dissolve and trophic routes of exposure.

2. Material and methods

2.1 A generic TK model taking into account biotransformation

A generic first-order kinetic bioaccumulation model can be expressed as follows (Eq. (1), Ratier *et al.* (2019)):

$$\mathrm{dC}(t)/\mathrm{d}t = \sum_{\mathrm{i}=1}^{\mathrm{n}}(\mathrm{k_i} \times \mathrm{C_i}(t)) - \sum_{\mathrm{j}=1}^{\mathrm{p}}\left(\mathrm{k_j} \times \mathrm{C}(t)\right) \quad (1)$$

where $C(t)$ is the contaminant concentration at time t (days) in the whole organism (ng g_{org}^{-1} or nmol kg_{org}^{-1} where the mass is expressed in wet weight (ww)), n is the number of contamination sources, k_i the uptake rate from the contamination source i, $C_i(t)$ the contaminant concentration in the contamination source i at time t (day), p the number of elimination processes and k_j the rate related to elimination process j. This generic model is valid for parent compounds as well as for metabolites.

Biotransformation is considered as an elimination process (k_j) for the parent compound; its specific rate is referred to as k_m. Thus, Eq. (1) could be completed as follows (Eq. (2)):

$$\begin{cases} \mathrm{d}C(t)/\mathrm{d}t = \sum_{\mathrm{i}=1}^{\mathrm{n}}\left(\mathrm{k_i} \times \mathrm{C_i}(t)\right) - \sum_{\mathrm{d}=1}^{\mathrm{q}}\left(\mathrm{k_d} \times \mathrm{C}(t)\right) - \sum_{\mathrm{x}=1}^{\mathrm{z}}\left(\mathrm{k_{m,x}} \times \mathrm{C}(t)\right) & for\ 0 < t < t_c \quad (2) \\ \mathrm{d}C(t)/\mathrm{d}t = -\sum_{\mathrm{x}=1}^{\mathrm{z}}\left(\mathrm{k_{m,x}} \times \mathrm{C}(t)\right) & for\ t > t_c \quad (3) \end{cases}$$

where q the number of elimination processes other than biotransformation, k_d the rate related to elimination process d other than biotransformation, z is the number of metabolite, $k_{m,x}$ is the biotransformation rate of a metabolite x (day^{-1}) and t_c is the time (days) at the end of the exposure phase.

The bioaccumulation kinetic for the metabolite x could be expressed as Eqs. (4) and (5):

$$\begin{cases} \mathrm{dC_{met,x}}(t)/\mathrm{d}t = \mathrm{k_{m,x}} \times \mathrm{C}(t) - \mathrm{k_{emet,x}} \times \mathrm{C_{met,x}}(t) & for\ 0 < t < t_c \quad (4) \\ \mathrm{dC_{met,x}}(t)/\mathrm{d}t = -\mathrm{k_{emet,x}} \times \mathrm{C_{met,x}}(t) & for\ t > t_c \quad (5) \end{cases}$$

where $C_{met,x}$ (t) is the x metabolite concentration at time t (days) in the whole organism (ng g^{-1} or nmol kg^{-1} ww) and $k_{emet,x}$ is the elimination rate of the metabolite x (day^{-1}).

We assumed that (*i*) metabolites originate only from parent compound, (*ii*) they are not taken up, (*iii*) they could be eliminated and (*iv*) parent compound concentration in media is constant over time. Analytical solutions were provided for both uptake and elimination phases for parent compound and metabolites (**Annex S1, SI**).

2.2. Datasets from literature and associated inference methods

We found in seven studies describing biotransformation of 22 parent compounds, including PAHs, plant protection products and drugs (Giessing *et al.* 2003, Schuler *et al.* 2003, Mäenpää *et al.* 2009, Ashauer *et al.* 2012, Carrasco-Navarro *et al.* 2015, Miller *et al.* 2017, Fu *et al.* 2018). The generic model (Eqs (2), (3) and (4), (5)) was fitted to these biotransformation toxicokinetic data, which were obtained reading the graphic or from raw data directly when available. For all the datasets, only one exposure route was considered, by sediment or by water according the study (**Table 1**). In most cases one single metabolite was measured (Giessing *et al.* 2003, Schuler *et al.* 2003, Mäenpää *et al.* 2009, Ashauer *et al.* 2012, Carrasco-Navarro *et al.* 2015,

Miller *et al.* 2017); in a few cases two or three metabolites were formed and measured throughout the tests (Ashauer *et al.* 2012, Miller *et al.* 2017, Fu *et al.* 2018) (**Table 1**). One study reported only experimental data (Giessing *et al.* 2003) while the others attempted to estimate TK model parameters for parent compounds, and, more rarely, to the biotransformation rate (Ashauer *et al.* 2012, Carrasco-Navarro *et al.* 2015, Fu *et al.* 2018).

Briefly, Miller *et al.* (2017) exposed *Gammarus pulex* to diazepam and propanolol spiked water for two days. The estimate of uptake rate constant (k_w) and depuration rate constant (k_e) was performed using a curve fitting algorithm, sequentialy and simultaneously.

Ashauer *et al.* (2012) exposed *Gammarus pulex* for 24 hours to spiked water in aldicarb, carbaryl, carbofuran, chlorpyrifos, malathion, pentachlorophenol, seanine, 2,4-dichloroaniline, 2,4-dichlorophenol, 2,4,5-trichlorophenol, 4-nitrobenzyl-chloride. They constrained the model parameters to positive values, which were estimated by least-squares minimization (Levenberg−Marquardt algorithm) without weighting of data. Asymptotic standard errors of parameters were derived from the covariance matrix followed by calculation of confidence intervals. All parameters of a given compound were estimated simultaneously, except for carbaryl and 4-nitro-benzyl-chloride where the uptake rate from water (k_w) needed to be kept fixed at the value from a previous study in order to achieve a good fit (Ashauer *et al.* 2010a).

Carrasco-Navarro *et al.* (2015) exposed *Gammarus setosus* to pyrene spiked water for four days. They chose a model to fitter these data into the Sigma Plot library in order to estimate the initial values of the model parameters before to run the inference process. Then a two-compartment model was used to fit experimental values of total body burden, the sum of all metabolites and parent pyrene

concentrations and to calculate toxicokinetic parameters using a least squares fit and simple Runge-kutta methods.

Schuler *et al.* (2003) exposed *Chironomus tentans* and *Lumbriculus variegatus* for 3 and 10 days respectively to benzo(a)pyrene spiked sediment. TK parameters were estimated through a two-step process: first, the uptake rate from sediment (k_s) was estimated from the uptake phase, assuming that elimination is not important during the initial portion of the uptake phase. Second, the models were fitted to data by applying an iterative least squares procedure to estimate the othe TK model parameters.

Mäenpää *et al.* (2009) exposed for 15 days *Lumbriculs variegatus* to pyrene spiked water. Their experiment was restricted to the uptake phase. The concentration of pyrene in the test organisms was evaluated by nonlinear regression, using a one-compartment kinetic model where only parent compound parameters were estimated. Only the experimental metabolite concentrations in organisms were given, relative parameters were not estimated.

Giessing *et al.* (2003) exposed *Nereis diversicolor* for 9 days to pyrene spiked sediment. Only the experimental contaminant concentrations in organisms were available, the model parameters were not estimated.

Fu *et al.* (2018) exposed *Gammarus pulex* and *Hyallela azteca* to water spiked with azostrobin and prochloraz for 24 hours. They distinguished between the time courses of the parent compounds, of the sum of all detected primary metabolites directly formed from the parent compound, and of the sum of all detected secondary metabolites. They compared two approaches to estimate the model parameters: simultaneously (constrained to positive values) and a stepwise fitting approach (by fixing the uptake rate to estimate the other model parameters,

were a stronger weight was given to the uptake rate from water, k_w). Similar results were obtained for the both approaches.

Table 1. Summary of the selected literature data reporting biotransformation kinetics in invertebrates.

	Specie	Study	Chemicals	Exposure route	TK parameters availability
1 metabolite	*Gammarus sp.*	Miller et al. 2017	Propanolol	water	Incomplete (k_m and k_{emet} were missing)
		Ashauer et al. 2012	Aldicarb Carbaryl Carbofuran Malathion Pentachlorophenol	water	All
		Carrasco-Navaro et al., 2015	Pyrene	water	All
	Chironomus tentans	*Schuler et al., 2003*	Benzo(a)Pyrene	sediment	Incomplete (k_{emet} is missing)
	Lumbriculus variegatuds	*Schuler et al., 2003*	Benzo(a)Pyrene	sediment	Incomplete (k_{emet} is missing)
		Mäenpää et al., 2009	Pyrene	water	Incomplete (k_m and k_{emet} are missing)
	Nereis diversicolor	*Giessing et al., 2003*	Pyrene	sediment	None
2 metabolites	*Gammarus pulex.*	Ashauer et al. 2012	Chlorpyrifos 2,4-dichloroaniline 2,4-dichlorophenol 2,4,5-trichlorophenol	water	All
		Fu et al. 2018*	Azoxystrobin Procholoraz	water	All
	Hyalella azteca	Fu et al. 2018*	Azoxystrobin Procholoraz	water	All
3 metabolites	*Gammarus pulex.*	Ashauer et al., 2012	Seanine 4-nitrobenzyl-chloride	water	All (k_w fixed for 4-nitrobenzyl-chloride)
		Miller et al., 2017	Diazepam	water	Incomplete (k_m was missing)

**: The second metabolite originated from first metabolites, not from the parent compound.*

2.3. Link between model and data: Bayesian inference

2.3.1 The TK model

Considering only one exposure route (water or sediment according to data) and according to the number of metabolites, Eq. (1) can thus be modified as follows for a parent compound and its metabolites (Eq. (6) for the exposure phase):

$$\begin{cases} \frac{dC(t)}{dt} = k_w \times C_w - \left(k_e + k_{m,1} + \ldots + k_{m,x}\right) \times C(t) \\ \frac{dC_{met,1}(t)}{dt} = k_{m,1} \times C(t) - k_{emet,1} \times C_{met,1}(t) \\ \cdot \\ \cdot \\ \cdot \\ \frac{dC_{met,x}(t)}{dt} = k_{m,x} \times C(t) - k_{emet,x} \times C_{met,x}(t) \end{cases} \quad (6)$$

where k_w (or k_s) is the uptake rate of the parent compound from water (or from sediment) (day^{-1}), C_w (or C_s) is the parent compound concentration in water or sediment (µmol L^{-1}, nmol L^{-1}, µg mL^{-1}, µg L^{-1} or ng g_{sed}^{-1}).

2.3.2 Stochasticity and graphical representation

We assumed a Gaussian distribution of the contaminant concentration in the organism (parent or metabolite):

$$C_{obs}(t) \sim N(C(t), \sigma) \quad (7)$$

where N stands for the Normal distribution, $C_{obs}(t)$ corresponds to the chemical concentration in the organism at time t measured during the experiments, $C(t)$ is the contaminant concentration in the organism at time t predicted by the model and σ is the standard deviation of contaminant concentration in the organism.

The generic directed acyclic graph (DAG) for an organism exposed to a parent compound and its metabolite(s) is presented in **Figure S1**.

2.3.3 Definition of priors

The prior distributions for each datasets were summurized in **Table S1**. Prior distributions for each model parameter to estimate (k_w, k_s, k_e, $k_{m,1}$, $k_{m,2}$, $k_{m,3}$, $k_{emet,1}$,

$k_{emet,2}$, $k_{emet,3}$) were defined as non-informative decimal logarithm (−5, 2) uniform distribution; except if a parameter was already estimated in previous studies or if previous data are available, a normal prior distribution can be assumed with the mean value estimated and the precision with a standard deviation at least twice the value estimated to take into account the potential differences in experimental conditions. Priors were defined on the decimal logarithm scale in order to give the same probability to lower or higher estimates. When posterior distributions were closed to the lower or higher boundaries of the prior distribution, the inference process was run again with weaker or larger prior distributions (*i.e.* for malathion, 2,4-dichlorophenol, 2,4,5-trichlorophenol and pyrene). We also assumed a non-informative (0.001, 0.001) gamma prior for the precision, which is one of the most common priors for variance parameters (Lambert *et al.* 2005, Richards et Chaloupka 2009).

2.3.4 Implementation of the model – MCMC simulations

Inference computation was performed with JAGS and R software (R Core Team, 2017 (Plummer 2016, R Core Team 2017). The models were fitted to data using Bayesian inference via Markov Chain Monte Carlo (MCMC) sampling. For each dataset tested, we started by running a short sampling (5,000 iterations after a burn-in phase of 20,000 iterations) using the Raftery and Lewis (1992) method to set the necessary thinning and number of iterations to reach an accurate estimation of each model parameter (**Table S1**). To monitor the convergence of the chains, we used a visual inspection as well as the Gelman criterion (Gelman, 1995) or Geweke criteria (Geweke 1989). The R codes are given in supporting information (**Annex S2**).

2.3.5 Posterior distributions and relevance of model predictions

From the joint posterior distribution, we obtained the marginal posterior distribution for each parameter, which can be summarized by the mean and by the 95% credibility interval. The accuracy of model parameter estimation can be visualized by comparing prior and posterior distributions: a thinner posterior distribution indicates that the data contribute enough information to precisely estimate parameters. To check the relevance of model predictions, we represented, for each dataset, observed data superimposed on the model simulated with the mean of the posterior distribution for each parameter and the 95% credibility band of the predicted data considering parameter uncertainties and stochasticity. To obtain the 95% credibility band, the predicted data were simulated with the model for each MCMC iteration and the stochastic model considered for observed data (Eq. (5)).

3. Results

3.1. Model parameters and predictions

For all datasets, the inference process converged without fixing any parameter and thin posterior distributions were obtained for each parameter, meaning that data contribute sufficient information to accurately estimate model parameters (**Fig. S2**). When two or three metabolites were involved, the inference process was slower than for one metabolite (of the order of the hour rather than the minute). For each couple specie-contaminant, the mean value and the 95% credibility interval for each model parameters were reported in **Figure 1, Figure S3** and **Table S1**.

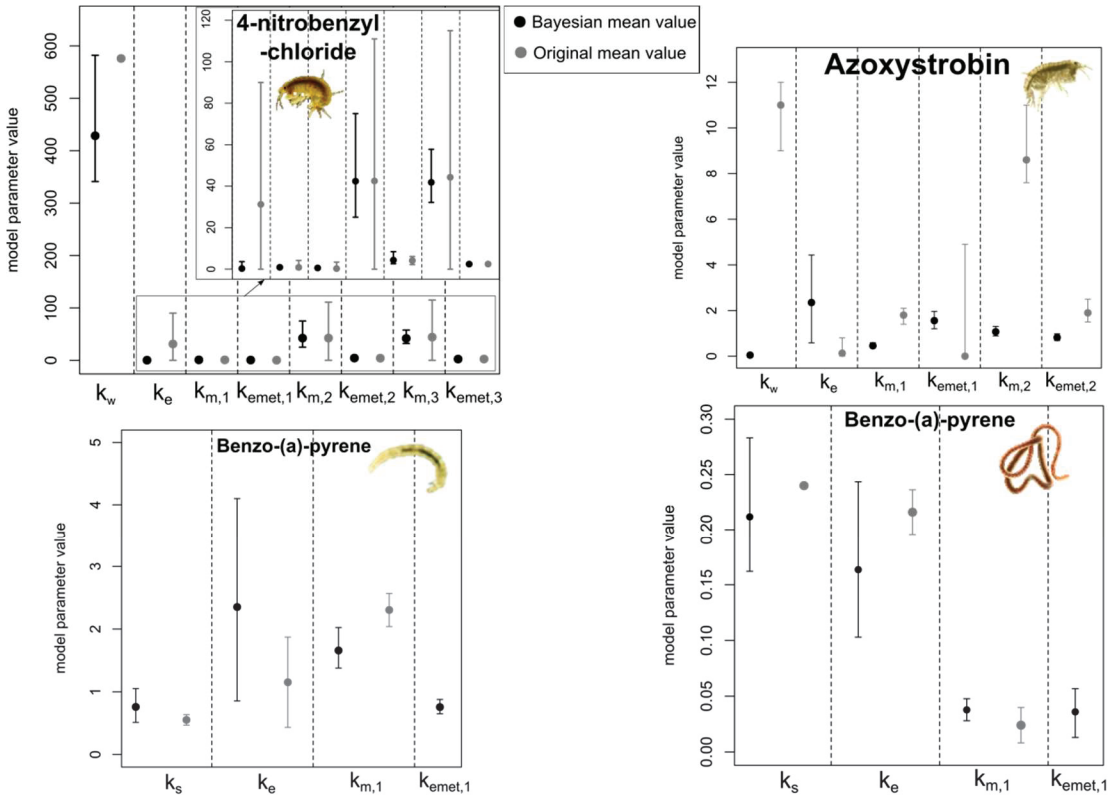


Figure 1. Model parameters estimated by Bayesian inference (black) and in the original study (grey). Dots represent mean values and error bars the 95% credibility (Bayesian inference) or confidence (original studies) intervals.

The biotransformation rate indicates how much biotransformation adds to the reduction of parent compound bioaccumulation. The range mean values of k_m for all datasets were between 0.038 and 44 d^{-1} (**Fig. 2**), the highest values were obtained for *Gammarus sp*.

Besides, k_m mean value varies according to the chemical properties. The highest values of k_m were obtained for carbofuran (21 d^{-1}), 2,4-dichlorophenol (40 d^{-1}), 2,4,5-trichlorophenol (38 d^{-1}) and 4-nitrobenzyl-chloride (42.3 and 43.9 d^{-1}), mostly phytopharmaceutical product.

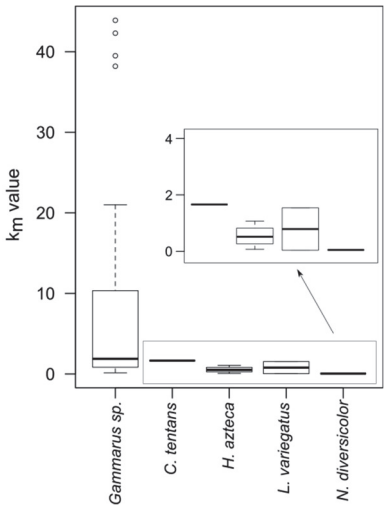


Figure 2. Distribution of the estimated mean k_m values in Bayesian inference according species in the seven studies selected.

In the benzo-(a)-pyrene spiked sediment experiment (Schuler et al., 2003), we observed that chironomids had a better biotransformation capacity than *L. variegatus* (k_m = 1.66 and 0.038 d^{-1} respectively), as the authors had already suggested. In the study of Fu et al. (2018), similar biotransformation rates were obtained for prochloraz and azoxystrobin in gammarids and hyallelids, as previously mentioned in the original study. Additionally, for pyrene, *L. variegatus* and *G. setosus* had a higher k_m than *N. diversicolor* (1.54, 1.04 and 0.050 d^{-1} respectively), possibly due to the exposure route (sediment exposure for *N. diversicolor*). Thus, the biotransformation is species-chemicals specific.

In general, the model predictions fitted well with experimental data (**Fig. 3 and S4**). For about half of chemicals (chlorpyrifos, carabryl, 2,4-dichlorophenol, malathion, pentachlorophenol, 4-nitrobenzyl-chloride, 2,4,5-trichlorophenol, seanine, propranolol and azoxistrobin), an improper fit in the elimination phase for the parent compound was observed, meaning an underestimation of the concentration by the model compared to observed data. This result was also well noticed on the respective chemical posterior predictive check (PPC, **Fig. S5**). For metabolites, the

model predictions fitted well with experimental data too, even when only the uptake data was given (Giessing *et al.* 2003, Mäenpää *et al.* 2009). Nevertheless, large uncertainties were obtained around model predictions for six chemicals: chlorpyrifos, malathion, 2,4,5-trichlorophenol, propranolol, diazepam and pyrene.

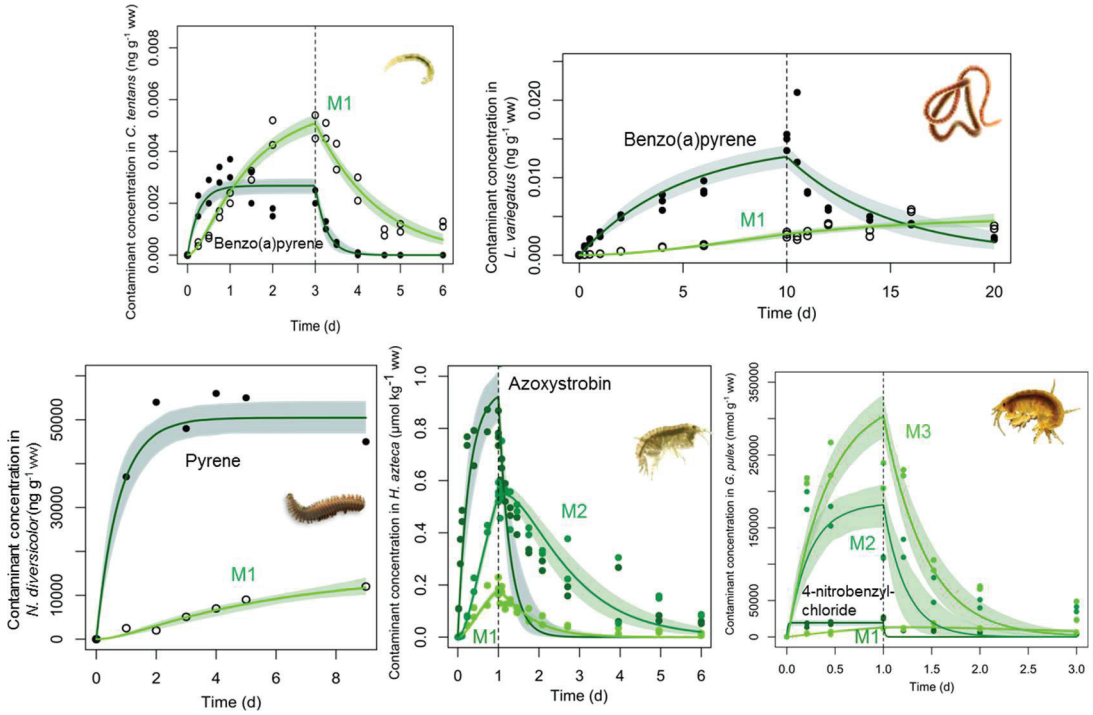


Figure 3. Examples of observed data (dots) and model predictions (solid and colored area) for each contaminant and its metabolite(s) (Eqs. (6 and 7)) according time (days). The uptake and depuration phases are separated with the black dashed vertical line.

3.2. Comparison of parameters values between original estimation and Bayesian inference

When possible, we compared model parameters values obtained with Bayesian inference with those estimated in original publications (**Fig. 1**). In particular, only two studies (Ashauer *et al.* 2012, Fu *et al.* 2018) of the seven selected had reported all the mean values for each model parameter and their

corresponding 95% confidence intervals. Even if the inference process to estimate all the model parameters was not the same between the original studies and our study, it was the same data considered and the same model parameters to estimate.

The k_m mean values were similar between the Bayesian and the original approaches except for chlorpyrifos, 2,4-dichlorophenol and 2,4,5-trichlorophenol; but still in the respective confidence intervals from the original study. For pyrene (*G. setosus)*, prochloraz, azoxystrobin and benzo-(a)-pyrene (*C. tentans)*, the range value of k_m was out of the confidence interval of the original study. In addition, the estimated values of model parameters for parent compounds were sometimes different from the original study (chlorpyrifos, malathion, diazepam, prochloraz and azoxystrobin). In addition, we noticed with the Bayesian inference that the uncertainties around the model parameters were larger for parent compounds than for metabolites, except for 7 chemicals (carbofuran, 2,4-dichlorophenol, pentachlorophenol, 4-nitro-benzyl-chloride, pyrene (*G. setosus*), prochloraz and azoxystrobin). Besides, Ashauer et al., (2012) had found that carbofuran, 2,4-dichlorophenol and 2,4,5-trichlorophenol exhibited large confidence intervals for uptake and elimination rates. Thus, they informed of the careful interpretation of model parameter presented in their work, especially for the uptake rates of carbaryl and 4-nitro-benzylchloride which were fixed, and for elimination rates of malathion, pentachlorophenol, chlorpyrifos, 2,4,5-trichlorophenol and seanine, where they reached the null values.

4. Discussion

This study proposes a unified framework to estimate the biotransformation rate with experimental TK data for aquatic invertebrates exposed to organic chemicals.

4.1. Computational performance

One of the advantages of this generic approach is that it allows us to consider each uptake (*e.g.* water, sediment) or elimination (*e.g.* excretion, growth and biotransformation) route as a module to add according to the availability of the data measured, thus it can be adapted according to the number of metabolites.

Besides, we demonstrated that Bayesian inference applied to a generic TK model accounting for biotransformation developed here could be generalized whatever the specie, the contaminant, the exposure route and the number of metabolites.

The computation time was fast, few minutes to one hour according to the number of metabolites. The use of the well-known and free of charge R software could readily make accessible this generic TK model computation for researchers or for regulation offices.

In previous studies, some limits raised for the estimation of TK model parameters accounting for biotransformation: (i) sometimes it required to fix any parameter to estimate all the other model parameters, (ii) negative values were obtained for some model parameters (Arnot et al., 2008) and (iii) the uncertainties around predictions were missing. The Bayesian inference bypasses these limits since we did not fix some model parameters, we did not obtain negative value for k_m and we gave the 95% credibility intervals around model predictions in addition to correlations between parameters.

A priori information is important to consider in the inference process in order to avoid fixing model parameter. For example, Ashauer et al. (2012) have required to fix k_w from previous experiments (Ashauer *et al.* 2010a) for two chemicals to estimate the other model parameters since the convergence of the inference was not

achieved. In the Bayesian approach, *a priori* information is always considered, avoiding these kinds of results and alternative approaches. Additionally, when the model parameter value tends to zero, some studies required to truncate at zero the confidence interval, introducing a bias in the estimation of model parameters. Conversely, Bayesian inference avoids to constraint a parameter distribution.

Uncertainties within ERA need to be properly characterized to enable risk estimates to be used as a sound basis for risk management actions. In our modeling framework, we added the 95% credibility bands around model predictions which gave the uncertainties essential in the ERA. However, we noticed large uncertainties around model predictions for some chemicals, larger boundaries for parent TK model parameter (k_w, k_s and k_e) and sometimes an out range of values for k_m compared to the corresponding original standard deviation. These results could be mainly explain by a lack of information on experimental data, meaning that maybe all of the metabolites were not measured and so integrated in the model or due to the hypothesis of biotransformation mechanism, as suggested Ashauer et al. (2012*).* Indeed, the model did not considerate metabolites from the first metabolites (e.g. 2nd metabolites), but only from parent compounds. Besides, chemical analyses have a key role in TK modeling since it gives the observed data. But most of the metabolites have not standard material, increasing uncertainties around the detection and the identification of metabolites. Moreover, this could be explained by the hypotheses of the model which consider a constant exposure concentration and the assumption that there was no degradation in the exposure medium of the parent compound in metabolites.

4.2. Significance and implications of taking into account biotransformation in aquatic invertebrates

Environmental and health assessment of organic contaminants as well as the ensuing regulatory guidelines for chemical management have been confined mostly to the bioaccumulation potential of the parent compounds (Kuo and Chen, 2016). To gain knowledge on biotransformation, there is a large possibility to investigate on chemicals and invertebrates species. As a first lead, gammarids appear to be species to be tested preferably since gammarids have shown higher metabolic abilities for various organic compounds compared to other species (**Fig. 2**). For example, bioaccumulation tests could incorporate a biotransformation study for gammarids, but that might be less essential for other species.

Besides, with the present framework, considering different kind of data simultaneously could lead to further investigation about biotransformation in aquatic invertebrates, such as the relative contribution of water against trophic exposure routes.

A better understanding of biotransformation in invertebrates is necessary to access a better evaluation of chemicals and their biological effects in higher trophic levels. Thus, k_m could be incorporated in aquatic food web models or used to complete databases in other modeling framework, such as QSAR modeling (Arnot et al., 2008). It also could be added in TKTD models, such as DEBtox or GUTS models (EFSA 2018), in order to obtain a more accurate evaluation of the toxicity of a chemical.

In the future, chemical limits could be overcome if the standard materials for metabolites will be available and if the development of analytical protocols to measured and quantified metabolites will be improved. On another side, biological

investigations such as the development of biomarkers could increase the knowledge on biotransformation capacity in invertebrates.

5. Conclusions

In the present study we proposed a unified modeling framework to estimate the elimination and biotransformation rate in a generic TK model. Model parameters were simultaneously estimated in a Bayesian framework, leading to a quantification of uncertainties around model predictions which play a key role in environmental risk assessment. A total of 22 couples of aquatic invertebrate species - chemicals were tested, encompassing various ecological and biological traits and different range of contaminants such as phytopharmaceuticals, drugs and PAHs, having from one to three metabolites. Thus, we demonstrated that considering simultaneously biotransformation and other processes in a generic TK model with standardized experiments is feasible, as it was applied to several invertebrate species and chemicals. This approach leads to an accurate estimate of k_m, transferable to any species-chemicals couple. In future, the Bayesian analysis may be used to simultaneously estimate model parameters considering several exposure routes such as sediment and water. The model could be improved in integrating pulse exposures and secondary metabolites kinetics. Further developments in chemical analyses are required, especially about standard reference for metabolites. Overall, a better understanding of biotransformation in invertebrates is necessary to access a better risk assessment of chemicals, especially their biological effects in invertebrates and in higher trophic levels. Thus, k_m may be added in TKTD models or added to complete existing databases used in other modeling framework, such as QSAR modeling.

Acknowledgments

This study was supported by the French Agency for Biodiversity. The authors are also grateful to anonymous reviewers and to Ms. L. Northrup for editing the manuscript.

References

Arnot, J. A., D. Mackay, and M. Bonnell. 2008a. Estimating metabolic biotransformation rates in fish from laboratory data. Environmental Toxicology and Chemistry **27**:341-351.

Arnot, J. A., D. Mackay, T. F. Parkerton, and M. Bonnell. 2008b. A database of fish biotransformation rates for organic chemicals. Environmental Toxicology and Chemistry **27**:2263-2270.

Ashauer, R., I. Caravatti, A. Hintermeister, and B. I. Escher. 2010. Bioaccumulation kinetics of organic xenobiotic pollutants in the freshwater invertebrate Gammarus pulex modeled with prediction intervals. Environmental Toxicology and Chemistry **29**:1625-1636.

Ashauer, R., A. Hintermeister, I. O'Connor, M. Elumelu, J. Hollender, and B. I. Escher. 2012. Significance of xenobiotic metabolism for bioaccumulation kinetics of organic chemicals in gammarus pulex. Environmental Science and Technology **46**:3498-3508.

Carrasco-Navarro, V., I. Jæger, J. O. Honkanen, J. V. K. Kukkonen, J. Carroll, and L. Camus. 2015. Bioconcentration, biotransformation and elimination of pyrene in the arctic crustacean Gammarus setosus (Amphipoda) at two temperatures. Marine Environmental Research **110**:101-109.

Chen, C. C. and D. T. F. Kuo. 2018. Bioconcentration model for non-ionic, polar, and ionizable organic compounds in amphipod. Environmental Toxicology and Chemistry **37**:1378-1386.

Fu, Q., A. Rösch, D. Fedrizzi, C. Vignet, and J. Hollender. 2018. Bioaccumulation, Biotransformation, and Synergistic Effects of Binary Fungicide Mixtures in Hyalella azteca and Gammarus pulex: How Different/Similar are the Two Species? Environmental Science and Technology **52**:13491-13500.

Geweke, J. 1989. Bayesian Inference in Econometric Models Using Monte Carlo Integration. Econometrica **57**:1317-1339.

Giessing, A. M. B., L. M. Mayer, and T. L. Forbes. 2003. Synchronous fluorescence spectrometry of 1-hydroxypyrene: A rapid screening method for identification of PAH exposure in tissue from marine polychaetes. Marine Environmental Research **56**:599-615.

Jeon, J., D. Kurth, R. Ashauer, and J. Hollender. 2013. Comparative toxicokinetics of organic micropollutants in freshwater crustaceans. Environmental Science and Technology **47**:8809-8817.

Katagi, T. 2010. Bioconcentration, bioaccumulation, and metabolism of pesticides in aquatic organisms. Rev Environ Contam Toxicol **204**:1-132.

Kuo, D. T. F. and C. C. Chen. 2016. Deriving in vivo biotransformation rate constants and metabolite parent concentration factor/stable metabolite factor from bioaccumulation

and bioconcentration experiments: An illustration with worm accumulation data. Environmental Toxicology and Chemistry **35**:2903-2909.
Lambert, P. C., A. J. Sutton, P. R. Burton, K. R. Abrams, and D. R. Jones. 2005. How vague is vague? A simulation study of the impact of the use of vague prior distributions in MCMC using WinBUGS. Statistics in Medicine **24**:2401-2428.
Livingstone, D. R. 1994. Recent developments in marine invertebrate organic xenobiotic metabolism. . Toxicological and Ecotoxicological News **1**:88-94.
Livingstone, D. R. 1998. The fate of organic xenobiotics in aquatic ecosystems: quantitative and qualitative differences in biotransformation by invertebrates and fish. Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology **120**:43-49.
MacKay, D. and A. Fraser. 2000. Bioaccumulation of persistent organic chemicals: Mechanisms and models. Environmental Pollution **110**:375-391.
Mäenpää, K., M. T. Leppänen, and J. V. K. Kukkonen. 2009. Sublethal toxicity and biotransformation of pyrene in Lumbriculus variegatus (Oligochaeta). Science of the Total Environment **407**:2666-2672.
Miller, T. H., N. R. Bury, S. F. Owen, and L. P. Barron. 2017. Uptake, biotransformation and elimination of selected pharmaceuticals in a freshwater invertebrate measured using liquid chromatography tandem mass spectrometry. Chemosphere **183**:389-400.
Morrison, H. A., F. A. P. C. Gobas, R. Lazar, and G. D. Haffner. 1996. Development and Verification of a Bioaccumulation Model for Organic Contaminants in Benthic Invertebrates. Environmental Science & Technology **30**:3377-3384.
Nichols, J. W., P. N. Fitzsimmons, and L. P. Burkhard. 2007. In vitro-in vivo extrapolation of quantitative hepatic biotransformation data for fish. II. Modeled effects on chemical bioaccumulation. Environmental Toxicology and Chemistry **26**:1304-1319.
Plummer, M. 2016. rjags: Bayesian Graphical Models using MCMC.
R Core Team. 2017. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria.
Ratier, A., C. Lopes, P. Labadie, H. Budzinski, N. Delorme, H. Quéau, L. Peluhet, O. Geffard, and M. Babut. 2019. A Bayesian framework for estimating parameters of a generic toxicokinetic model for the bioaccumulation of organic chemicals by benthic invertebrates: Proof of concept with PCB 153 and two freshwater species. Ecotoxicology and Environmental Safety **180**:33-42.
Richards, R. G. and M. Chaloupka. 2009. Temperature-dependent bioaccumulation of copper in an estuarine oyster. Science of the Total Environment **407**:5901-5906.
Rösch, A., S. Anliker, and J. Hollender. 2016. How Biotransformation Influences Toxicokinetics of Azole Fungicides in the Aquatic Invertebrate Gammarus pulex. Environmental Science and Technology **50**:7175-7188.
Schuler, L. J., M. Wheeler, A. J. Bailer, and M. J. Lydy. 2003. Toxicokinetics of sediment-sorbed benzo[a]pyrene and hexachlorobiphenyl using the freshwater invertebrates Hyalella azteca, Chironomus tentans, and Lumbriculus variegatus. Environmental Toxicology and Chemistry **22**:439-449.
Van der Linde, A., A. Jan Hendriks, and D. T. H. M. Sijm. 2001. Estimating biotransformation rate constants of organic chemicals from modeled and measured elimination rates. Chemosphere **44**:423-435.

4.3 MATERIEL SUPPLEMENTAIRE

Supporting information

Estimation of biotransformation rates for organic contaminants in aquatic invertebrates using a generic toxicokinetic model and Bayesian inference.

Aude Ratier[a], Christelle Lopes[b,*], Olivier Geffard[a], Marc Babut[a]

[a] Irstea, UR RiverLy, centre de Lyon-Villeurbanne, 5 Avenue de la Doua, CS20244, 69625 Villeurbanne Cedex, France.
[b] Univ Lyon, Université Lyon 1, CNRS, Laboratoire de Biométrie et Biologie Evolutive UMR5558, F-69622 Villeurbanne, France.

* Corresponding author: christelle.lopes@univ-lyon1.fr

ANNEX S1 – Analytical solutions from Eqs. (2, 3) and (4, 5)

If we consider that $C_i(t)$ are constant over time which is reasonably in laboratory conditions, Eqs. (2) and (3) can be analytically integrated by distinguishing uptake (Eq. (S.1)) from elimination phases (Eq. (S.2)):

$$\begin{cases} C(t) = \dfrac{\sum_{i=1}^{n}(k_i \times C_i)}{\sum_{d=1}^{p} k_d \ + \sum_{x=1}^{z} k_{m,x}} + \left(C_0 - \dfrac{\sum_{i=1}^{n}(k_i \times C_i)}{\sum_{d=1}^{p} k_d \ + \sum_{x=1}^{z} k_{m,x}}\right) \times \ e^{-(\sum_{d=1}^{p} k_d + \sum_{x=1}^{z} k_{m,x}) \times t} & \text{for } 0 \ < \ t \ < \ t_c \quad (S.1) \\ C(t) = \dfrac{\sum_{i=1}^{n}(k_i \times C_i)}{\sum_{d=1}^{p} k_d \ + \sum_{x=1}^{z} k_{m,x}} \times \ e^{-(\sum_{d=1}^{p} k_d + \sum_{x=1}^{z} k_{m,x}) \times (t - t_c)} + \left(C_0 - \dfrac{\sum_{i=1}^{n}(k_i \times C_i)}{\sum_{d=1}^{p} k_d \ + \sum_{x=1}^{z} k_{m,x}}\right) \times \ e^{-(\sum_{d=1}^{p} k_d + \sum_{x=1}^{z} k_{m,x}) \times t} & \text{for } t \ > \ t_c \quad (S.2) \end{cases}$$

where C_0 is the contaminant concentration in the whole organism at the beginning of exposure (ng g_{org}^{-1}) and t_c the time at the end of the uptake phase (days).

For metabolite, Eqs. (4) and (5) can be analytically integrated by distinguishing uptake (Eq. (S.3)) to elimination phases (Eq. (S.4)):

$$\begin{cases} C_{met,x}(t) = \dfrac{k_{m,x} \ \times \ \dfrac{\sum_{i=1}^{n}(k_i \times C_i)}{\sum_{d=1}^{p} k_d \ + \sum_{x=1}^{z} k_{m,x}}}{\sum_{d=1}^{p} k_d \ - \ k_{emet,x}} \times \left(e^{-(\sum_{d=1}^{p} k_d + \sum_{x=1}^{z} k_{m,x}) \times t} \ - \ e^{-k_{emet,x} \times t}\right) + \dfrac{k_{m,x} \ \times \ \dfrac{\sum_{i=1}^{n}(k_i \times C_i)}{\sum_{d=1}^{p} k_d \ + \sum_{x=1}^{z} k_{m,x}}}{k_{emet,x}} \times (1 - \ e^{-k_{emet,x} \times t}) & \text{for } 0 \ < \ t \ < \ t_c \quad (S.3) \\ C_{met,x}(t) = \left(\dfrac{k_{m,x} \ \times \ \dfrac{\sum_{i=1}^{n}(k_i \times C_i)}{\sum_{d=1}^{p} k_d \ + \sum_{x=1}^{z} k_{m,x}}}{(\sum_{d=1}^{p} k_d \ + \sum_{x=1}^{z} k_{m,x}) - \ k_{emet,x}} \times \left(e^{-(\sum_{d=1}^{p} k_d + \sum_{x=1}^{z} k_{m,x}) \times t} \ - \ e^{-k_{e,met} \times t}\right) + \dfrac{k_{m,x} \ \times \ \dfrac{\sum_{i=1}^{n}(k_i \times C_i)}{\sum_{d=1}^{p} k_d \ + \sum_{x=1}^{z} k_{m,x}}}{k_{emet,x}} \times (1 - \ e^{-k_{emet,x} \times t}) \right) \times \ (e^{-k_{emet,x} \times (t - t_c)}) & \text{for } t \ > \ t_c \quad (S.4) \end{cases}$$

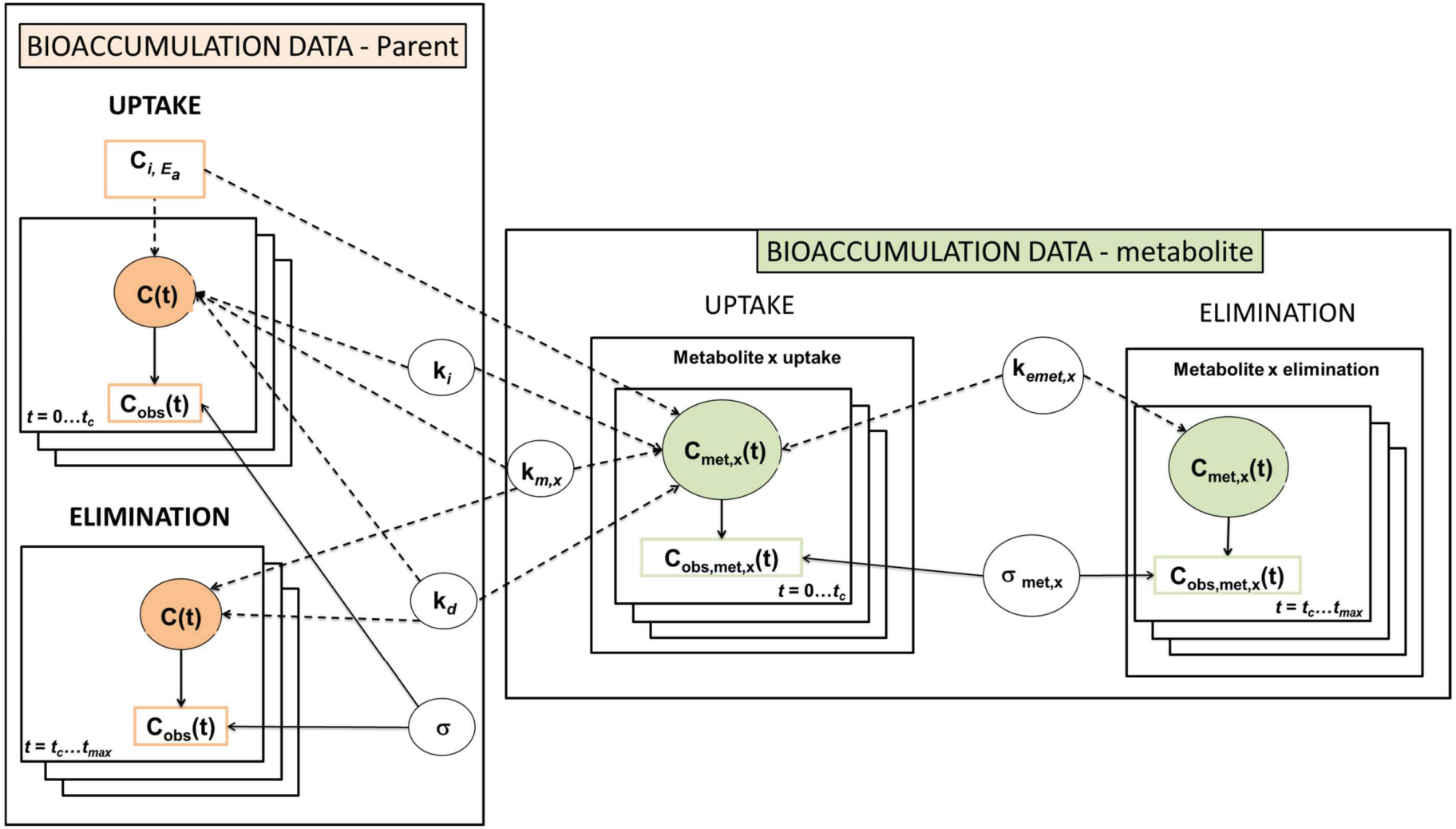


FIGURE S1 – DAG of the generic TK model accounting for biotransformation

Table S1. Summary of the TK model parameters: priors, mean and percentile values determining the 95% credibility interval. NA means no data available in the original study.

Study	Specie	Chemical	Parameter (d^{-1})	Prior distribution	Iterations	Thin	Mean Bayesian value	95% CI Bayesian	Mean original value	original 95% CI
Ashauer, 2012	*Gammarus pulex*	aldicarb	k_w	$\log_{10}$-dnorm(1.03,14)	201142	60	11.6	[7.61 -20.9]	9.86	[6.8-12.9]
			k_e	$\log_{10}$-dnorm(0.813,3.47)			12.0	[6.95-23.4]	9.31	[5.1-13.6]
			$k_{m,1}$	$\log_{10}$-dunif(-5,2)			1.66	[1.26 -2.16]	2.05	[0.8-3.3]
			$k_{emet,1}$	$\log_{10}$-dunif(-5,2)			4.61	[3.55-6.08]	6.19	[2.3-10.0]
		carbofuran	k_w	$\log_{10}$-dnorm(0.995,2.76)	350000	87	19.1	[10.0-83.6]	4930	[0-59590]
			k_e	$\log_{10}$-dnorm (-0.824,0.291)			13.1	[4.50 10^{-5}-118]	7063	[0-87885]
			$k_{m,1}$	$\log_{10}$-dunif(-5,2)			21.0	[11.84-48.3]	16.22	[0-32.6]
			$k_{emet,1}$	$\log_{10}$-dunif(-5,2)			0.403	[0.346-0.471]	0.16	[0.12-0.20]
		carbaryl	k_w	$\log_{10}$-dnorm(1.37,10)	1500000	1000	21.2	[16.6-28.2]	23.4	NA
			k_e	$\log_{10}$-dnorm(-0.569,10)			1.07	[0.125-2.81]	2.26	[1.4-3.1]
			$k_{m,1}$	$\log_{10}$-dunif(-5,2)			3.20	[2.52-3.98]	3.36	[2.4-4.4]
			$k_{emet,1}$	$\log_{10}$-dunif(-5,2)			0.365	[0.302-0.440]	0.09	[0.05-1.13]

Study	Specie	Chemical	Parameter (d^{-1})	Prior distribution	Iterations	Thin	Mean Bayesian value	95% CI Bayesian	Mean original value	original 95% CI
		malathion	k_w	$\log_{10}$-dnorm(1.97,2)	67428	18	123	[76.6-139]	8.86	[4.4-13.3]
			k_e	$\log_{10}$-dunif(-20,2)			0.013	[2.89 10^{-20}-0.118]	0	[0-3.1]
			$k_{m,1}$	$\log_{10}$-dunif(-5,2)			2.11	[1.02-3.55]	2.99	[1.1-4.9]
			$k_{emet,1}$	$\log_{10}$-dunif(-5,2)			1.025	[0.511-1.73]	1.91	[0.5-3.3]
		pentachloro-phenol	k_w	$\log_{10}$-dnorm(2.23,1)	33714	9	638	[523-788]	646	[143-1149]
			k_e	$\log_{10}$-dnorm(1.36,1)			0.288	[0.016-0.956]	0	[0-5.5]
			$k_{m,1}$	$\log_{10}$-dunif(-5,2)			2.14	[1.63-2.71]	3.19	[0-6.7]
			$k_{emet,1}$	$\log_{10}$-dunif(-5,2)			0.975	[0.734-1.26]	2.03	[0-4.6]
		chlorpyrifos	k_w	$\log_{10}$ dunif(-2,5)	2000000	1000	15830	[3213-32680]	1499	[1072-1926]
			k_e	$\log_{10}$-dunif(-5,2)			49.8	[8.18-96.9]	0	[0-2.4]
			$k_{m,1}$	$\log_{10}$-dunif(-5,2)			2.13	[1.25-3.50]	3.50	[1.9-5.1]
			$k_{emet,1}$	$\log_{10}$-dunif(-5,2)			1.25	[0.744-2.01]	2.93	[1.5-4.4]
			$k_{m,2}$	$\log_{10}$-dunif(-5,2)			0.145	[0.091-0.220]	0.13	[0-0.4]
			$k_{emet,2}$	$\log_{10}$-dunif(-5,2)			0.411	[0.262-0.595]	0.30	[0-1.8]
		2,4-dichloro-aniline	k_w	$\log_{10}$-dnorm(2.12,0.89)	2000000	1000	1410	[357-4587]	293	[82-504]
			k_e	$\log_{10}$-dnorm(0.373,2.76)			49.5	[10.9-166]	8.23	[0.4-16.0]

Study	Specie	Chemical	Parameter (d^{-1})	Prior distribution	Iterations	Thin	Mean Bayesian value	95% CI Bayesian	Mean original value	original 95% CI
		2,4-dichloro-aniline	$k_{m,1}$	$\log_{10}$-dunif(-5,2)			1.02	[0.837-1.23]	0.95	[0.6-1.3]
			$k_{emet,1}$	$\log_{10}$-dunif(-5,2)			0.679	[0.587-0.784]	0.48	[0.05-0.90]
			$k_{m,2}$	$\log_{10}$-dunif(-5,2)			0.802	[0.662-1.02]	0.80	[0.2-1.4]
			$k_{emet,2}$	$\log_{10}$-dunif(-5,2)			1.08	[0.850-1.36]	1.07	[0-2.2]
		2,4-dichloro-phenol	k_w	$\log_{10}$-dunif(-10,2)	1000000	1000	611	[58.2-427]	723	[0-6343]
			k_e	$\log_{10}$-dunif(-10,2)			233	[0.0002-1699]	153	[0-1478]
			$k_{m,1}$	$\log_{10}$-dunif(-5,2)			39.5	[13.0-93.5]	19.6	[0-43]
			$k_{emet,1}$	$\log_{10}$-dunif(-5,2)			0.375	[0.301-0.461]	0.41	[0.34-0.49]
			$k_{m,2}$	$\log_{10}$-dunif(-5,2)			5.28	[1.39-15.0]	3.17	[0-8.2]
			$k_{emet,2}$	$\log_{10}$-dunif(-5,2)			0.607	[0.280-1.89]	0.91	[0-2.3]
		2,4,5-trichloro-phenol	k_w	$\log_{10}$-dunif(-10,5)	2000000	1000	3370	[1036-8001]	1389	[0-4073]
			k_e	$\log_{10}$-dunif(-10,2)			4.66	[2.29 10^{-10}-59.2]	0	[0-36]
			$k_{m,1}$	$\log_{10}$-dunif(-5,2)			15.4	[7.17-37.1]	14.5	[1.1-28.0]
			$k_{emet,1}$	$\log_{10}$-dunif(-5,2)			0.447	[0.289-0.713]	0.82	[0.42-1.23]
			$k_{m,2}$	$\log_{10}$-dunif(-5,2)			38.2	[3.11-93.8]	2.35	[0-9.7]
			$k_{emet,2}$	$\log_{10}$-dunif(-5,2)			27.4	[1.65-82.2]	1.78	[0-9]
		4-nitrobenzyl-chloride	k_w	$\log_{10}$-dnorm(2.76,0.371)	1000000	70	437	[334-595]	576	NA
			k_e	$\log_{10}$-dnorm (-0.494,2.92)			0.877	[0.024-5.17]	31.2	[0-90]
			$k_{m,1}$	$\log_{10}$-dunif(-5,2)			0.901	[0.643-1.25]	0.86	[0-4.2]

Study	Specie	Chemical	Parameter (d^{-1})	Prior distribution	Iterations	Thin	Mean Bayesian value	95% CI Bayesian	Mean original value	original 95% CI
		4-nitrobenzyl-chloride	$k_{emet,1}$	log_{10}-dunif(-5,2)			0.566	[0.410-0.741]	0.278	[0-3.4]
			$k_{m,2}$	log_{10}-dunif(-5,2)			43.9	[24.6-76.5]	42.5	[0-111]
			$k_{emet,2}$	log_{10}-dunif(-5,2)			4.62	[2.52-8.50]	4.13	[2.2-6.1]
			$k_{m,3}$	log_{10}-dunif(-5,2)			42.3	[30.8-58.5]	44.3	[0-115]
			$k_{emet,3}$	log_{10}-dunif(-5,2)			2.46	[1.91-3.13]	2.46	[1.8-3.2]
		sea-nine	k_w	log_{10}-dnorm(0.288,1)	104888	28	361	[294-494]	345	[295-395]
			k_e	log_{10}-dnorm(0.049,1)			0.272	[0.005-1.22]	0	[0-1.1]
			$k_{m,1}$	log_{10}-dunif(-5,2)			0.311	[0.145-0.586]	0.349	[0-1.2]
			$k_{emet,1}$	log_{10}-dunif(-5,2)			1.56	[0.725-3.24]	2.7	[0-9.8]
		sea-nine	$k_{m,2}$	log_{10}-dunif(-5,2)	104888	28	0.587	[0.430-0.765]	0.623	[0.5-0.8]
			$k_{emet,2}$	log_{10}-dunif(-5,2)			0.457	[0.355-0.572]	0.536	[0.34-0.73]
			$k_{m,3}$	log_{10}-dunif(-5,2)			0.267	[0.156-0.434]	0.299	[0-0.9]
			$k_{emet,3}$	log_{10}-dunif(-5,2)			1.24	[0.719-2.15]	2.18	[0-7.4]
Fu, 2018	*Gammarus pulex*	Prochloraz	k_w	log_{10}-dunif(-5,2)	86158	23	0.979	[0.831-1.15]	416	[342-497]
			k_e	log_{10}-dunif(-5,2)			7.40	[6.02-8.97]	6.9	[5.2-8.7]
			$k_{m,1}$	log_{10}-dunif(-5,2)			0.146	[0.117-0.183]	1.5	[1.1-2.1]
			$k_{emet,1}$	log_{10}-dunif(-5,2)			1.92	[1.49-2.47]	0.001	[0.001-43]
			$k_{m,2}$	log_{10}-dunif(-5,2)			1.31	[1.10-1.55]	25	[18-43]
			$k_{emet,2}$	log_{10}-dunif(-5,2)			2.06	[1.71-2.48]	2.6	[1.8-3.8]

Study	Specie	Chemical	Parameter (d^{-1})	Prior distribution	Iterations	Thin	Mean Bayesian value	95% CI Bayesian	Mean original value	original 95% CI
		Azoxistrobin	k_w	log_{10}-dunif(-5,2)	86158	23	0.107	[0.080-0.140]	43	[32-53]
			k_e	log_{10}-dunif(-5,2)			10.7	[7.55-14.5]	7.8	[5.5-10]
			$k_{m,1}$	log_{10}-dunif(-5,2)			0.573	[0.459-0.711]	0.9	[0.7-11]
			$k_{emet,1}$	log_{10}-dunif(-5,2)			1.68	[1.30-2.15]	0.0001	[0.0001-0.7]
			$k_{m,2}$	log_{10}-dunif(-5,2)			0.879	[0.710-1.09]	3.1	[2.3-4.1]
			$k_{emet,2}$	log_{10}-dunif(-5,2)			1.23	[0.939-1.59]	1.2	[0.7-1.2]
	Hyallela azteca	Prochloraz	k_w	log_{10}-dunif(-5,2)	86158	23	1.12	[0.952-1.31]	550	[468-640]
			k_e	log_{10}-dunif(-5,2)			3.33	[2.70-4.06]	3.1	[2.5-3.8]
			$k_{m,1}$	log_{10}-dunif(-5,2)			0.070	[0.059-0.082]	1.6	[0.5-4.4]
			$k_{emet,1}$	log_{10}-dunif(-5,2)			0.805	[0.650-1.00]	0.4	[0.001-16]
			$k_{m,2}$	log_{10}-dunif(-5,2)			0.579	[0.508-0.657]	15	[11.8-18.0]
			$k_{emet,2}$	log_{10}-dunif(-5,2)			0.762	[0.650-0.893]	0.8	[0.6-1.0]
		Azoxistrobin	k_w	log_{10}-dunif(-5,2)	119872	82	0.045	[0.029-0.067]	11	[9.0-12.0]
			k_e	log_{10}-dunif(-5,2)			2.31	[0.532-4.40]	0.13	[0.0001-0.8]
			$k_{m,1}$	log_{10}-dunif(-5,2)			0.456	[0.362-0.580]	1.8	[1.4-2.1]
			$k_{emet,1}$	log_{10}-dunif(-5,2)			1.55	[1.22-1.97]	0.0001	[0.0001-4.9]
			$k_{m,2}$	log_{10}-dunif(-5,2)			1.07	[0.884-1.31]	8.6	[7.6-11.0]
			$k_{emet,2}$	log_{10}-dunif(-5,2)			0.820	[0.688-0.990]	1.9	[1.5-2.5]

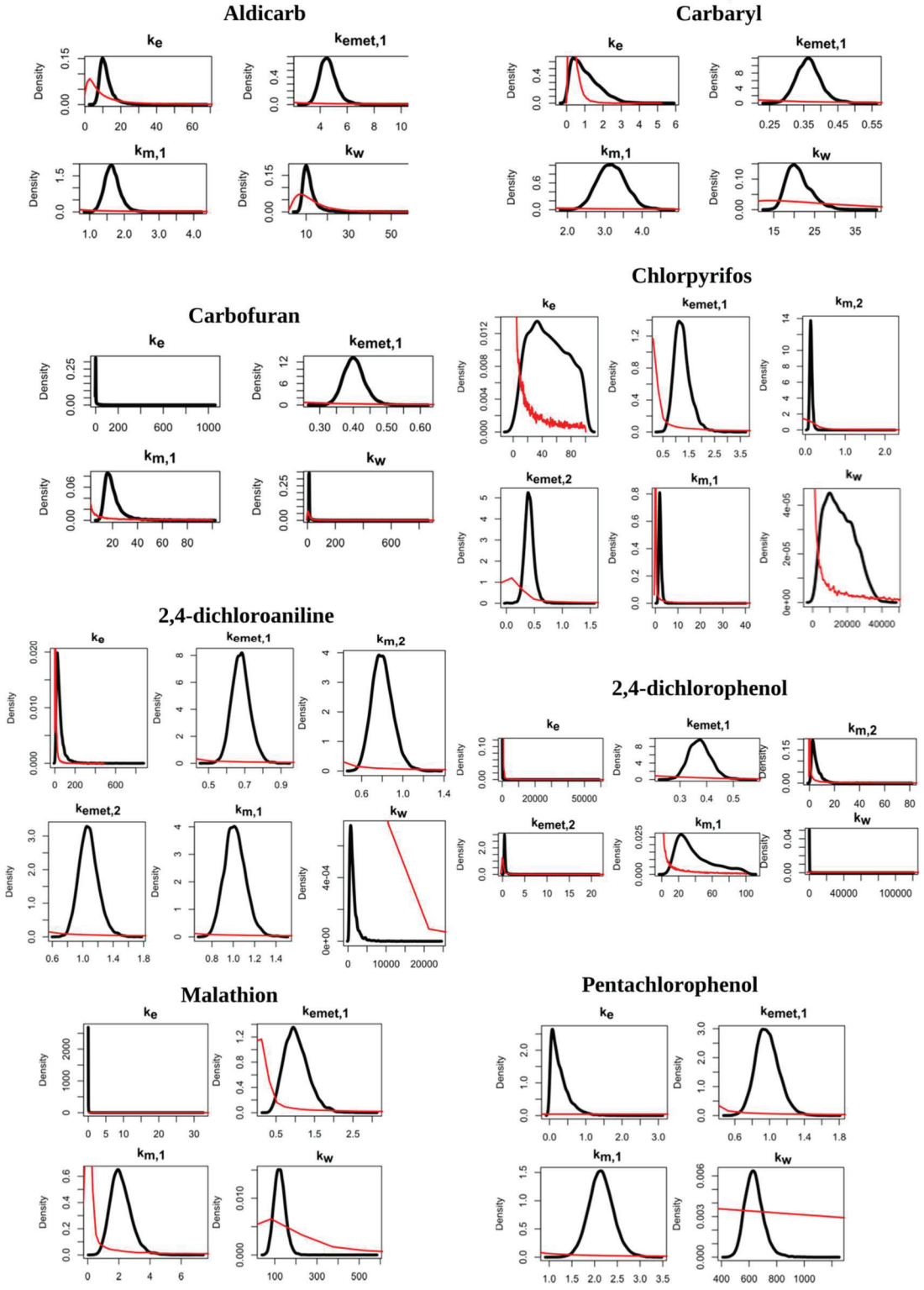
Study	Specie	Chemical	Parameter (d^{-1})	Prior distribution	Iterations	Thin	Mean Bayesian value	95% CI Bayesian	Mean original value	original 95% CI
Miller, 2017	*Gammarus pulex*	Propranolol	k_w	$\log_{10}$-dnorm(0.995,2.76)	2000000	1000	20.4	[1.37-103]	6,56	[0.763-12.4]
			k_e	$\log_{10}$-dnorm (-0.824,0.291)			68.3	[3.91-350]	0,2348	[0.014-0.456]
			$k_{m,1}$	$\log_{10}$-dunif(-5,2)			0.204	[0.086-0323]	NA	NA
			$k_{emet,1}$	$\log_{10}$-dunif(-5,2)			0.283	[0.001-0.439]	NA	NA
		Diazepam	k_w	$\log_{10}$-dunif(-5,2)	5000000	10000	2.23	[1.17-4.17]	9.5942	[7.47-11.7]
			k_e	$\log_{10}$-dunif(-5,2)			1.33	[1.67 10^{-5}-5.29]	0.2349	[0.177-0.293]
			$k_{m,1}$	$\log_{10}$-dunif(-5,2)			2.44	[1.11-5.93]	NA	NA
			$k_{emet,1}$	$\log_{10}$-dunif(-5,2)			1.60	[0.490-5.00]	0.0194	NA
			$k_{m,2}$	$\log_{10}$-dunif(-5,2)			0.485	[0.072-3.19]	NA	NA
			$k_{emet,2}$	$\log_{10}$-dunif(-5,2)			5.04	[0.494-41.1]	0.016	NA
			$k_{m,3}$	$\log_{10}$-dunif(-5,2)			0.564	[0.094-1.13]	NA	NA
			$k_{emet,3}$	$\log_{10}$-dunif(-5,2)			0.383	[2.59 10^{-5}-0.846]	0.009	NA
Carrasco-Navarro, 2015	*Gammarus setosus*	Pyrene	k_w	$\log_{10}$-dunif(-5,5)	247236	66	673	[559-857]	691	[516-867]
			k_e	$\log_{10}$-dunif(-5,5)			0.040	[1.25 10^{-5}-0.362]	0.048	[-0.192-0.288]
			$k_{m,1}$	$\log_{10}$-dunif(-5,5)			1.04	[0.818-1.33]	0.624	[0.504-0.744]
			$k_{emet,1}$	$\log_{10}$-dunif(-5,5)			0.064	[0.030-0.095]	-0.001	[-0.028-0.025]
Giessing, 2003	*Nereis diversicolor*	Pyrene	k_s	$\log_{10}$-dunif(-3,2)	1000000	2000	1.40	[0.380-13.1]	NA	NA
			k_e	$\log_{10}$-dunif(-3,2)			3.79	[0.962-36.6]	NA	NA
			$k_{m,1}$	$\log_{10}$-dunif(-3,2)			0.050	[0.031-0.073]	NA	NA
			$k_{emet,1}$	$\log_{10}$-dunif(-3,2)			0.149	[0.004-0.307]	NA	NA

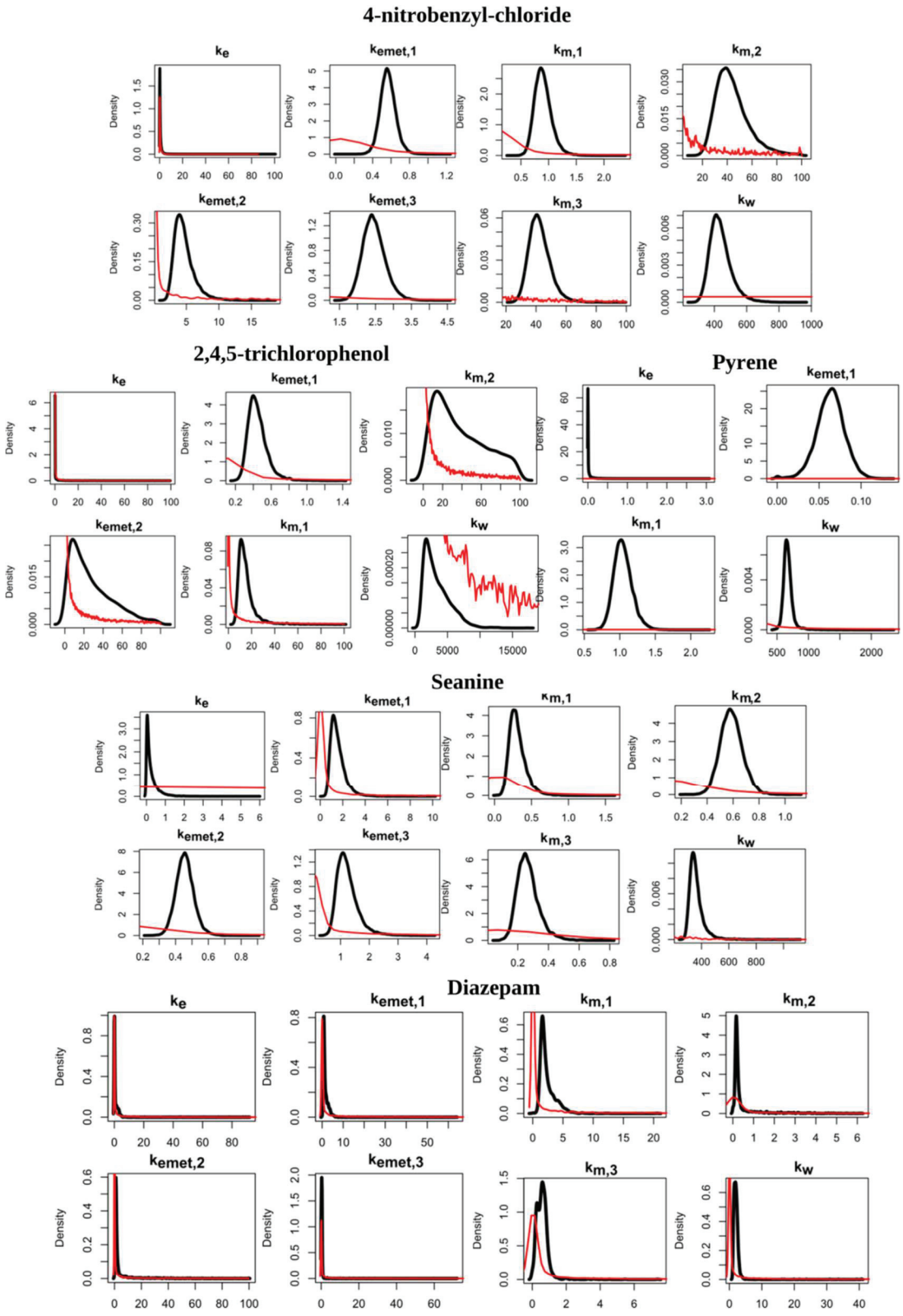
Study	Specie	Chemical	Parameter (d^{-1})	Prior distribution	Iterations	Thin	Mean Bayesian value	95% CI Bayesian	Mean original value	original 95% CI
Maenpaa, 2009	*Lumbriculus variegatus*	Pyrene	k_w	$\log_{10}$-dunif(-5,5)	1500000	1000	7921	[1238-68821]	6720	[4920-8520]
			k_e	$\log_{10}$-dunif(-5,2)			2.76	[1.68 10^{-5}-29.3]	9.7	[9.36-10.3]
			$k_{m,1}$	$\log_{10}$-dunif(-5,5)			0.263	[0.0150-1.54]	NA	NA
			$k_{emet,1}$	$\log_{10}$-dunif(-5,2)			46.8	[1.06-96.0]	NA	NA
Schuler, 2003	*Lumbriculus variegatus*	Benzo-a-Pyrene	k_s	$\log_{10}$-dunif(-5,2)	101142	27	0.214	[0.161-0.278]	0,24	[0.240-0.2402]
			k_e	$\log_{10}$-dunif(-5,2)			0.167	[0.098-0.247]	0,216	[0.196-0.236]
			$k_{m,1}$	$\log_{10}$-dunif(-5,2)			0.038	[0.027-0.048]	0,024	[0.008-0.040]
			$k_{emet,1}$	$\log_{10}$-dunif(-5,2)			0.036	[0.012-0.057]	NA	NA
Schuler, 2003	*Chironomus tentans*	Benzo-a-Pyrene	k_s	$\log_{10}$-dunif(-5,2)	200000	27	0.746	[0.490-1.07]	0.552	[0.468-0.636]
			k_e	$\log_{10}$-dunif(-5,2)			2.26	[0.739-4.14]	1.152	[0,432-1,87]
			$k_{m,1}$	$\log_{10}$-dunif(-5,2)			1.66	[1.38-2.01]	2.304	[2.04-2.57]
			$k_{emet,1}$	$\log_{10}$-dunif(-5,2)			0.759	[0.646-0.885]	NA	NA

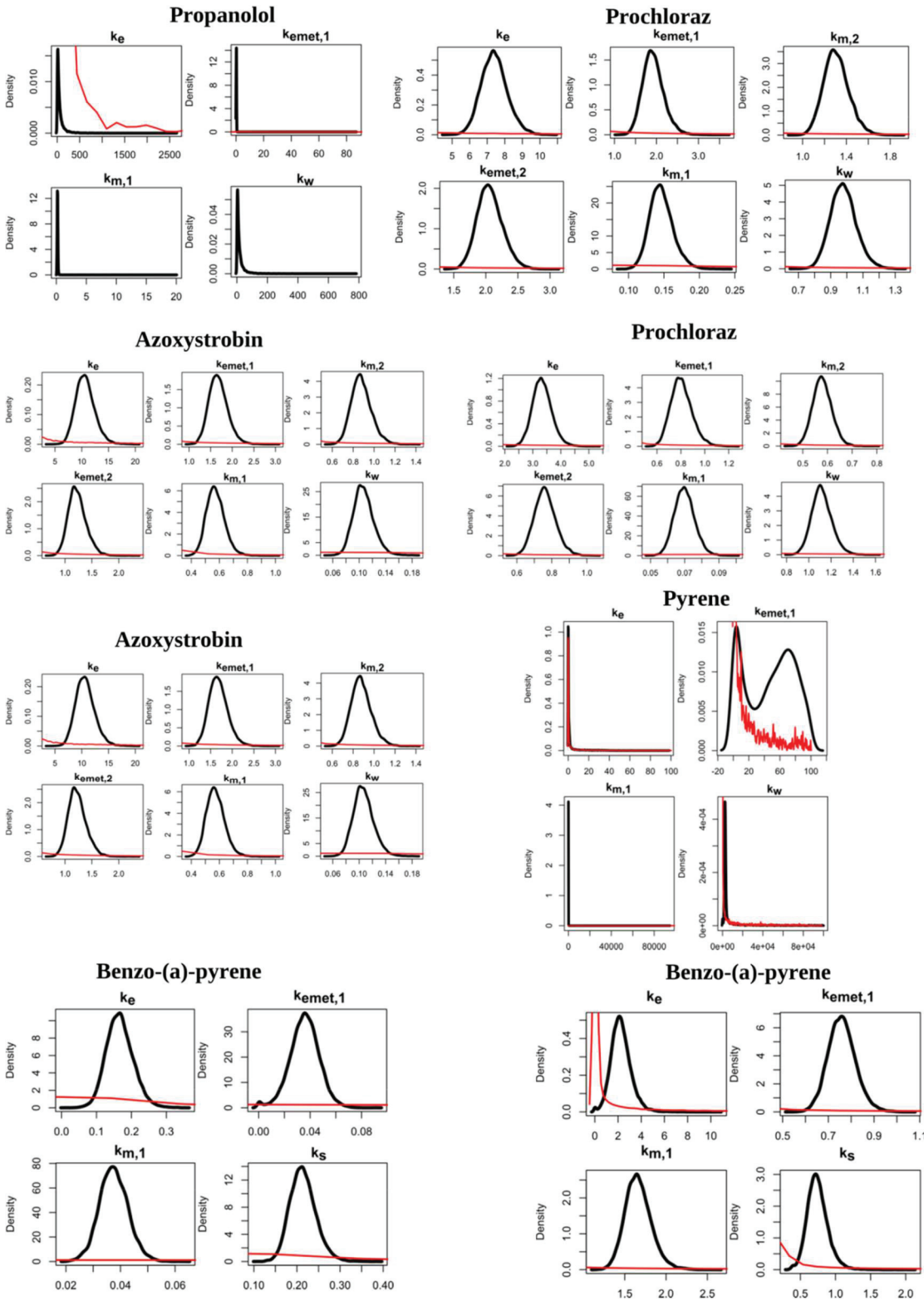
ANNEX S2 - R codes (R software (version 3.3.3 2017-03-06))

R Codes and corresponding .csv data files are available and free download on DOI.

FIGURE S2 – Prior and Posterior distributions for each model parameter.




4-nitrobenzyl-chloride
ke
kemet,1
km,1
km,2
kemet,2
kemet,3
km,3
kw
2,4,5-trichlorophenol
Pyrene
Seanine
Diazepam
Density


Propanolol
Prochloraz
Azoxystrobin
Prochloraz
Azoxystrobin
Pyrene
Benzo-(a)-pyrene
Benzo-(a)-pyrene

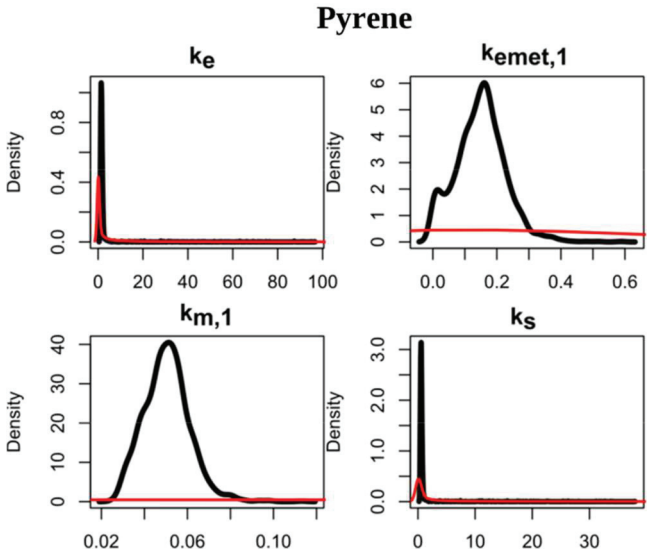
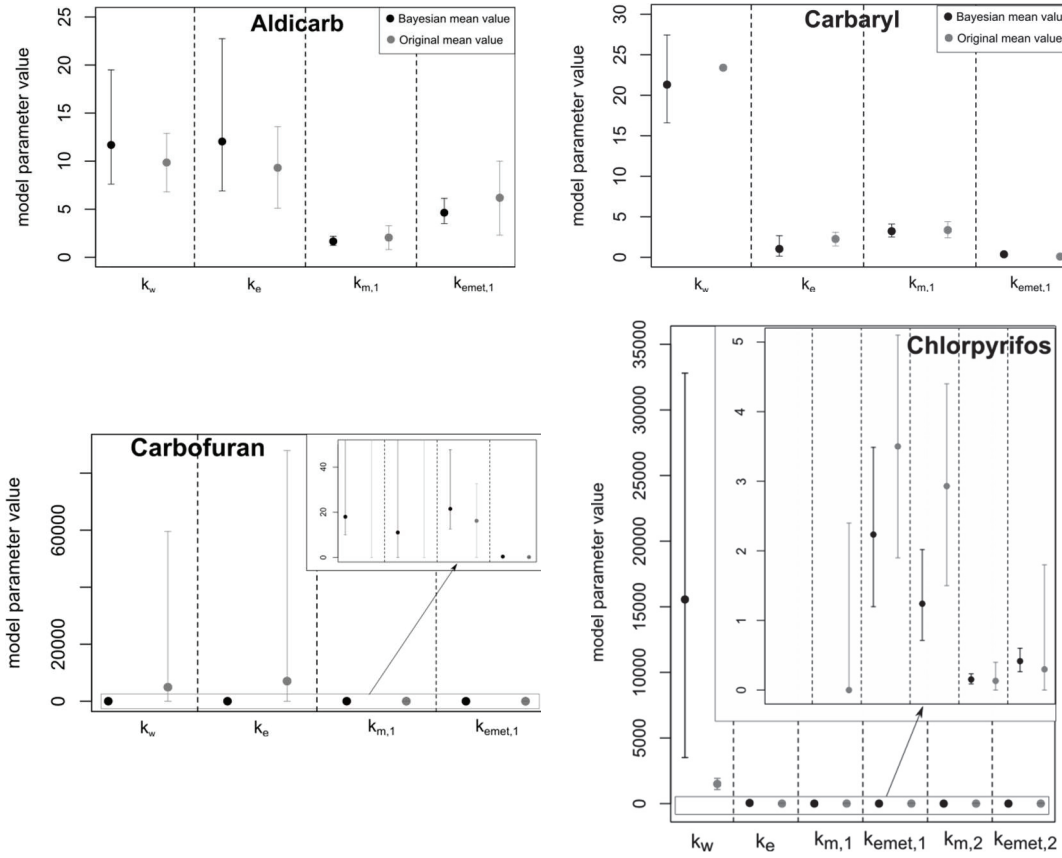
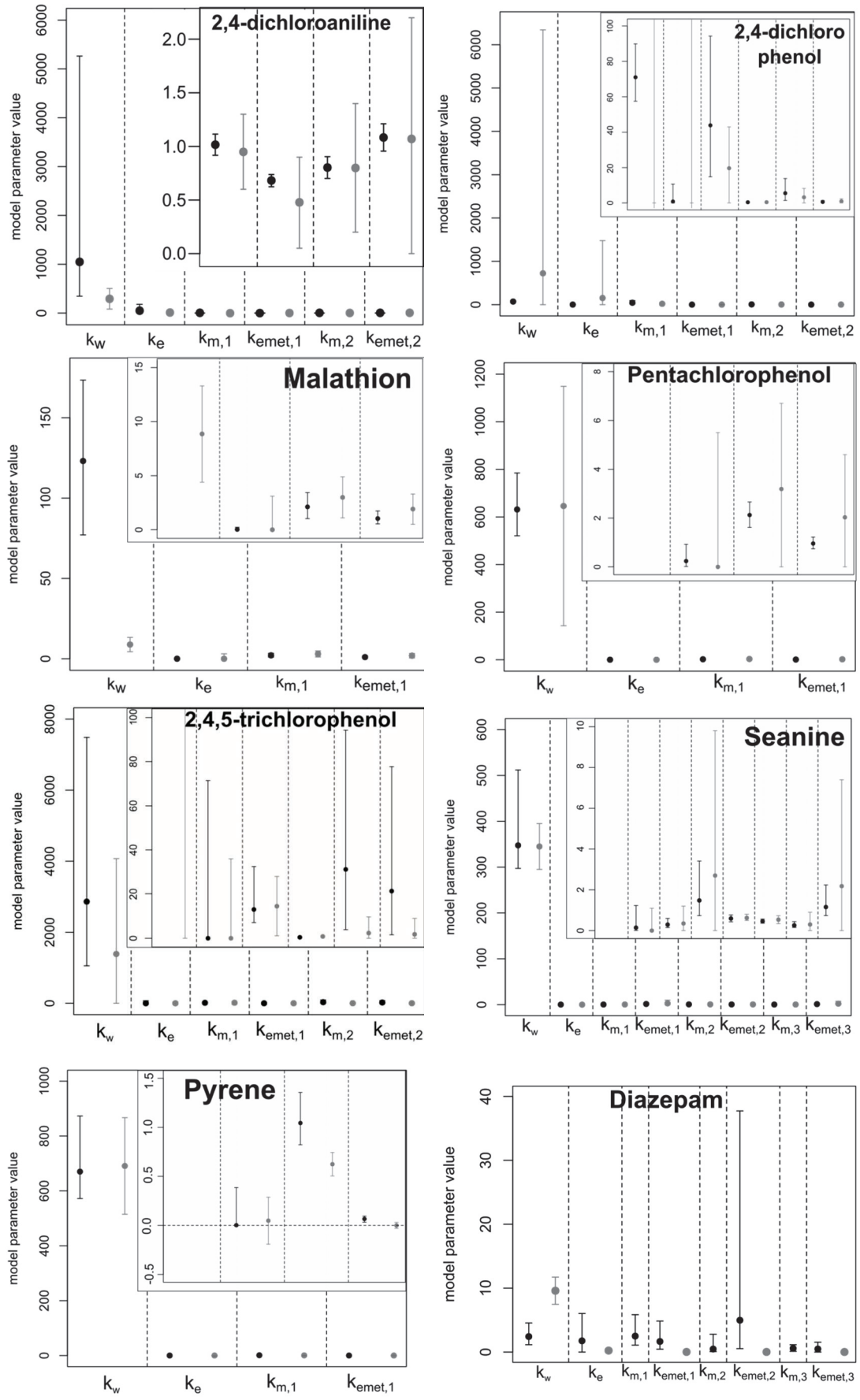
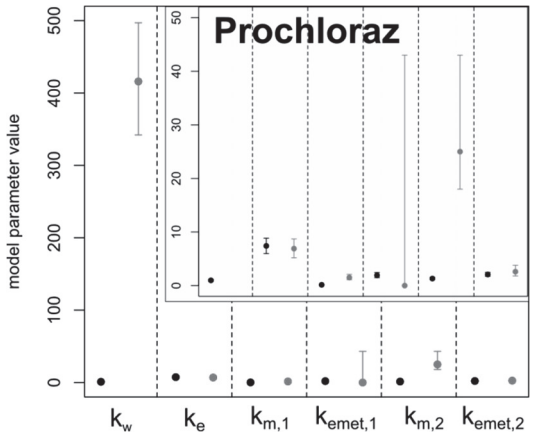
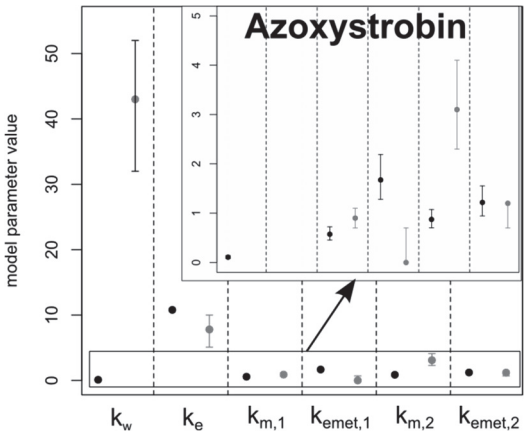


FIGURE S3 – Model parameters estimated by Bayesian inference (black) and in the original study (grey). Dots represent mean values and error bars the 95% credibility (Bayesian inference) or confidence (original studies) intervals.




2,4-dichloroaniline
2,4-dichloro phenol
Malathion
Pentachlorophenol
2,4,5-trichlorophenol
Seanine
Pyrene
Diazepam
model parameter value
kw
ke
km,1
kemet,1
km,2
kemet,2
km,3
kemet,3


Prochloraz
model parameter value
0
100
200
300
400
500
0
10
20
30
40
50
k_w
k_e
$k_{m,1}$
$k_{emet,1}$
$k_{m,2}$
$k_{emet,2}$


Azoxystrobin
model parameter value
0
10
20
30
40
50
0
1
2
3
4
5
k_w
k_e
$k_{m,1}$
$k_{emet,1}$
$k_{m,2}$
$k_{emet,2}$

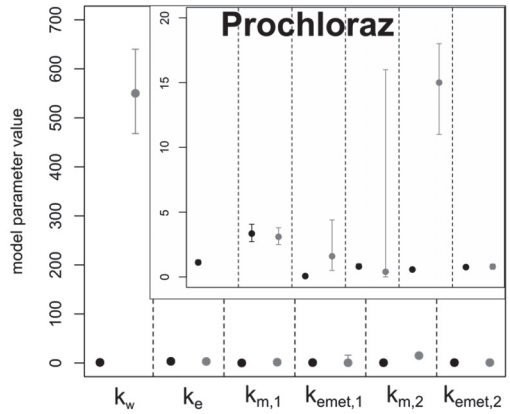
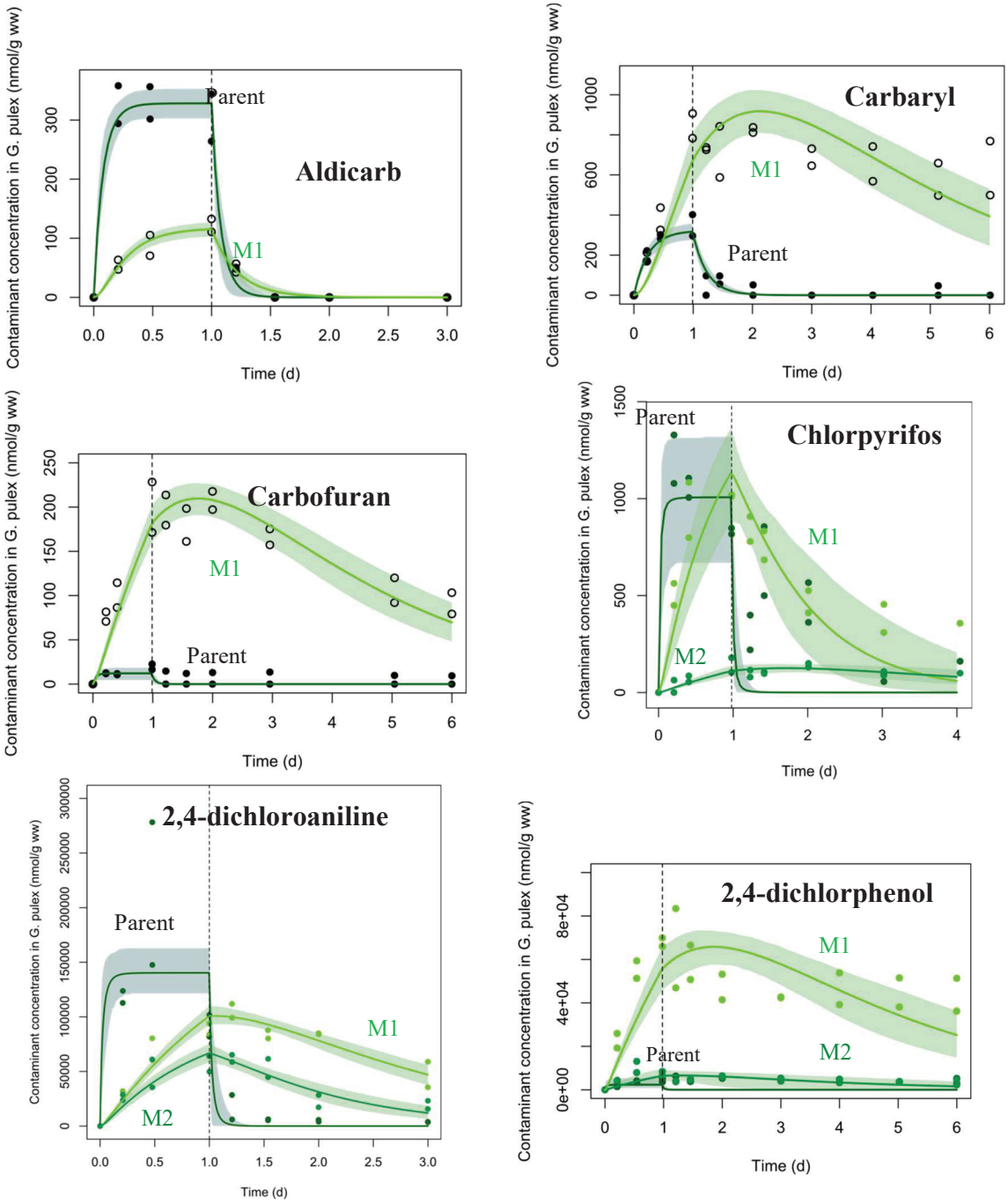
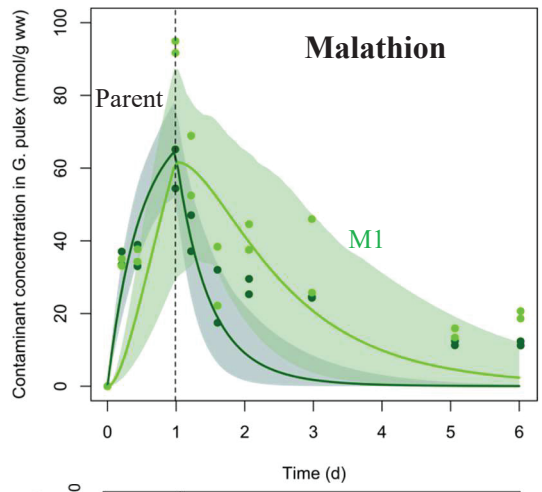
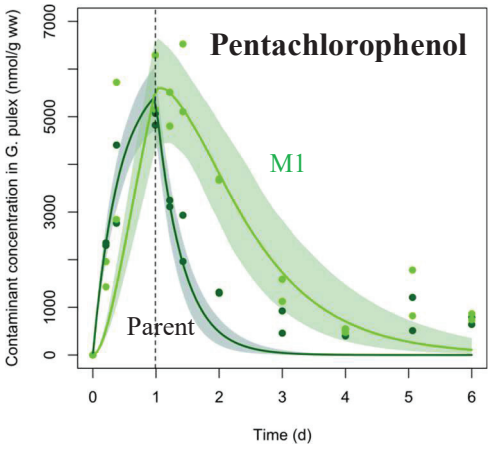
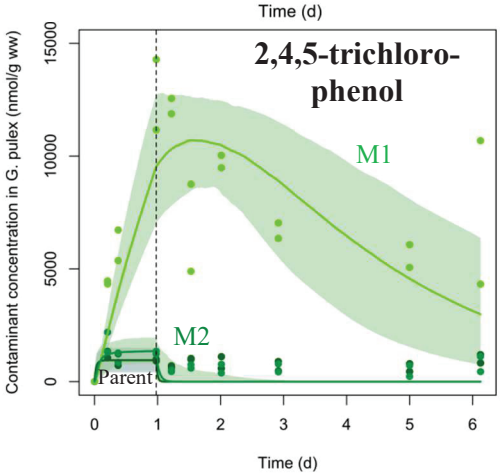

Prochloraz
model parameter value
0
100
200
300
400
500
600
700
0
5
10
15
20
k_w
k_e
$k_{m,1}$
$k_{emet,1}$
$k_{m,2}$
$k_{emet,2}$

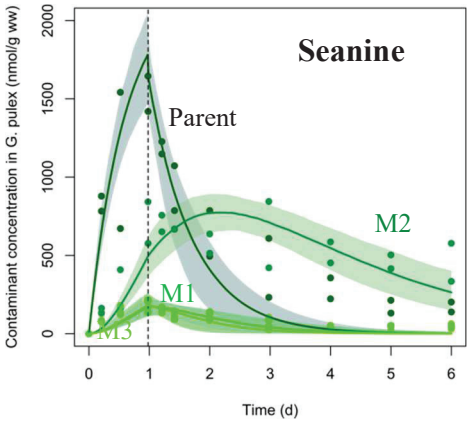
FIGURE S4 – Observed data (dots) and model predictions (solid and coloured area) for each contaminant and its metabolite(s) (Eqs. (6) and (7)) according time (days). The exposure and elimination phases are separated with the black dashed vertical line.

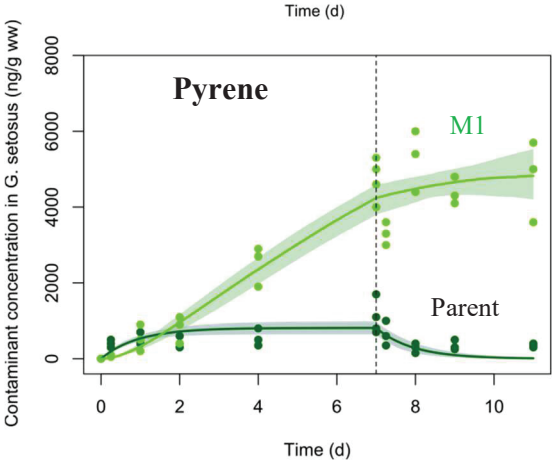


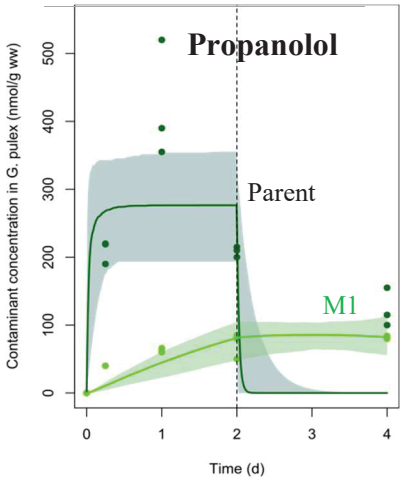

Malathion
Parent
M1
Contaminant concentration in G. pulex (nmol/g ww)
Time (d)


Pentachlorophenol
M1
Parent
Contaminant concentration in G. pulex (nmol/g ww)
Time (d)


2,4,5-trichloro-
phenol
M1
M2
Parent
Contaminant concentration in G. pulex (nmol/g ww)
Time (d)


Seanine
Parent
M2
M1
M3
Contaminant concentration in G. pulex (nmol/g ww)
Time (d)


Pyrene
M1
Parent
Contaminant concentration in G. setosus (ng/g ww)
Time (d)


Propanolol
Parent
M1
Contaminant concentration in G. pulex (nmol/g ww)
Time (d)

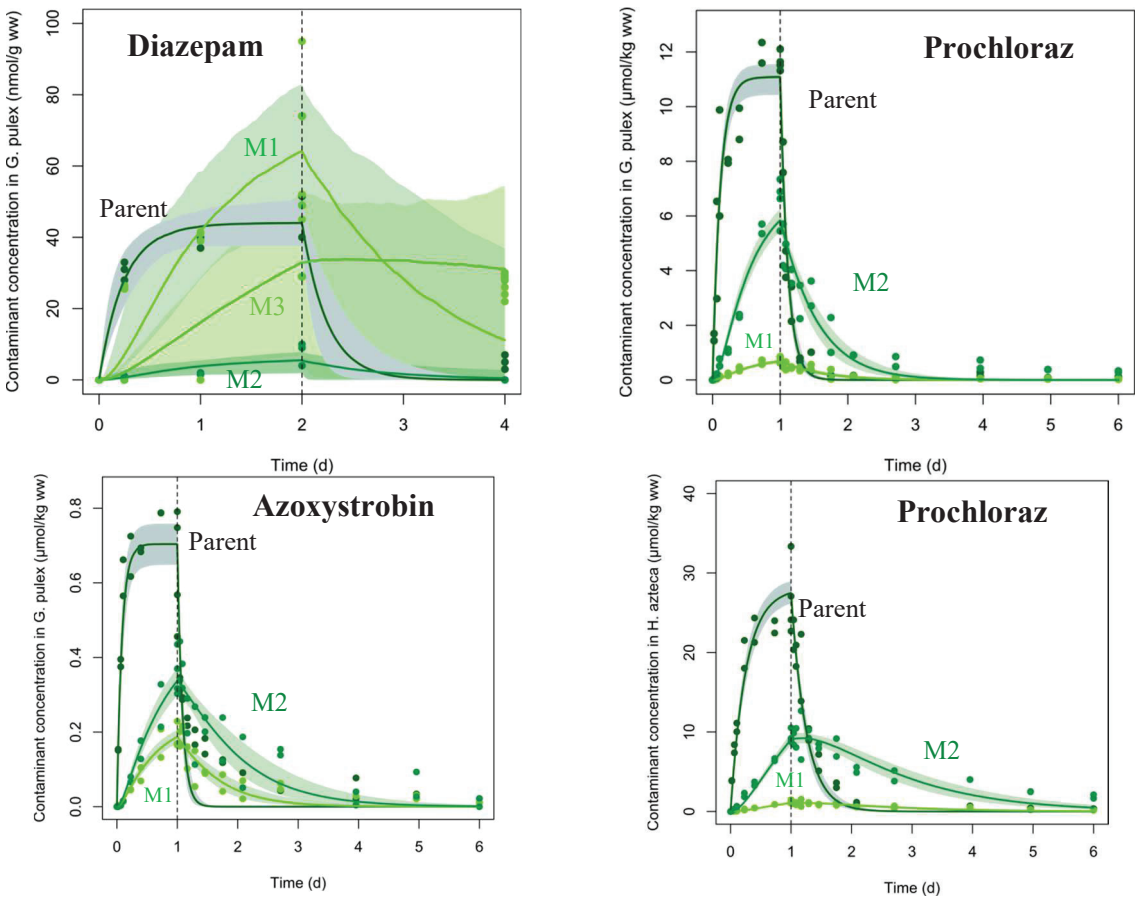
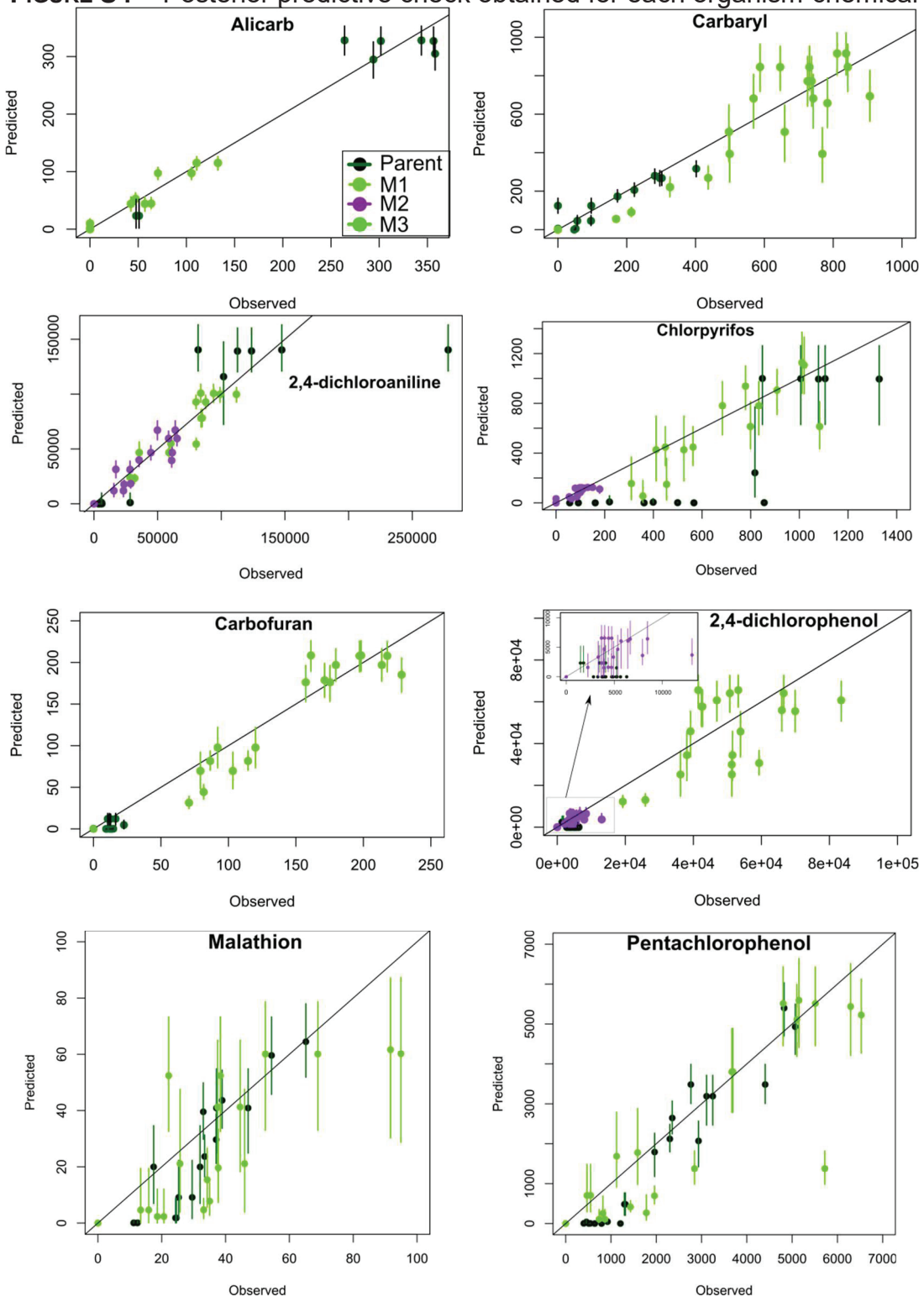
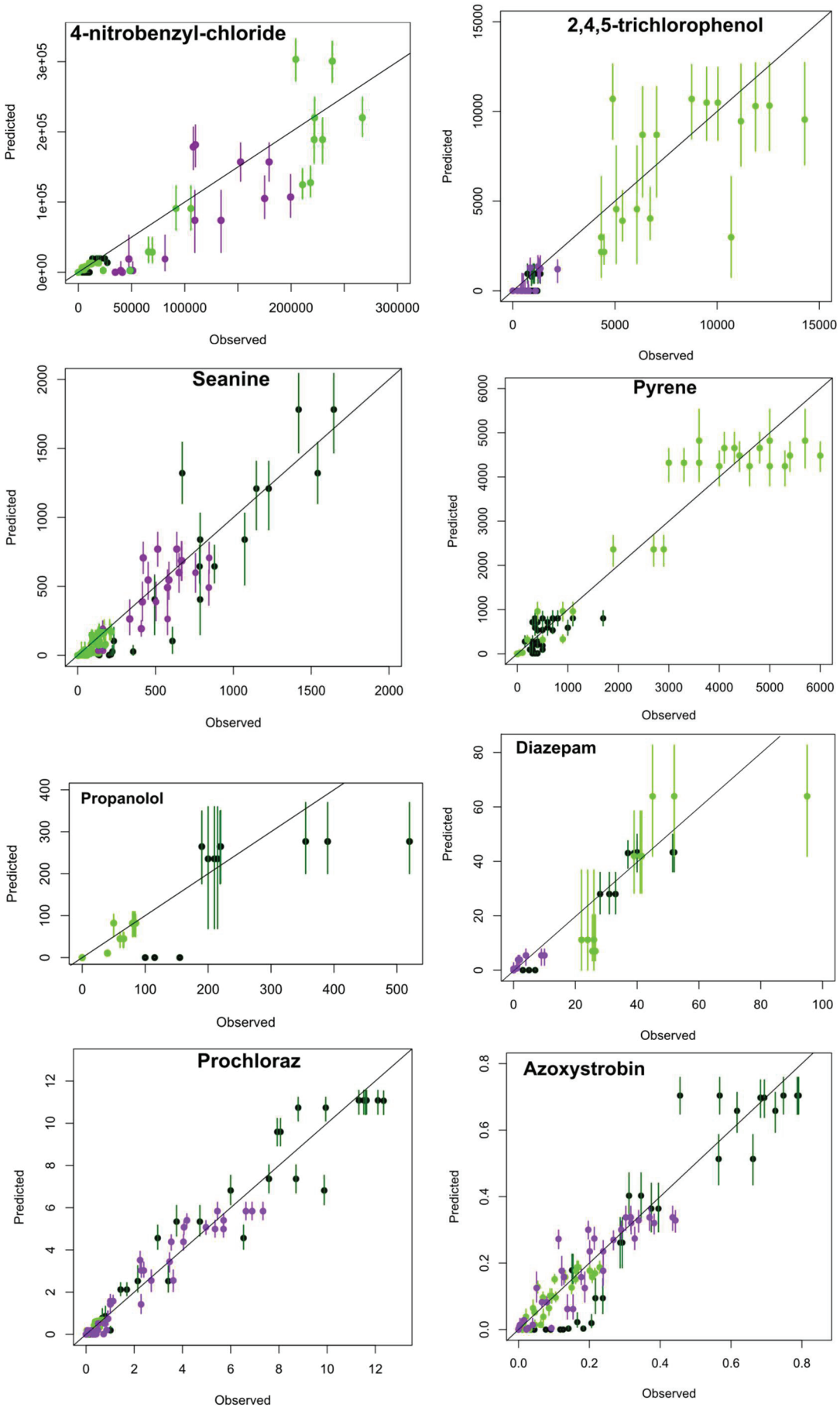
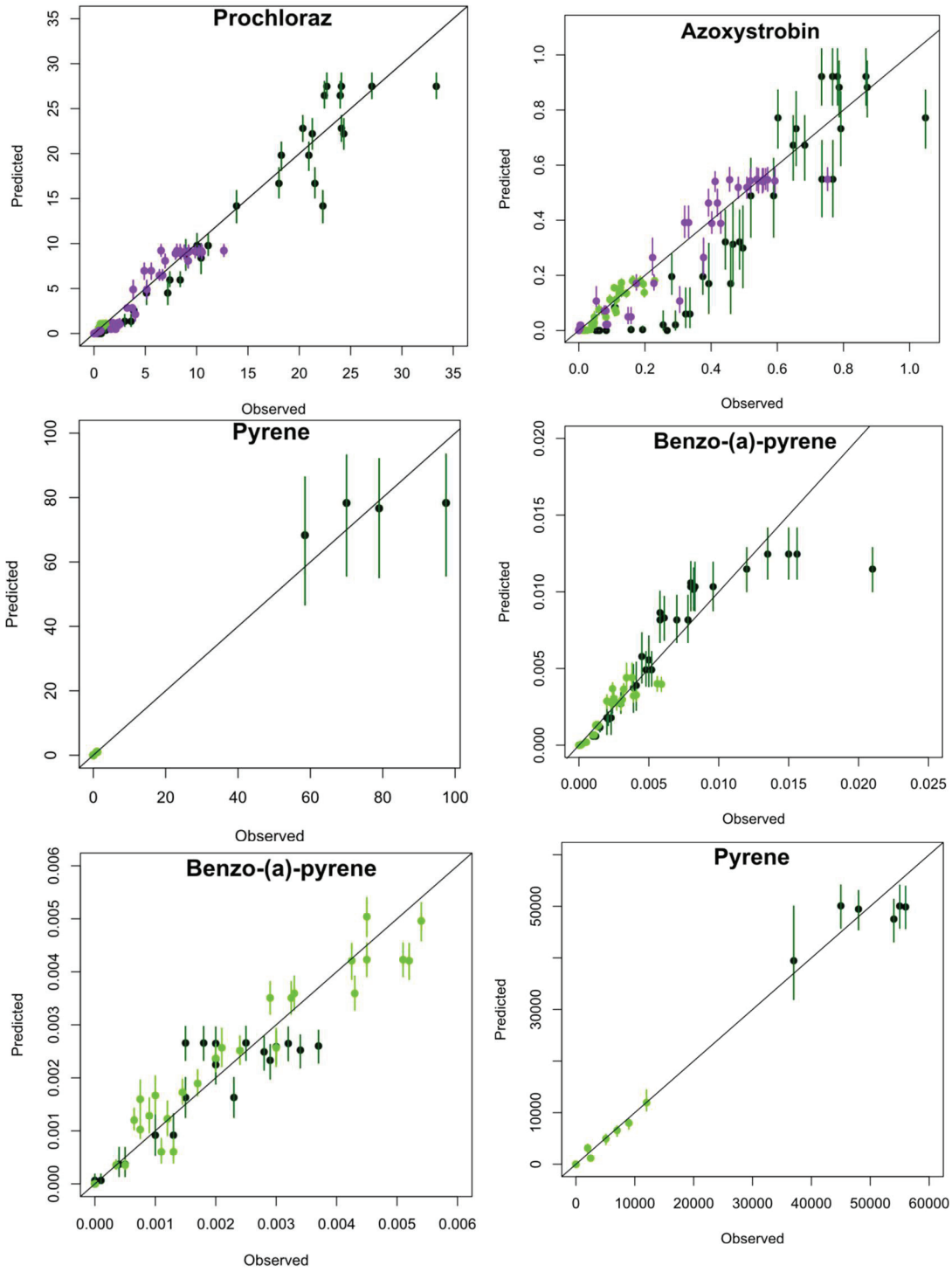

Diazepam
Parent
M1
M3
M2
Contaminant concentration in G. pulex (nmol/g ww)
Time (d)
Prochloraz
Parent
M2
M1
Contaminant concentration in G. pulex (µmol/kg ww)
Time (d)
Azoxystrobin
Parent
M2
M1
Contaminant concentration in G. pulex (µmol/kg ww)
Time (d)
Prochloraz
Parent
M2
M1
Contaminant concentration in H. azteca (µmol/kg ww)
Time (d)

FIGURE S4 – Posterior predictive check obtained for each organism-chemical couple.




4-nitrobenzyl-chloride
Predicted
Observed
0e+00
1e+05
2e+05
3e+05
0
50000
100000
200000
300000
2,4,5-trichlorophenol
0
5000
10000
15000
Seanine
0
500
1000
1500
2000
Pyrene
0
1000
2000
3000
4000
5000
6000
Propanolol
0
100
200
300
400
500
Diazepam
0
20
40
60
80
100
Prochloraz
0
2
4
6
8
10
12
Azoxystrobin
0.0
0.2
0.4
0.6
0.8


Prochloraz
Predicted
Observed
Azoxystrobin
Predicted
Observed
Pyrene
Predicted
Observed
Benzo-(a)-pyrene
Predicted
Observed
Benzo-(a)-pyrene
Predicted
Observed
Pyrene
Predicted
Observed

4.4 NOTE 2 : *GAMMARUS FOSSARUM* EXPOSE AU PYRENE

4.4.1 Introduction

La biotransformation des HAP a pu être mise en évidence chez différentes espèces d'invertébrés benthiques, comme chez les polychètes, les bivalves (Rust *et al.* 2004) ou encore chez des crustacés amphipodes (Carrasco-Navarro *et al.* 2015 ; Rust *et al.* 2004). En particulier, le pyrène est transformé en un métabolite principal, le 1-hydroxy-pyrène (noté 1-OH-pyrène par la suite), comme il l'a été montré par l'étude de Carrasco-Navarro *et al.* (2015). L'objectif de cette note est d'évaluer les capacités de *G. fossarum* à métaboliser un HAP, le pyrène. Pour cela, *G. fossarum* a été exposé au laboratoire à des feuilles contaminées ou à du sédiment contaminé. Par la suite, le modèle générique prenant en compte la biotransformation et son cadre d'inférence a été appliqué à ces données afin d'estimer les paramètres du modèle, en particulier le taux de biotransformation.

4.4.2 Matériels et méthodes

Design expérimental

Le design expérimental complet a été décrit précédemment (Chapitre 2) incluant le dopage du sédiment (section 2.2.1), le prélèvement des organismes (section 2.3.2), l'exposition des gammares au pyrène (section 2.4) ainsi que les dosages chimiques (section 2.6). Brièvement, les gammares ont été exposés à des feuilles contaminées (E1) ou à du sédiment contaminé (E2) en pyrène à une concentration nominale de 80 ng g^{-1} ps pendant 7 jours (Figure B.2, Annexe B). Par la suite, ils ont été transférés en milieu non contaminé pendant 7 autres jours. Le test a été réalisé à 12 ± 0,4 °C avec une photopériode de 16 : 8 h. La survie des organismes est mesurée à la fin de la période d'exposition et à la fin de la période de dépuration. Des échantillons d'eau, de sédiment, de feuilles et d'organismes ont été prélevés aux jours 0, 0,25, 1, 2, 4, 7, 8, 9, 11, et 14. Les échantillons sont ensuite stockés à - 20 °C avant les analyses.

Modélisation et inférence

Le modèle a été ajusté simultanément à l'ensemble des données disponibles, c'est-à-dire les concentrations en pyrène et son métabolite dans les phases d'exposition et de dépuration, dans les deux conditions expérimentales E1 et E2, par inférence Bayésienne. La voie trophique (i.e. feuilles, sédiment) a été considérée comme la seule voie d'exposition du fait des propriétés physico-chimiques du pyrène, alors que l'élimination a lieu uniquement par excrétion et biotransformation. Pour les conditions E1 et E2, les équations (18) et (19)

peuvent donc être réécrites comme suit (Eqs. (25) et (26)) :

$$\begin{cases} \frac{dC_{E1}(t)}{dt} = k_l \times C_{l,E1} - (k_e + k_m) \times C_{E1}(t) \\ \frac{dC_{met,E1}(t)}{dt} = k_m \times C_{E1}(t) - k_{emet} \times C_{met,E1}(t) \end{cases} \quad \text{pour } 0 < t < t_c \qquad (25)$$

$$\begin{cases} \frac{dC_{E2}(t)}{dt} = k_s \times C_s - (k_e + k_m) \times C_{E2}(t) \\ \frac{dC_{met,E2}(t)}{dt} = k_m \times C_{E2}(t) - k_{emet} \times C_{met,E2}(t) \end{cases} \quad \text{pour } 0 < t < t_c \qquad (26)$$

avec $C_{E1}(t)$ la concentration en pyrène dans les organismes de la condition E1 au temps t, $C_{E2}(t)$ la concentration en pyrène dans les organismes de la condition E2 au temps t, $C_{met,E1}(t)$ la concentration en 1-OH-pyrène dans les organismes de la condition E1 au temps t et $C_{met,E2}(t)$ la concentration en 1-OH-pyrène dans les organismes de la condition E2 au temps t.

Les distributions *a priori* pour les paramètres (k_s, k_l, k_e, k_m, k_{emet}) ont été définies suivant une loi uniforme : $\log10(\theta) \sim U(-5,2)$. Les concentrations observées en pyrène et son métabolite dans le gammare au temps t pendant l'expérience suivent une loi normale (Eqs. (20) et (21)).

4.4.3 Résultats et discussion

Survie

La survie des gammares est de 86 et 88 % pour la période d'exposition dans les conditions E1 et E2 respectivement, et de 90 et 85 % en période de dépuration. Les témoins ont une survie de 89 et 86 % pour les périodes d'expositions et de dépuration respectivement (condition E1), et de 83 et 79 % (condition E2).

Niveaux de concentration

Dans les échantillons d'eau, la concentration en pyrène est en dessous de la limite de quantification (Annexe C) dans les deux conditions testées. La concentration dans le sédiment pendant la phase d'exposition est variable, avec une moyenne égale à 88 ± 57 ng g^{-1} ps. Dans le sédiment témoin, la concentration en pyrène est inférieure à la limite de quantification (Annexe C).

Les feuilles témoin ont une concentration moyenne en pyrène de 29 ± 5,0 ng g^{-1} ps. La concentration dans les feuilles contaminées de la condition E1 est de 203 ± 40 ng g^{-1} ps. Dans la condition E2 (sédiment contaminé), la concentration en pyrène dans les feuilles augmente jusqu'à 140 ng g^{-1} ps à la fin de la période d'exposition.

La concentration en pyrène dans les gammares exposés varie de 7,71 à 8,61 (E1) et 9,10 (E2) ng g^{-1} pf du début de l'expérience jusqu'à la fin de la période d'exposition, et

diminue jusqu'à < LoD et 5,9 ng g^{-1} pf en phase de dépuration respectivement pour les conditions E1 et E2 (**Figure 43**). Les gammares témoins présentent des concentrations en pyrène de 7,71, 5,88 et 7,65 ± 0,38 ng g^{-1} pf à J0, J7 et J14 respectivement, qui sont similaires à celles mesurées dans les organismes exposés. De plus, les gammares témoins ont des teneurs supérieures au bruit de fond national du pyrène, qui a été défini par les concentrations mesurées dans les gammares encagés sur 165 sites *a priori* non impactés (Alric *et al.* 2019). En effet, les gammares témoins de cette expérience présentent une concentration moyenne en poids sec de 52,3 ± 6,98 ng g^{-1} ps contre 10,5 (min : 1,59 - max : 47,8) ng g^{-1} ps pour les gammares encagés.

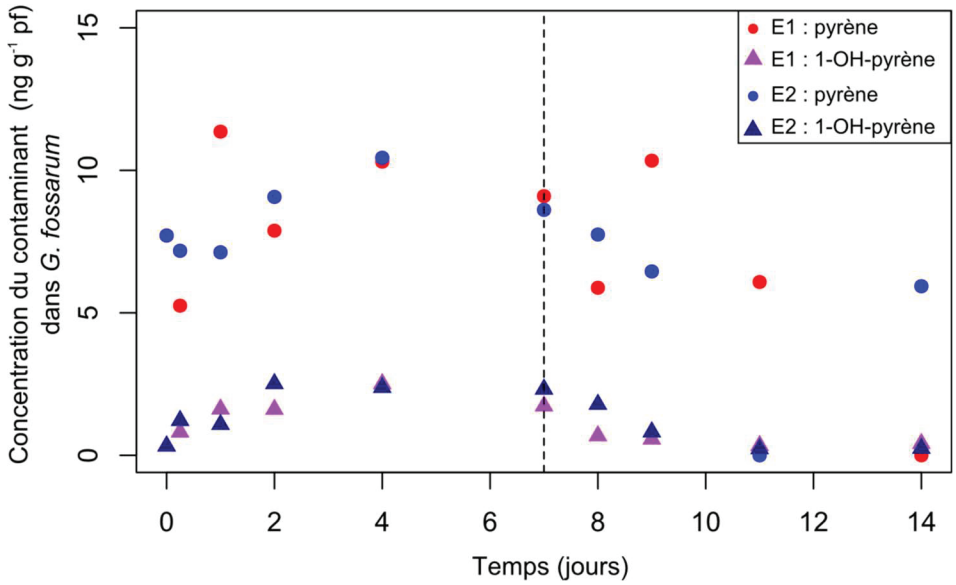


Figure 43. Niveaux de concentrations (ng g^{-1} pf) en pyrène (points) et son métabolite (1-OH-pyrène, triangles) mesurés dans *G. fossarum* pour les conditions E1 et E2. Chaque point ou triangle représente une mesure dans un échantillon (n = 1).

Biotransformation

Dans les échantillons d'eau, les concentrations en 1-OH-pyrène sont inférieures à la limite de quantification (Annexe C). Au début de l'expérience (J0), les gammares témoins ont une concentration de 1-OH-pyrène de 0,33 ng g^{-1} pf. Les concentrations du métabolite dans les gammares exposés augmentent jusqu'à atteindre un maximum de 2,5 ng g^{-1} pf après 48 (condition E2) et 96 (condition E1) heures, puis diminuent en phase de dépuration jusqu'à 0,25 et 0,23 ng g^{-1} pf respectivement pour les conditions E1 et E2. Cette expérience a donc montré que *G. fossarum* métabolise le pyrène en 1-OH-pyrène.

Paramètres toxico-cinétiques et prédictions

Les modèles (Eqs. (25) et (26)) ont été ajustés simultanément aux données observées

des conditions E1 et E2, en supposant une contamination dans les gammares témoins ($C(t=0) \neq 0$). Le processus d'inférence a convergé rapidement. L'indice de Gelman égal à 1 démontre une variance inter-chaîne MCMC négligeable par rapport à la variance intra-chaîne. Les distributions *a posteriori* des paramètres ont montré des distributions relativement resserrées par rapport aux distributions *a priori* indiquant que les données apportent suffisamment d'information pour obtenir des estimations précises (**Figure 44**).

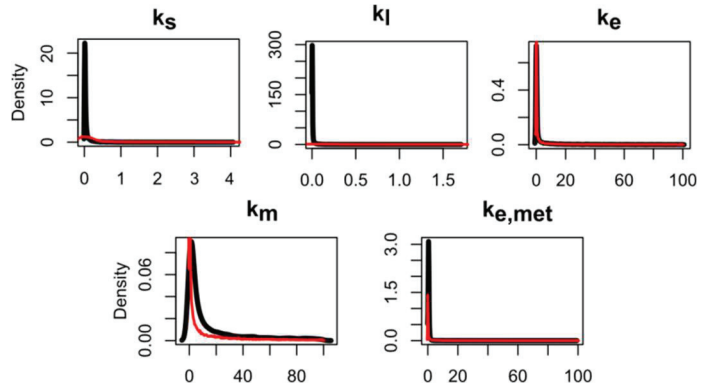


Figure 44. Distributions *a priori* (rouge) et *a posteriori* (noire) des paramètres du modèle (Eqs. (25) et (26)).

Les valeurs estimées des paramètres TK sont présentées dans le **Tableau 14**. Les moyennes estimées des taux d'élimination (k_e, k_m et $k_{e,met}$) sont nettement plus élevées que celles des taux d'accumulation (k_l et k_s). De plus, k_m est environ trois fois supérieur à k_e, ce qui suggère que la biotransformation est le processus majeur de détoxification du pyrène chez *G. fossarum*.

Tableau 14. Moyennes et intervalles de crédibilité à 95 % estimés pour les paramètres TK de *G. fossarum* exposé au pyrène.

Paramètre (j^{-1})	Moyenne	Intervalle de crédibilité à 95 %
k_s	0,0636	[0,00005 – 0,517]
k_l	0,0120	[0,00002 – 0,095]
k_e	6,81	[0,00002 – 70,5]
k_m	15,8	[0,0005 – 84,9]
k_{emet}	1,22	[0,0002 – 3,48]

L'ajustement des prédictions du modèle aux données observées est présenté **Figure 45**. Pour le pyrène et le 1-OH-pyrène respectivement, 9 et 19 des 20 concentrations observées se situent dans l'intervalle de crédibilité à 95 %, démontrant un bon ajustement des prédictions

du modèle aux données mesurées pour le métabolite. En revanche, pour le pyrène, les prédictions en phase de dépuration ne s'ajustent pas correctement aux données observées. Ce résultat peut s'expliquer du fait que le pyrène est un contaminant ubiquiste dans l'environnement, se traduisant par des concentrations variables dans les organismes. De plus, comme les concentrations mesurées en pyrène dans les gammares témoins ne sont pas nulles, il pourrait être suspecté une contamination par le milieu : par l'eau, les feuilles ou le sédiment. L'hypothèse d'une contamination par l'eau ou par le sédiment peut être rejetée puisque la concentration en pyrène est < LoQ dans les échantillons témoins de ces deux matrices. En revanche l'hypothèse d'une contamination par les feuilles est envisageable puisque les teneurs moyennes dans les feuilles « témoins » sont quantifiables (29 ± 5,0 ng g^{-1} ps), et que ces feuilles sont données comme nourriture aux organismes, aussi bien pendant la période de stabulation avant le début de l'expérience qu'en phase de dépuration.

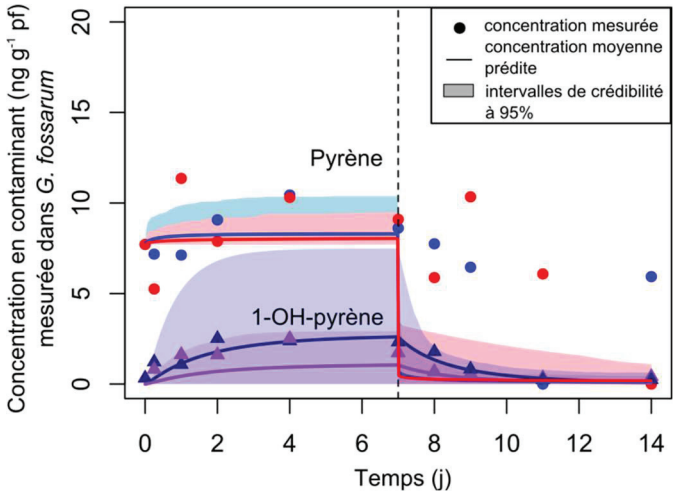


Figure 45. Ajustement simultané des prédictions du modèle aux données observées des concentrations en pyrène et 1-OH-pyrène mesurées dans *G. fossarum* dans les conditions E1 (rouge et violet) et E2 (bleu et bleu marine).

La seule étude rapportant des données toxico-cinétiques concernant le pyrène et son métabolite principal chez une espèce de gammare est celle de Carrasco-Navarro et al. (2015), avec l'espèce arctique et marine *Gammarus setosus*. Cet organisme a été exposé à de l'eau contaminée en pyrène avec comme tiers solvant de l'éthanol (32 % du volume total). Pour l'ensemble des paramètres du modèle sauf pour k_s, les estimations moyennes sont plus élevées pour *G. fossarum* que pour *G. setosus*. Dans tous les cas, du fait de leur utilisation d'un tiers solvant dans ces proportions, leur expérience n'a pas été effectuée dans des conditions réalistes d'un point de vue environnemental, à l'inverse de l'expérience effectuée dans cette thèse.

Cela met en exergue l'incidence que peut avoir l'espèce considérée et les voies d'expositions sur les paramètres TK pour un contaminant. D'ailleurs, d'autres espèces d'invertébrés aquatiques ont été exposées au pyrène, comme par exemple l'oligochète *Lumbriculus variegatus* (Mäenpää *et al.* 2009) et le polychète *Nereis diversicolor* (Giessing *et al.* 2003), qui présentent également une capacité à métaboliser cette substance. Dans les études d'origines, le taux de biotransformation n'a pas été estimé. Cependant, en utilisant l'approche développée dans l'article 2, il est possible de comparer les valeurs moyennes estimées de k_m et leurs intervalles de crédibilité à 95 % pour chaque espèce (**Tableau 15**).

Tableau 15. Moyennes et intervalles de crédibilité à 95 % estimés pour le taux de biotransformation du pyrène (k_m , j^{-1}) pour trois espèces d'invertébrés aquatiques.

Espèce	Voie d'exposition	Valeur moyenne de k_m (j^{-1})	Intervalles de crédibilité à 95 %
G. fossarum	Feuilles et sédiment	15,8	0,0005 – 84,9
L. variegatus	Eau	0,263	0,015 – 1,54
N. diversicolor	Sédiment	0,050	0,031 – 0,073

En termes de risque, le gammare aura une capacité plus importante à éliminer et biotransformer le pyrène que pour les deux autres espèces, il sera donc moins vulnérable pour ce composé. En revanche, la question de la toxicité de son métabolite pour *G. fossarum* peut légitimement se poser, toutefois elle n'a pas été étudiée dans ce travail.

4.4.4 Conclusion

G. fossarum métabolise le pyrène en 1-OH-pyrène dans les conditions expérimentales testées, proche de conditions environnementales observées dans les cours d'eau français. Le cadre de modélisation et d'inférence appliqué à ces données confirme le processus de biotransformation du pyrène par cette espèce, alors que le composé parent est peu accumulé.

En résumé, l'approche utilisée dans ce chapitre permet :

- d'estimer précisément k_m pour différents couples espèces/contaminants ;
- d'estimer simultanément des paramètres du modèle, sans devoir en fixer pour pouvoir estimer les autres ;
- d'obtenir les incertitudes sur les paramètres (en particulier k_m) et sur les prédictions du modèle du composé parent et du (des) métabolite(s), indispensables en ERE ;
- de montrer que les invertébrés ont des capacités métaboliques non négligeables, en particulier les gammares.

Chapitre 5 : Exemples d'applications du cadre de modélisation et d'inférence développé

5.1 OBJECTIF

Le cadre de modélisation et d'inférence développé dans les chapitres précédents a démontré sa performance en particulier pour les substances fortement hydrophobes, métabolisables ou non. Cette approche a été développée et testée pour quelque couple contaminant/espèce seulement. Il convient donc de développer cet aspect générique en appliquant ce cadre à d'autres substances. De plus, comme introduit au début de ce manuscrit, les modèles TK peuvent être utilisés comme outils de prédiction, dont il pourrait être intéressant d'en illustrer quelques exemples.

Ce chapitre propose donc des exemples d'applications de cette approche, de son utilisation pour investiguer le potentiel de biotransformation de deux retardateurs de flammes, jusqu'à son application comme outil prédictif dans divers situations. Ce chapitre présente dans un premier temps l'étude du potentiel de biotransformation de deux retardateurs de flammes bromés, l'HBCD et le BDE 99 ainsi que leur cinétiques de bioaccumulation chez les trois espèces d'invertébrés sélectionnées. Ces résultats sont présentés dans l'article "*Bioaccumulation of Brominated Flame Retardants (BFRs) and their potential biotransformation by freshwater invertebrates",* à soumettre dans *Environmental Pollution*. Les informations supplémentaires associées à l'article sont présentées à la suite. Dans un second temps, une note complémentaire a été ajoutée (Note 3) concernant l'application prédictive du modèle et de son cadre d'inférence à des données *in situ* pour ces deux même contaminants, l'HBCD et le BDE 99. Par la suite, une deuxième note a été introduite (Note 4) pour étudier la biodisponibilité de contaminants à l'aide du cadre développé, en y intégrant et estimant le taux d'ingestion et l'efficacité d'assimilation. Enfin, une troisième note (Note 5) a été ajoutée pour illustrer, dans le cadre de la DCE, l'application prédictive du cadre de modélisation et d'inférence développé dans cette thèse.

5.2 ARTICLE 3

Bioaccumulation of Brominated Flame Retardants (BFRs) and their potential biotransformation by freshwater invertebrates.

Aude Ratier[a], Christelle Lopes[b,*], Véronique Duvillard[a], Pierre Labadie[c], Hélène Budzinski[c], Olivier Geffard[a], Marc Babut[a].

[a] Irstea, UR RiverLy, centre de Lyon-Villeurbanne, 5 Avenue de la Doua, CS20244, 69625 Villeurbanne Cedex, France.

[b] Univ Lyon, Université Lyon 1, CNRS, Laboratoire de Biométrie et Biologie Evolutive UMR5558, F-69622 Villeurbanne, France.

[c] CNRS, Environnements et Paléoenvironnements Océaniques et Continentaux (EPOC), UMR 5805, Laboratoire de Physico- et Toxico-Chimie de l'environnement (LPTC), Université de Bordeaux, 351 cours de la Libération, 33405 Talence, France.

[*] Corresponding author: christelle.lopes@univ-lyon1.fr

Abstract

Biotransformation is an additional way of elimination to include in TK models to prevent overestimation of internal concentrations in biota; addition to that the toxicity could not be completely explained by the parent chemical only. Despite the increase concern about metabolites in aquatic organisms, their inclusion in ERA is still limited, mainly focusing on toxicity and scarcely considered in TK models for aquatic biota, especially for invertebrates. Besides, due to brominated flame retardants (BFRs) worldwide environmental contamination, legislations have been formulated to restrict or ban their production and use. Nevertheless, some BFRs are still detected in various invertebrates and fishes species, such as hexabromocyclododecane (HBCD) and tetra- and penta- BDEs, mainly represented by BDE 47 and BDE 99. Debromination mechanism leading BDE 99 to BDE 47 have been strongly suspected in fishes. Moreover, previous studies had suggested an isomerization of HBCD from sediment (γ-HBCD) to fish (α-HBCD). To date, few data are available on the bioaccumulation kinetics of BFRs in freshwater invertebrates. The aims of this study are to investigate the potential bio-isomerization of γ- to α-HBCD and debromination of BDE 99 in to BDE 47 in three invertebrate species. Thus, *Chironomus riparius*, *Radix auricularia* and *Gammarus fossarum* were exposed in aquatic microcosms to HBCD commercial mixture and BDE 99 spiked leaves or sediment. No bioisomerization nor debromination were observed for these species under these experimental conditions. Additionally, we observed that snails did not eliminated BDE 99 and ∑HBCD levels do not exceed 0.76 ng g^{-1} (ww) in organisms. TK model parameters for radix and gammarid exposed to BDE 99 were estimated by Bayesian inference. Their median and the 95% credibility intervals predictions were given.

Keywords: bioaccumulation, toxicokinetic model, flame retardants, Bayesian inference, freshwater invertebrates, biotransformation

Highlights:

- Low bioaccumulation of HBCD was measured in chironomids and gammarids
- No bio-isomerization of γ- to α- or β-HBCD was observed for these invertebrates
- No debromination of BDE 99 in -47 was observed in radix and gammarids
- TK model parameters were estimated for gammarid and radix BDE 99 exposure

1. Introduction

In Environmental Risk Assessment (ERA), biotransformation is a key process which affect the biological activity of chemicals, especially their disposition, residence time, and toxicity (Livingstone 1998). Toxicokinetic (TK) models are usually used as a first step in ERA to predict chemical concentrations in organisms from those to which they are exposed in their environment, following the process of uptake from different sources (e.g. water or diet), biotransformation and elimination of the compound (MacKay et Fraser 2000). Thus, biotransformation is an additional way of elimination to include in TK models to prevent overestimation of internal concentrations in biota (Van der Linde *et al.* 2001). Besides, the link between the exposure concentration and the toxicity could not be completely explained by the parent chemical only.

Despite the increase concern about metabolites in aquatic organisms, their inclusion in ERA is still limited, mainly focusing on toxicity and scarcely considered in TK models for aquatic biota (Nichols *et al.* 2007, Arnot *et al.* 2008a, Arnot *et al.* 2008b, Katagi 2010). Moreover, biotransformation mechanism by aquatic invertebrates has been often assumed to be of limited importance unlike fishes (Morrison *et al.* 1996). However, from some studies conducted the last decade, evidence has emerged for the existence of large differences in biotransformation rates among invertebrate taxa, which is highly substance- and species-specific (Ashauer *et al.* 2012, Jeon *et al.* 2013, Rösch *et al.* 2016, Miller *et al.* 2017, Fu *et al.* 2018).

Otherwise, Brominated Flame Retardants (BFRs) have been a major concern for several decades due to their intensive use in commercial, consumer and household products (Cincinelli *et al.* 2014, Lebrun *et al.* 2014). They are used to inhibit the

inflammation, often incorporated in flammable products like electronics, textiles and plastics (de Wit 2002, Watanabe et Sakai 2003, Abdallah *et al.* 2014). Over the past few decades, BFRs become ubiquitous contaminants with a long-range atmospheric transport (Zhao *et al.* 2008, Chen *et al.* 2015, Li *et al.* 2015, Olukunle et Okonkwo 2015). As a result, their environmental contamination has been recognized worldwide in various species and environmental compartments (de Wit 2002, Law *et al.* 2003, Law *et al.* 2006b, Kim *et al.* 2014, Law *et al.* 2014). Among these chemicals, the PolyBrominated Diphenyl Ethers (PBDEs) and the HexaBromoCycloDodecane (HBCD) are the most common BFRs detected in the environment.

Despite that PBDEs have been banned in Europe since 2004 (Directive 2013), tetra- and penta-BDEs mainly represented by BDE 47 and BDE 99, are still detected in various aquatic invertebrate and fish species (Leppänen et Kukkonen 2004, Stapleton *et al.* 2004, Tomy *et al.* 2004b, Covaci *et al.* 2006b, Binelli *et al.* 2008, Viganò *et al.* 2009, Tlili *et al.* 2012, Van Ael *et al.* 2012, Besse *et al.* 2013b, Lebrun *et al.* 2014). A debromination mechanism leading BDE 99 to BDE 47 has been strongly suspected in rainbow trout and common carp (Stapleton *et al.* 2004, Tomy *et al.* 2004b). To date, there is still few data available on kinetics or metabolism of PBDEs in invertebrates (Leppänen et Kukkonen 2004, Stapleton *et al.* 2004, Tomy *et al.* 2004b, Drouillard *et al.* 2007, Schultz *et al.* 2007, Tlili *et al.* 2012, Lebrun *et al.* 2014), though Tlili *et al.* (2012) had not excluded a possible biotransformation of BDE 99 to -47 in *Gammarus pulex*.

In spite of HBCD was added in the list of POP substances in 2013 at the Stockholm Convention, its commercial mixture caused the detection of the three major diastereoisomers α, β and γ in various environmental matrixes for several years

(Law *et al.* 2014, Dong *et al.* 2017). It is well documented that there is a shift in relative diastereoisomer distribution γ- to α-HBCD with increasing trophic level in aquatic food webs (Tomy *et al.* 2004a, Covaci *et al.* 2006a, Law *et al.* 2006a, Covaci et Malarvannan 2016). Further studies suggested a diastereoisomer-selective uptake (Son *et al.* 2015), diastereoisomer-specific metabolic rate (Law *et al.* 2006a, Luo *et al.* 2013) or bioisomerization of γ- to α-HBCD (Szabo *et al.* 2010, Du *et al.* 2012) to explain the elevated contribution of α-HBCD detected in vertebrates. To date, these hypotheses are still unexplored in freshwater invertebrates, except one study (Shi *et al.* 2017) which reported the exposure of the marine copepod *Tigriopus japonicus* to a HBCD commercial mixture spiked water. They found that the α-, β- and γ-HBCD proportions were closed to those found in the commercial mixture, suggesting a lack of bioisomerization.

The aims of this study are to investigate the potential (*i*) bio-isomerization of γ- to α-HBCD and (*ii*) debromination of BDE 99 in to BDE 47 in three invertebrate species. We exposed *C. riparius*, *R. auricularia* and *G. fossarum* in aquatic microcosms to HBCD or BDE 99 spiked leaves or sediment. Internal levels of chemicals were regularly measured in the different matrixes. Among aquatic species, *Chironomus riparius, Radix auricularia* and *Gammarus fossarum* are ubiquitous in European freshwaters and easily sampled in the field. They play important ecological roles as links between the base of food webs and higher-order consumers such as fish or birds (Armitage 1995, Lebrun *et al.* 2014, Amorim *et al.* 2019). Besides, these organisms have been reported to accumulate metals and various organic pollutants (Ming 2006, Ashauer *et al.* 2010b, Lebrun *et al.* 2012, Tlili *et al.* 2012, Hong *et al.* 2014). Then, TK model parameters were estimated in a Bayesian framework.

2. Materials and methods

2.1 Chemicals, reagents and quality control

Solid 2,2',4,4',5-pentabromodiphenyl ether (99%) and 1,2,5,6,9,10-hexabromocyclo-dodecane commercial mixture (10 to 13 % for α -, 1 to 12 % for β – and 75 to 89 % for γ-HBCD (Covaci et al. 2006a)) were purchased from Sigma-Aldrich (St Quentin-Fallavier, France). Working solutions for sediment spiking with HBCD were prepared in acetone at 0.5 and 1 g L^{-1} respectively for chironomid and gammarid. For BDE 99 experiment, working solutions were prepared at 0.1 g L^{-1} for the contamination of sediment for both gammarid and radix experiments and at 10 µg L^{-1} for the contamination of leaves for the gammarid exposure. HBCD diastereoisomers (α, β and γ) and the internal standard $^{13}C_{12}$-α-HBCD were provided by Wellington Laboratories (via BCP Instruments, Oullins, France). All working solutions were prepared in MeOH at 234 to 254 ng g^{-1} each for the α-β-γ-HBCD mixture and at 286 ng g^{-1} for internal standard. Two PBDEs were analyzed: BDE 47 and -99 and they were quantified with the internal standard F-BDE 47 supplied by Chiron (via BCP Instruments, Oullins, France). Octachloronaphthalene (OCN) was provided by Ultra Scientific (North Kingstown, USA). Working solutions were prepared in isooctane for F-BDE 47 at 0.91 and 26 ng g^{-1} respectively for water and solid samples, and at 89 ng g^{-1} for OCN. Solutions were stored at -20 °C.

EPOC-LPTC uses standard reference materials, method blanks and injections of authentic standards reported in **appendix A** in supporting information; including the limits of detection (LoD) and quantification (LoQ).

2.2 Matrix spiking

2.2.1 Sediment

In April and September 2017 and in January and May 2018, 60 L of natural sediment was collected from a watercourse in the Miribel-Jonage nature park (Vaulx-

en-Velin, eastern central France near Lyon, 5°00′51″E and 45°79′71″N for the gammarid experiment). The sediment was collected using a manual dredger, sieved at 2 mm, pooled in a polypropylene (PP) jar, and stored at 4 ± 2 °C until they were used. For chironomid and gammarid exposed to HBCD and for radix and gammarid exposed to BDE 99 respectively, the sediment were characterized by a water content of 56.6, 48.9, 51.2 and 47.8%, a particulate organic carbon content of 4.2, 2.8, 3.97 and 6.4% on dry weight matter, 0.23, 0.14, 0.20 and 0.21% of particulate nitrogen content. Then sediment were homogenized and mixed with mechanical action (paint propeller connected to an electric drill) for 20 min. Then 1.2 L of sediment was added in several Pyrex bottles (2 L). Each bottle was spiked with a solution of HBCD commercial mixture or BDE 99 in an acetone carrier at a nominal concentration for HBCD of 5 and 10 ng g^{-1} dw for chironomid and gammarid experiments respectively (due to their way of life: chironomids live in direct contact with sediments while gammarids live on their surfaces) and 6 ng g^{-1} dw for BDE 99 for both radix and gammarid exposures (similar way of life). The amount of carrier added to the sediment was minimal (between 0.03 and 0.08 µL g^{-1}). Then each bottle was rotated for at least 24 h at 15 revolutions per minute (rpm) at room temperature (21 °C). After 48 h storage at 4 °C, contaminated sediment in each bottle was transferred in a polypropylene jar and homogenized and restless with mechanical action for 20 min before being added to aquaria.

2.2.2 Leaves

Alder leaves (*Alnus glutinosa*) were collected in November 2016 (Ardillats, eastern central France near to Lyon) and stored in plastic boxes before being introduced in aquaria as food for gammarids.

Prior to exposing gammarids to HBCD or BDE 99, the alder leaves were placed in a bucket filled with several liters of ground water for 7 days at 21 °C. The water was

renewed every 2 days to remove the exudates from the leaves. Several batches of 10 g dw leaves were placed in Pyrex bottles (2 L) containing 1 L of groundwater and were spiked at a nominal concentration of 3 ng g^{-1} wet-weight basis (ww) with a solution of 10 µg L^{-1} of BDE 99 in acetone (1 µL of this solution for 1 mL of ground water). These batches were rotated for 72 h at 10 rpm at room temperature (21 °C). Then leaves were rinsed with ground water for 3 days in Pyrex bottles before being placed in aquaria.

2.3 Organisms exposure

2.3.1 Chironomid exposure

A total of four aquaria (38-20-24.5 cm in polystyrene) were prepared with 3 L of homogenized spiked sediment and 15 L of groundwater. Each aquarium was allowed to settle for 10 days before introducing the chironomids. A control aquarium was prepared in the same way with reagent control sediment (**Fig. A.1**). Benthic invertebrate *C. riparius* were obtained from laboratory cultures carried out according to standard methods (OECD 2004a, AFNOR 2010). A total of 400 fourth-instar larvae (7-day-old larvae post-hatching, L4) were added to each aquarium. Chironomids were exposed to spiked sediment for 4 days at 20 ± 0.2 °C in aerated and static water. A 16:8 h light:dark cycle was maintained throughout the experiment. No depuration experiment was investigated due to the short lifetime of the larval stage L4. Larvae were not fed throughout the experiment. The water quality parameters were monitored and are presented in **appendix A**. Chironomid survival, size and wet weight were determined at each sampling time (every 24 hours). To determine the size, ten larvae were photographed using an IEEE 1394 Digital CCD camera (F2, FOculus, Germany) mounted on an Olympus BX51 light and SZX12 stereo zoom microscopes at low magnifications. The mean sizes were determined using digital image analysis software (SigmaScan Pro software).

2.3.2 Radix exposure

Three days before the start of the experiment, about 600 *R. auricularia* with a shell length between 150 and 180 mm were carefully collected by hand at a reference site (Saint-Maurice de Rémens, France, 5°26′22″E - 45°95′79″N). Radix were brought to the laboratory and acclimated in aquaria with continuously renewed groundwater under constant and slight aeration, a 16:8 h light:dark photoperiod was maintained and the temperature was kept at 13 ± 0.3°C. The overlying water was renewed daily under constant aeration. The water quality parameters were monitored and are presented in **appendix A**. Organisms were not fed throughout the acclimation and the experiment. Radix experiments were composed of two phases: exposure and depuration (**Fig. A.2**). At the beginning of the experiment, hermaphrodite individuals were exposed to BDE 99 spiked sediment for nine days in three aquaria each containing 3L of BDE 99 spiked sediment, 15 L of groundwater and 140 organisms. A control aquarium was prepared with homogenized reagent sediment (0.07 µL of acetone per g of sediment). After nine days of exposure, radix survival was determined and the organisms were transferred to a clean media: 82 organisms by aquaria with clean sediment and groundwater for nine more days. Radix survivals were determined at the end of the exposure and depuration phases.

2.3.3 Gammarid exposure

Three weeks before the start of the experiment, about 3,000 and 6,000 male gammarids were collected respectively for HBCD and BDE 99 experiments with a hand net at a reference site (Saint-Maurice de Rémens, France, 5°26′22″E - 45°95′79″N). Gammarids were brought to the laboratory and acclimated in aquaria with continuously renewed groundwater under constant aeration, a 16:8-h light:dark photoperiod was maintained and the temperature was kept at 12 °C. Organisms were fed *ad libitum* with alder leaves. Only male gammarids (11.3 ± 0.80 and size

11.4 ± 1.03 mm for HBCD and BDE 99 respectively) were selected, in order to eliminate potential biases due to neonate release by females. Gammarid experiments were composed of two phases: uptake and elimination. For the HBCD experiment, gammarids were exposed to spiked sediment for nine days at 12 ± 0.3 °C under a 16:8 h light:dark cycle maintained throughout the experiment (**Fig. A.3**). At the beginning of the experiment, 350 individuals were distributed in four aquariums each containing 3L of HBCD spiked sediment, 15 L of groundwater. Gammarids were fed with one batch of previously clean re-hydrated leaves (10 g dw). The overlying water was renewed daily under constant aeration. A control aquarium was prepared with homogenized reagent sediment (0.03 µL of acetone per g of sediment). After nine days of sediment exposure, gammarids survival was determined and the organisms were transferred to a clean media for nine days: 250 organisms by aquaria with clean sediment and groundwater. During depuration, gammarids were fed with clean leaves (10 g dw).

For the BDE 99 experiment, gammarids were exposed to spiked leaves (E1 condition) or to spiked sediment (E2 condition) for seven days at 12 ± 0.2 °C under a 16:8 h light:dark cycle maintained throughout the experiment (**Fig. A.4**). The overlying water was renewed daily under constant aeration. A control aquarium for E2 was prepared with homogenized reagent sediment (0.08 µL of acetone/g sed). At the beginning of the experiment, 300 individuals were added per aquarium (test and control). Gammarids exposed to the contaminated leaves (E1) were distributed in three aquariums each containing 15 L of groundwater and one batch of previously spiked leaves per aquarium. Organisms exposed to spiked sediment (E2) were distributed in three aquariums each containing 3 L of spiked sediment, 15 L of groundwater and one batch of previously clean re-hydrated leaves. After seven days

of exposure, gammarid survival for each condition was determined and the organisms were transferred to a clean medium for seven more days: 270 organisms per aquarium with groundwater for the E1 condition or with clean sediment and groundwater for the E2 condition. During depuration, gammarids were fed with clean leaves (10 g dw). The water quality parameters were monitored and are presented in Annex S1. Gammarid survival, size and wet weight were determined at the end of the uptake and elimination phases.

2.4 Sample collection for analysis

The overlying water (OW) was sampled in 1-L polyethylene (PE) bottles. Subsamples from sediment were deposited in 180-mL PE tubes. Organisms were collected in 50-mL Falcon ® tubes. Every day (0, 1, 2, 3, 4) chironomids were collected by sieving sediment at 500 µm. The organisms, OW and sediment samples were also collected every days. The OW, sediment and organism control samples were collected at days 0 and 4. At days 0, 2, 4, 9, 11, 14 and 18, the OW, sediment samples and 30 radix were collected and subsequently the shell was removed of each organism. For the HBCD exposure, 90 gammarids were collected at days 0, 1, 2, 4, 7, 9, 10, 11, 15 and 18, as well as the OW and sediment samples. The OW, sediment, leaf and organism control samples were collected at days 0, 9 and 18. For the BDE 99 experiment, at days 0, 1, 2, 4, 7, 8, 9, 11 and 14, 90 gammarids were collected for each condition (E1 and E2). The OW, sediment, leaf and organism control samples were collected at days 0, 7 and 14. All samples were stored at −21 °C and lyophilized at −65 °C (Christ-Alpha 1-4LD, Bioblock Scientific) under a pressure of 0.050 mbar for 48 h for organisms, 72 h for leaves and 7 days for sediment.

2.5 Chemical analysis

2.5.1 Water samples

Water samples were filtered using 47 mm GF/F glass microfiber filters

(Whatman®). HBCD isomers were analyzed using an Acquity UPLC system (Ultra Performance Liquid Chromatography) connected to a Quattro Premier XE triple quadrupole mass spectrometer (Waters, Saint-Quentin en Yvelines, France). For PBDEs analysis, internal standard was added (F-BDE 47: 0.020-0.024 ng) to the 10mL of filtered samples and then samples were analyzed using a SPME procedure coupled to a gas chromatography 6890N Agilent Technologies (Massy, France), connected to a micro-electron capture detector (μECD). Analytes were injected in pulsed splitless mode and separated with a J&W HP-5MS column (5% Phenyl – 95 % methylpolysiloxane; 60 m x 0.25 mm x 0.1 μm). More details are provided in **appendix C**.

2.5.2 Sediments, leaves and organisms samples

Between 0.1-0.5 g of solid samples were weighed in Microwave cells and then spiked with internal standards (4 ng for 13C12-α-HBCD or 1 ng for F-BDE 47), and extracted by microwave assisted extraction (Milestone SRL, Sorisole, Italy) at 80°C during 15 min performed with 10 mL of dichloromethane (DCM). Extract was filtered on glass wool and concentrated under a gentle nitrogen flow at 40°C. Clean-up was performed on columns containing activated copper and acidified silica gel (40 % H2SO4 w/w) previously conditioned with 5 mL of pentane; after extract loading, HBCD isomers and PBDEs were eluted with three times 5 mL of a pentane / DCM (90/10, v/v). The eluate was further concentrated, solvent exchanged to MeOH for HBCD analysis or isooctane for PBDEs analysis and taken to a final volume of 300 μL. For PBDEs analysis, the syringe standard OCN was added (1.3 ng) just before analysis. HBCD isomers were analyzed using an Acquity UPLC system connected to a Quattro Premier XE triple quadrupole mass spectrometer. Separation of analytes was achieved using a C18 reverse phase column (1.7 μm, 100 x 2.1 mm; Acquity UPLC BEH C18). More details are provided in **appendix D**. PBDEs were

analyzed using a gas chromatography connected to an electron capture detector (GC-ECD). Analytes were injected in pulsed splitless mode and separated with a J&W HP-5MS column (**Appendix C**).

2.6 Toxicokinetic model and statistical analysis

A first-order kinetic bioaccumulation model that accounts for different uptake pathways and elimination processes can be expressed as follows (Eq. (1)) (Ratier *et al.* 2019):

$$dC(t)/dt = \sum_{i=1}^{n}\left(k_i \times C_i(t)\right) - \sum_{j=1}^{p}\left(k_j \times C(t)\right) \quad (1)$$

where $C(t)$ is the contaminant concentration at time t (days) in the whole organism (ng g_{org}^{-1} where the mass of the organism is expressed in wet weight (ww)), n is the number of contamination sources, k_i the uptake rate from the contamination source i, $C_i(t)$ the contaminant concentration in the contamination source i at time t (days), p the number of elimination processes and k_j the elimination rate related to process j.

For chironomid, we consider that the exposure source is sediment (ingestion), while elimination occurs due to excretion and growth dilution. Indeed, for highly hydrophobic compounds, contamination from water could be restricted ($k_w = 0$). The sediment concentration is considered constant over time under our laboratory conditions; Eq. (1) can thus be rewritten as follows (Eq. (2)):

$$dC_{chironomid}(t)/dt = k_{s,chironomid} \times C_s - (k_{e,chironomi} + k_g) \times C_{chironomid}(t) \quad (2)$$

where $k_{s,chironomid}$ the uptake rate from the sediment ($g_{sed}\ g_{org}^{-1}\ d^{-1}$), C_s the contaminant concentration in sediment (ng g_{sed}^{-1} dw), $k_{e,chironomid}$ the elimination rate (d^{-1}) and k_g the growth rate (d^{-1}). The chironomid growth rate is obtained from the von Bertalanffy growth equation (Eq. (3)), one of the most widely used models for describing the growth of benthic invertebrates (von Bertalanffy, 1938):

$$L(t) = L_{max} - (L_{max} - L_0) \times e^{(-k_g \times t)} \quad (3)$$

where $L(t)$ is the chironomid size (mm) at time t (d), L_{max} is the asymptotic size (mm), L_0 is the size at birth (mm) and k_g is the growth rate (d^{-1}).

For radix exposed to BDE 99, we consider that the exposure source is sediment (ingestion), while elimination occurs due to excretion. Indeed, for highly hydrophobic compounds, contamination from water could be restricted (k_w = 0). Growth was neglected, the mean weight for organism throughout the experiment being 0.36 ± 0.03 g_{org} (ww)). Eq. (1) can thus be rewritten as follows, where the sediment concentration C_s is constant over time under our laboratory conditions (Eq. (4)):

$$dC_{radix}(t)/dt = k_{s,radix} \times C_s - k_{e,radix} \times C_{radix}(t) \quad (4)$$

where $k_{s,radix}$ is the uptake rate from sediment ($g_{sed}\ g_{org}^{-1}\ d^{-1}$, where the mass of sediment is expressed in dry weight (dw)), C_s the contaminant concentration in sediment (ng g_{sed}^{-1}) and $k_{e,radix}$ is the elimination rate (d^{-1}).

For gammarid exposed to BDE 99, exposure to chemicals would occur from litter (leaves) consumption (experimental condition E1), or from sediment (experimental condition E2) assuming that sediment is the major contamination source in the E2 condition (Bertin *et al.* 2016, Ratier *et al.* 2019). Under our laboratory conditions, BDE 99 concentrations in leaves (C_l) and in sediment (C_s) are considered constant over time, leading to Eqs. (5) (exposure by leaves only) and (6) (exposure by sediment only):

$$\begin{cases} dC_{E1,gam}(t)/dt = k_l \times C_{l,E1} - k_{e,gam} \times C_{E1,gam}(t) & (5) \\ dC_{E2,gam}(t)/dt = k_{s,gam} \times C_{s,E2} - k_{e,gam} \times C_{E2,gam}(t) & (6) \end{cases}$$

where k_l is the uptake rate from leaves ($g_{leave}\ g_{org}^{-1}\ d^{-1}$, where the mass of leaves is

expressed in dry weight (dw)) and C_l the contaminant concentration in leaves (ng g_{leave}^{-1}).

For gammarid exposed to HBCD, we consider that the exposure source is sediment due to the highly hydrophobic property of HBCD (k_w = 0). The sediment concentration is considered constant over time under our laboratory conditions; thus Eq. (6) can also describe the concentration of HBCD in gammarid over time.

All the hypotheses and corresponding models tested in this study are summarized in Table 1.

Table 1. Summary of the experimental data collected, hypotheses and models fitted according to available data.

Experiment	Experimental data collected	Hypothesis		Model according to available data
Chironomid **HBCD**	C_w (t) C_s (t) L(t) $C_{chironomid}$ (t)	Only sediment exposure route is considered	$k_w = 0$	Eq. (2)
Gammarid **HBCD**	C_w (t) C_l (t) C_s (t) $C_{gammarid}$ (t)	Only sediment exposure route is considered	$k_w = 0$ $k_l = 0$	Eq. (6)
Gammarid **BDE 99**	$C_{w,E1}$ (t) $C_{l,E1}$ (t) $C_{l,E2}$ (t) C_s (t) $C_{gammarid,E1}$ (t) $C_{gammarid,E2}$ (t)	If leaf (E1) or sediment (E2) exposure routes are considered	E1: k_s=0, k_w =0 E2: k_l=0, k_w=0	Eq. (6)
Radix **BDE 99**	C_w (t) C_s (t) C_{radix} (t)	Only sediment exposure route is considered	$k_w = 0$	Eq. (4)

Inference computation was performed with JAGS and R software (Plummer 2016, R Core Team 2017). The models were fitted to bioaccumulation data using Bayesian inference via Markov Chain Monte Carlo (MCMC) sampling. For each model tested, we applied the unified Bayesian framework developed by Ratier *et al.* (2019). Further information is available in supplementary material (**Appendix E**)

relative to the definition of priors for each model parameter and the implementation of the models.

Significant differences between survival rates of control and test conditions were considered according to the Wilcoxon test with a risk α of 5%. Graphical representations were made with the statistical software R (version 3.3.3, R Core Team (2017)). For Bayesian inference, JAGS 4.2.0 for Windows and *rjags* package for R software were used.

3. Results

3.1 HBCD

3.1.1 Growth and survival

For chironomid, a high survival rate was observed during the experiment for the test condition (90%) and for the control (98%). No adverse effect of spiked sediment on chironomid growth was observed (p-value = 0.912).

For gammarid, survival rates after the experiment in control and test aquaria were respectively 89% and 87% after the uptake phase and 79 and 85% after the elimination phase.

3.1.2 Water, leaves, sediment and organisms contamination

In all water samples, each HBCD diastereoisomer concentration was below the LoQ.

The mean value of ∑HBCD concentration in sediment throughout the uptake phase was 4.8 ± 1.7 (n=6) and 9.8 ± 2.8 ng g^{-1} dw (n=11) for chironomid and gammarid experiment. Only γ-HBCD was almost always above the LoQ, except for two (chironomid exposure) and one (gammarid exposure) analytical replicates. Thus, γ-HBCD was the dominant diastereoisomer in sediment (65-100% of the ∑HBCD for chironomid and 74-91% for gammarid experiments). The α-HBCD was often or

always quantified in sediment samples (56% for chironomid experiment and 100% for gammarid) in proportions much lower than those of γ-HBCD (7-10 % and 9-26 % of the ∑HBCD for chironomid and gammarid exposure). The β-HBCD was always below the LoQ for sediment samples for each experiment. In control sediment samples, none of HBCD diastereoisomers were quantified for both experiments.

∑HBCD levels in leaves reached steady state with sediment at the end of the uptake phase (C_l = 12 ± 0.60 dw (n=2), C_s = 9.8 ± 2.8 ng g^{-1} dw (n=11)), since sediment particles deposit on the surface of leaves when gammarids forage (Bertin et al., 2016; Ratier et al., 2019). As for sediment samples, γ-HBCD was the major diastereoisomer quantified in leaves (91-100%). α- and β-HBCD were never quantified. No HBCD diastereoisomer was quantified throughout the elimination phase, as it was observed too in control leaf samples.

A similar or low bioaccumulation of ∑HBCD in chironomid and gammarid was measured compared to the exposure concentration in sediment (**Fig. 1**): below 6.0 and 3.0 ng g^{-1} dw (below 0.80 and 0.40 ng g^{-1} ww) in organisms while around 5.0 and 10 ng g^{-1} dw in sediment.

The ∑HBCD concentrations in chironomids increased from an initial concentration below the LoQ to 0.76 ng g^{-1} (ww) at the end of the experiment (**Fig. 1-a**). α-HBCD was quantified only at day 1. β-HBCD was never quantified (data not shown, but available in **appendix F**). Only γ-HBCD was quantified at each sampling time except at day 0, thus γ-HBCD was the major diastereoisomer quantified (62-100% of the ∑HBCD), as it was also observed for the sediment profile.

The ∑HBCD concentrations in *G. fossarum* increased from an initial concentration below the LoQ to its maximum 0.36 ± 0.010 ng g^{-1} ww (n=2) in one day, and then decreased to below the LoQ at the end of the uptake phase (**Fig. 1-b**).

Besides, we observed a slight decrease of the concentration of ∑HBCD in the uptake phase from day 2. Through the elimination phase, the ∑HBCD concentration in gammarids stayed below the LoQ. The α-HBCD concentration in gammarids was always between the LoD and the LoQ throughout the experiment. The β-HBCD concentration was always under the LoD except at day 1 where its concentration was between the LoD and LoQ (data not shown). The γ-HBCD was detected in the accumulation period but only quantified at day 1 (0.23 ± 0.045 ng g^{-1} ww, n=2). Thus, γ-HBCD was the only diastereoisomer above the LoQ in gammarid and account for 55 to 71 % of the ∑HBCD quantified. Any HBCD diastereoisomer was detected in control gammarid samples, except at day 0 where the α-HBCD was detected but not quantified.

3.1.3 Toxicokinetic model and potential of bioisomerization

The uptake of ∑HBCD was low compared to the exposure concentration in sediment, especially for the γ-HBCD. As ∑HBCD concentrations in both organisms were very close to the LoQ, (lack of experimental points), the model was not applied to these experimental data. Besides, the ratios of α-, β- and γ-HBCDs in *C. riparius* and *G. fossarum* were very similar to those in the stock solution used to spike the sediment throughout the whole uptake and depuration phase, suggesting that the three diastereoisomers did not undergo any bioisomerization in these two species.

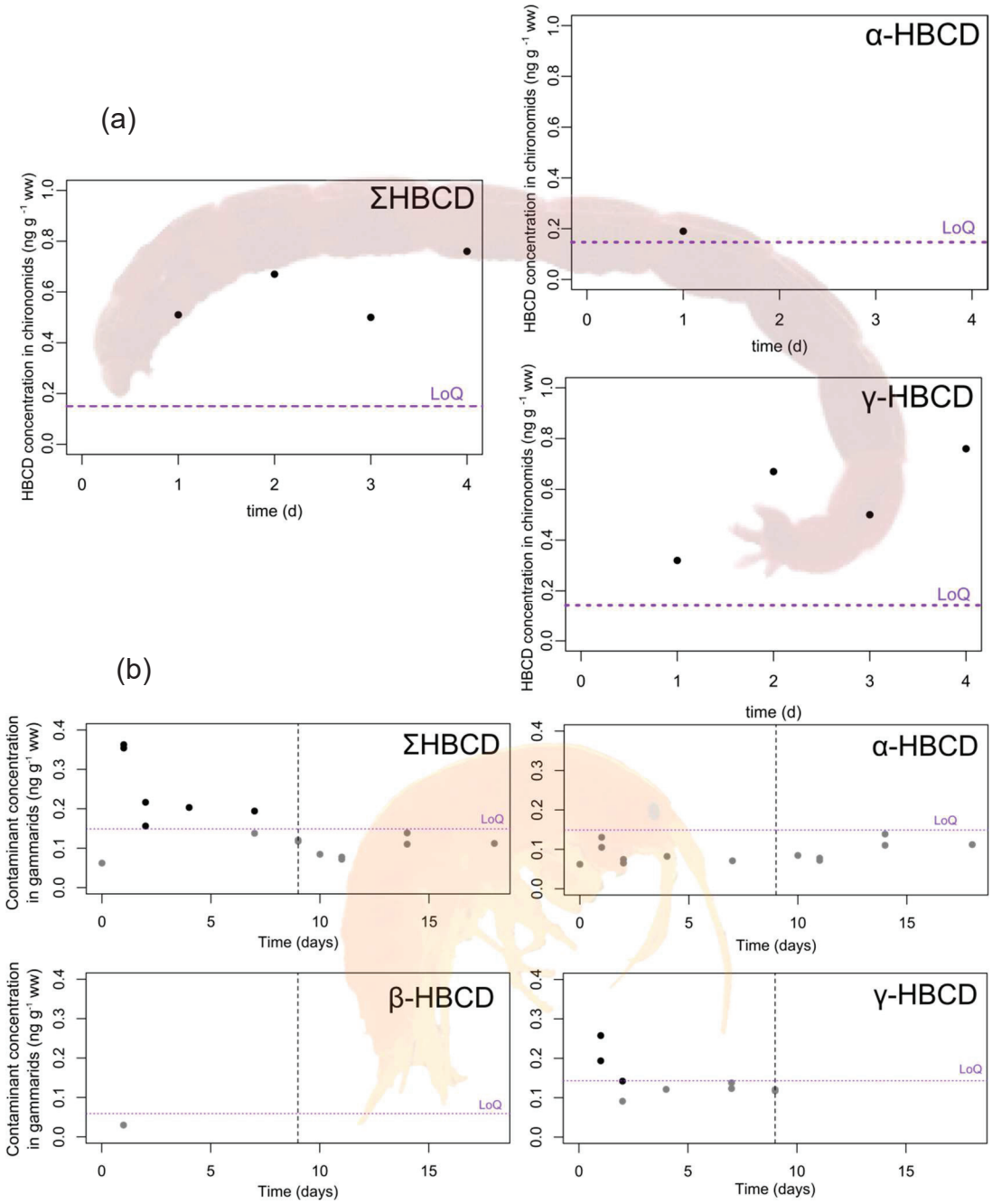


Figure 1. Concentrations of total, α- and γ-HBCD (ng g^{-1} ww) measured in (a) *Chironomus riparius* and (b) *Gammarus fossarum* according time (days). The vertical line indicates the end of the accumulation period for gammarid exposure. The gray points symbolize the concentration above LoD but below LoQ.

3.2 PBDE

3.2.1 Growth and survival

Radix survival rates in the control and test aquariums were 91% during the exposure phase, but only 75% and 62% in the control and test aquariums respectively during the depuration phase.

For gammarid exposure, survival rates after uptake and elimination periods were respectively 77% and 86% in E1 control aquaria, 77% and 94% in E2 control aquaria, 85% and 90% for spiked leaves condition (E1), and 88% and 89% for spiked sediment condition (E2).

3.2.2 Water, leaves, sediment and organisms contamination

In all water samples, the BDE 99 and -47 concentrations were below the LoD. In sediment samples, mean BDE 99 concentrations were 8.3 ± 0.34 (n=3) and 3.4 ± 0.14 ng g-1 dw (E2 condition, n=5) respectively for radix and gammarid experiments. Mean values of BDE 99 concentrations in leaves for the gammarid experiment were 12 ± 2.0 and 0.49 ± 0.36 ng g-1 dw respectively for E1 and E2 conditions (n=5).

Similar BDE 99 levels were measured in gammarids for the two conditions tested (E1 and E2, **Fig 2-a**), increasing from an initial concentration below the LoD to 0.44 ± 0.010 ng g_{org}^{-1} ww (n=2) at the end of the uptake phase (day 7). When gammarids where transferred into a clean media, BDE 99 concentration in organisms decreased to 0.15 ± 0.020 ng g_{org}^{-1} ww (n=2) at day 14 for spiked leaf and spiked sediment conditions. The BDE 47 was detected in gammarid samples but remained below the LoQ all the time (**Fig 2-b**). The BDE 99 concentrations in *R. auricularia* increased from an initial concentration below the LoQ to 2.7 ng g^{-1} ww (**Fig. 2-c**) at the end of the accumulation period (day 9) where the steady state was not reached.

In the radix shells, BDE 99 level was low and reached 0.25 ng g_{org}^{-1} dw at day 9, against 0.10 ng g_{org}^{-1} dw in control shells. Throughout the elimination phase, the

BDE 99 concentration bioaccumulated in radix stabilized to 2.3 ± 0.37 ng g_{org}^{-1} ww (n=5). Stopping the exposure of radix to spiked sediment did not result in a decrease in tissue concentrations. The BDE 47 congener was always below the LoD (0.030 ng g_{org}^{-1}) in *R. auricularia* throughout the experiment.

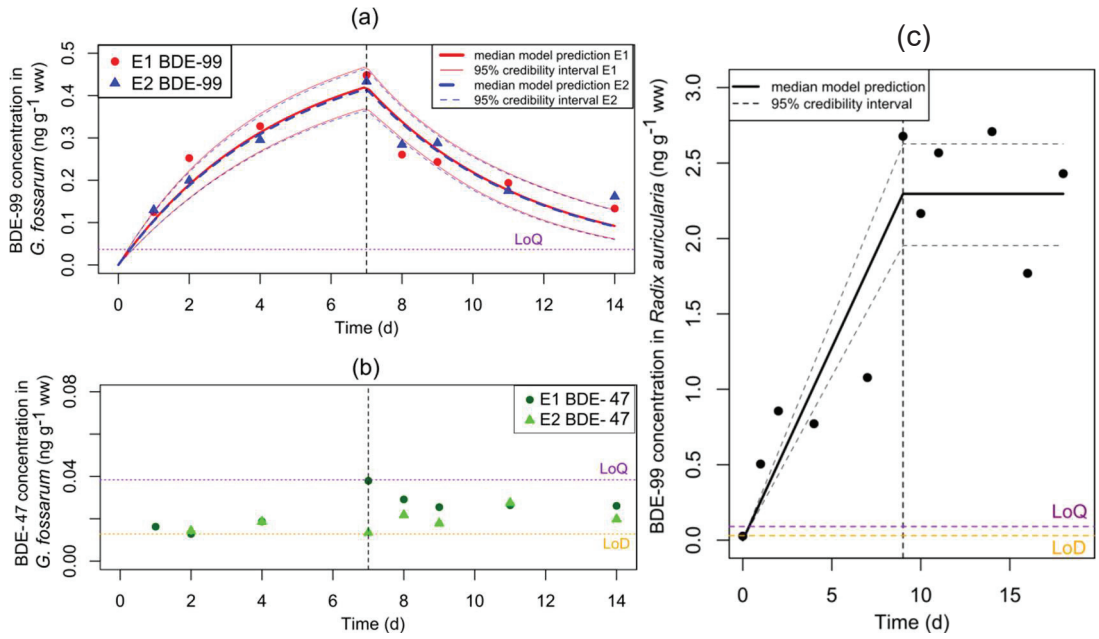


Figure 2. (a) Measured (dots and triangles) and predicted (plain and dashed curves, from Eqs. (5) and (6)) BDE 99 concentrations (ng g_{org}^{-1}) in gammarids during the accumulation (day 0 to 7) and the depuration (day 7 to 14) phases (separated with the black dashed vertical line), (b) measured BDE 47 concentrations (ng g_{org}^{-1}) in gammarids (dots and triangles) and (c) measured (dots) and predicted (plain and dashed curves, from Eq. (4) BDE 99 concentrations (ng g_{org}^{-1}) in radix during the accumulation (day 0 to 7) and the depuration (day 9 to 18) phases separated with the dashed vertical line.

3.2.3 Toxicokinetic data

For gammarid, the model was fitted according to the different exposure sources, accounting for accumulation by leaves or sediment (Eqs. (5) and (6), Ratier et al., 2019).

Given the levels of BDE 99 in *R. auricularia* for the depuration period, elimination could also be neglected ($k_{e,radix}$ = 0), leading to another sub-model of the Eq. (4). Thus, for radix, two sub-models were tested, one considering sediment as the only uptake route and the elimination of the contaminant (Eq. (4)) and the other considering the sediment uptake while ignoring the elimination process (Eq. (4) with $k_{e,radix}$ = 0). For all the tested models, the Gelman criterion was less than 1.01 which showed a negligible MCMC inter-chain variance. The inference process quickly converged, and thin posterior distributions were obtained for each parameter, meaning that data contribute sufficient information to accurately estimate model parameters (**Fig. A.5**). A summary of median model parameter values and their 95% distributions are given in **Table 2**.

For the two tested conditions in gammarid exposure, similar accumulation and elimination kinetics were obtained despite the fact that the BDE 99 levels in spiked leaves were 3.5 times higher (E1 condition, $C_{l,\,E1}$ = 12 ± 2.0 ng g^{-1} dw) than BDE 99 levels in sediment (E2 condition, C_s = 3.4 ± 0.14 ng g^{-1} dw). Model parameters $k_{l,gammarid}$ and $k_{s,gammarid}$ were estimated at 0.012 [0.0090-0.014] and 0.031 [0.025-0.038] g g^{-1} d^{-1} respectively, where $k_{s,gammarid}$ was two times higher than $k_{l,gammarid}$. This result was also observed previously for gammarid exposed to PCB 153 (Ratier et al., 2019). The elimination rate constant was around five times higher than uptake rates from leaves and sediment, which could explain the low BDE 99 bioaccumulation in organisms.

Table 2. Summary of the TK model parameters for the gammarids and radix exposed to BDE 99: priors, median and percentile values determining the 95% credibility interval.

Organism	Model	Parameter	Prior	Median	Percentiles	
					2.5%	97.5%
Gammarus fossarum	Eqs. (5) for E1 condition and (6) for E2 condition	$k_{l,gammarid}$ ($g_l\ g_{org}^{-1}\ d^{-1}$)	Log_{10}-unif (-5, 2)	**0.012**	0.0090	0.014
		$k_{s,gammarid}$ ($g_s\ g_{org}^{-1}\ d^{-1}$)	Log_{10}-unif (-5, 2)	**0.031**	0.025	0.038
		$k_{e,gammarid}$ (d^{-1})	Log_{10}-unif (-5, 2)	**0.22**	0.17	0.28
		σ	Gamma (0.001, 0.001)	**0.040**	0.029	0.061
Radix auricularia	Eq. (4)	k_s ($g_s\ g_{org}^{-1}\ d^{-1}$)	Log_{10}-unif (-5, 2)	**0.030**	0.026	0.036
		k_e (d^{-1})	Log_{10}-unif (-20, 2)	**$1.1\ 10^{-9}$**	$1.4\ 10^{-16}$	0.0080
		σ	Gamma (0.001, 0.001)	**0.39**	0.27	0.67
	Eq. (4) with ($k_{e,radix}$=0)	k_s ($g_s\ g_{org}^{-1}\ d^{-1}$)	Log_{10}-unif (-5, 2)	**0.031**	0.026	0.035
		σ	Gamma (0.001, 0.001)	**0.40**	0.27	0.68

For radix, the DICs values for the both sub-models tested were identical (11.09 for Eq. (4) and 11.07 for Eq. (4) with $k_{e,radix}$=0, Ratier et al. (2019)). As similar results were obtained (i.e., similar marginal posterior distributions for $k_{s,radix}$, predicted concentrations and DIC values), we selected the most parsimonious one (with the fewest parameters), Eq. (4) which neglected elimination process ($k_{e,radix}$=0). The estimated $k_{s,radix}$ (0.030 [0.026-0.036] $g_s\ g_{org}^{-1}\ d^{-1}$) was similar to the one estimated for gammarid experiment. However, *R. auricularia* did not eliminate BDE 99 into clean media, unlike gammarids.

Model fits to experimental data obtained for BDE 99 bioaccumulation in gammarid and radix are presented in **Figure 2** (curves). The model predictions fit the bioaccumulation data well for both species, since only 2 of the 9 and 4 of the 11 measurements for gammarid and radix predictions respectively were outside the 95% credibility band of the predicted data.

As BDE 47 was below LoQ for both species in our laboratory conditions, the hypothesized debromination of BDE 99 to BDE 47 was not observed.

4. Discussion

Biotransformation is an additional way of elimination to include in TK models to prevent overestimation of internal concentrations in biota; addition to that the toxicity could not be completely explained by the parent chemical only. Despite the increase concern about metabolites in aquatic organisms, their inclusion in ERA is still limited, mainly focusing on toxicity and scarcely considered in TK models for aquatic biota, especially for invertebrates. As a reminder, the aims of this study are to investigate the potential bio-isomerization of γ- to α-HBCD and debromination of BDE 99 in to BDE 47 in three invertebrate species.

4.1 HBCD

Few studies had reported HBCD toxicokinetic data in biota (Zegers *et al.* 2005, Szabo *et al.* 2010, 2011, Sanders *et al.* 2013) and more rarely in aquatic biota (Law *et al.* 2006a, Du *et al.* 2012, Zhang *et al.* 2014, Shi *et al.* 2017). The study of Shi *et al.* (2017) is the only one which reports TK data in an aquatic invertebrate, the marine copepod *Tigriopus japonicus.* For freshwater invertebrates, no TK data were reported in literature to our knowledge, especially with an exposure by dietary uptake; this study is the first reported HBCD kinetics in freshwater invertebrates by trophic route. Chironomid had bioaccumulated ΣHBCD twice as more than in

gammarid despite the twice lower HBCD concentration in sediment for the chironomid experiment. This result is consistent with their life traits since chironomids are living in the sediment whereas gammarids are living at its surface, and could be due to their physiology (differences in their k_s or k_e). In our experiments low levels of HBCD were bioaccumulated in chironomid and gammarid despite the environmental concentration exposure applied. Therefore, TK models parameters were not estimated. Higher exposure concentration could be considered in further experiments.

In our study, β-HBCD was below the LoQ in all samples, which is consistent with monitoring studies which indicated that β-HBCD was usually below detection limits in biota (Tomy *et al.* 2004a, Janák *et al.* 2005, Tomy *et al.* 2009, Son *et al.* 2015). The γ-HBCD is the major diastereoisomer detected in organisms exposed to our laboratory conditions, as it was observed for *T. japonicus* (Shi *et al.* 2017). This could be explain by the route of exposure, where γ-HBCD was the dominant diastereoisomer in the medium. This result is in agreement with other studies, where the measurement of HBCDs in the environment (water and sediment) had showed that γ-HBCD was the most abundant HBCD diastereoisomer in abiotic matrixes (Law *et al.* 2014, Koch *et al.* 2015, Lauzent 2017). However, several monitoring studies had reported an increase of the proportions of α-HBCD in shrimps (Janák *et al.* 2005) and bivalves (La Guardia et al. (2012); Sutton et al. (2019)) and a decrease of γ-HBCD proportions. It has been observed that this phenomenon increased with the trophic level (Tomy *et al.* 2004a) and could be explained by the bioisomerization hypothesis or by a selective uptake, as suggested by Law *et al.* (2006a).

In our experiments, we concluded no bioisomerization since γ-HBCD was the major diastereoisomer measured. Additionally, the decrease of γ-HBCD

concentration in gammarid at day 2 is not meaningful due to the proximity of the LoQ, while the presence of α-HBCD does not vary since its concentration was always between the LoD and the LoQ throughout the experiment. Furthermore, Son *et al.* (2015) had observed that low trophic level organisms (as marine invertebrates) showed a high relative proportion for γ-HBCD compared to fish due to their slow effective biotransformation to remove this diastereoisomer. In our study, we supposed that the process of bioisomerization was not observed probably due to (i) relatively low levels of HBCD bioaccumulated in organisms, which could be explained by a concentration dependency as suspected by Du *et al.* (2012) or by a high steric hindrance, and (ii) an inhibition of CYP-450 activity.

4.2 PBDE

Nowadays, few studies about PBDE kinetics are available for aquatic biota (Stapleton *et al.* 2004, Tomy *et al.* 2004b, Drouillard *et al.* 2007, Schultz *et al.* 2007) and particularly for freshwater invertebrates (Leppänen et Kukkonen 2004, Ciparis et Hale 2005, Lebrun *et al.* 2014). The experiments of Leppänen et Kukkonen (2004) and Ciparis et Hale (2005) are the only ones to use spiked sediment as uptake route for PBDE exposure with freshwater invertebrates (*Lumbriculus variegatus*). Lebrun *et al.* (2014) reported for the first time TK data for PBDE (namely BDE-28, 47, 66, 85, 99, 100, 153, 154 and 183) in gammarids. Specifically for BDE 47, they estimated both the uptake and elimination rates from spiked water and leaves.

To our knowledge, our study is the first reporting TK data in gammarid and radix exposed to spiked BDE 99 trophic routes. We used Bayesian inference to simultaneously estimate all the model parameters together to enable a more accurate assessment of uncertainty around model predictions. Thus, as for example, we confirmed that sediment is the major route of contamination for gammarid

exposed to highly hydrophobic compounds such as PCB 153 or BDE 99, since k_s was higher than k_l.

Similar uptake rates were observed for radix and gammarid (k_s = 0.030 g g^{-1}_{org} d^{-1}), which is consistent with their analogous traits of life (biofilm ingestion). These results couldn't be compared to literature since no TK studies were reported for aquatic gastropod to tour knowledge and only one was reported for gammarid exposed by spiked water (Lebrun *et al.* 2014). For *L. variegatus* exposed to BDE 99 spiked sediment (Leppänen et Kukkonen 2004), the uptake rate from sediment was around 0.020 g g^{-1}_{org} d^{-1}, which is similar with our values.

For radix, the elimination rate was fixed at zero, meaning that BDE 99 stay into the organism. This observation is all the more surprising since the uptake rate from sediment of radix is similar with the one estimated for gammarid. This suggests (*i*) an other elimination route, as by faeces, which was not considered and could potentially leading to an underestimation of k_e, (*ii*) an inhibition of some biological functions responsible for the excretion or degradation of contaminants, (*iii*) storage in specific type of lipids which differ from gammarid and (*iv*) a slow detoxification process at low dose of exposure, implying a concentration-dependency detoxification mechanism. As a consequence, the non-elimination of BDE 99 in this specie would imply a more important bioconcentration of this contaminant in its predators.

On another side, the elimination rate of BDE 99 estimated for gammarid was twice lower than the one estimated for *L. variegatus* ($k_e \approx 0.58$ d^{-1}) and 10 times higher than the one estimated for BDE 47for *G. pulex* in the study of Lebrun *et al.* (2014) (k_e = 0.014 - 0.016 d^{-1}). According to existing American and European regulatory authorities, the BDE 47 is considered as very bioaccumulative in gammarids (Arnot et Gobas 2006, Inoue *et al.* 2012). In addition, Schultz *et al.*

(2007) have demonstrated that the elimination of BDE 47 in the Japanese medaka was very slow. Furthermore, there is a very limited data available on the metabolism of PBDEs and their transformation in the environment (Chen *et al.* 2015, Iqbal *et al.* 2017). However with our study, we bring some information for freshwater invertebrates: we measured no significant enrichment of the BDE 47 as expected, despite the potential debromination of BDE 99 to -47 by *G. pulex* (Tlili *et al.* 2012), and in some fish species (Stapleton *et al.* 2004, Tomy *et al.* 2004a). Thus, our results suggest a limited capacity of BDE 99 metabolism in *G. fossarum* and *R. auricularia* ; potentially explained by the same HBCD bioisomerization hypotheses, that is low or inhibition of the biotransformation activity in these species, or due to a concentration-dependency process.

Besides, these results answer to some of the assumptions proposed by Tlili *et al.* (2012), which were (*i*) a preferential metabolism of BDE 99 rather than BDE 47 and (*ii*) a preferential uptake of BDE 47. With regard to our data and those of the literature, assumptions lead to a preferential uptake of BDE 47 rather than a preferential metabolism of BDE 99. Consequently, the global high level of BDE -47 concentrations measured in invertebrates from monitoring studies could come from firstly by the preferential uptake of BDE 47 and then by other PBDE congener's degradation (e.g. from BDE-209 or -153) which is still a few investigated in literature. This study does not exclude the hypothesis of the BDE 99 biotransformation to other metabolites (e.g. OH-/MeOH-PBDEs), which were not studied here (Staskal *et al.* 2006, Yang *et al.* 2017).

5. Conclusions and perspectives

No bio-isomerization of γ- to α-HBCD or debromination of BDE 99 in to BDE 47 were observed in the three invertebrate species selected. The ∑HBCD levels do not exceed 0.76 ng g^{-1} (ww) in organisms. These results are consistent with low environmental contamination found in literature, especially since these BFRs were banned of use. Additionally, TK model parameters for radix and gammarid exposed to BDE 99 were estimated by Bayesian inference. Their median and 95% credibility intervals predictions were given. Similar uptake rates were obtained for radix and gammarid, but snails did not eliminated BDE 99, unlike gammarid. Further investigations are required to explore the hypotheses raised in this study, such as a higher HBCD level of exposure, measurement of CYP-450 biological activity in organisms and measurement of BDE 99 levels in radix faeces.

Conflict of interest
The authors declare no conflict of interest.

Funding sources
This work was supported by the French Agency for Biodiversity.

Acknowledgments
The authors are thankful to Grand Parc Miribel-Jonage for providing the sediment used in experiments.The authors are also grateful to Myriam Arhror and Matthieu Masson (Irstea Lyon, France) for sediment characteristic analysis. The authors are also grateful to anonymous reviewers and to Ms. L. Northrup for editing the manuscript.

References

Abdallah, M. A. E., C. Uchea, J. K. Chipman, and S. Harrad. 2014. Enantioselective biotransformation of hexabromocyclododecane by in vitro rat and trout hepatic sub-cellular fractions. Environmental Science and Technology **48**:2732-2740.

AFNOR. 2010. Determination of the Toxicity of Fresh Water Sediments to Chironomous Riparius - Part 1: Natural Sediments Water Quality.

Amorim, J., I. Abreu, P. Rodrigues, D. Peixoto, C. Pinheiro, A. Saraiva, A. P. Carvalho, L. Guimarães, and L. Oliva-Teles. 2019. Lymnaea stagnalis as a freshwater model invertebrate for ecotoxicological studies. Science of the Total Environment **669**:11-28.

Armitage, P. D. C., P.S. ; Pinder, L.C.V. 1995. The Chironomidae: Biology and ecology of non-biting midges, London.

Arnot, J. A. and F. A. P. C. Gobas. 2006. A review of bioconcentration factor (BCF) and bioaccumulation factor (BAF) assessments for organic chemicals in aquatic organisms. Environmental Reviews **14**:257-297.

Ashauer, R., A. Hintermeister, I. Caravatti, A. Kretschmann, and B. I. Escher. 2010. Toxicokinetic and toxicodynamic modeling explains carry-over toxicity from exposure to diazinon by slow organism recovery. Environmental Science and Technology **44**:3963-3971.

Bernillon, P. and F. Y. Bois. 2000. Statistical issues in toxicokinetic modeling: A Bayesian perspective. Environmental Health Perspectives **108**:883-893.

Bertin, D., P. Labadie, B. J. D. Ferrari, A. Sapin, J. Garric, O. Geffard, H. Budzinski, and M. Babut. 2016. Potential exposure routes and accumulation kinetics for poly- and perfluorinated alkyl compounds for a freshwater amphipod: Gammarus spp. (Crustacea). Chemosphere **155**:380-387.

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

Binelli, A., L. Guzzella, and C. Roscioli. 2008. Levels and congener profiles of polybrominated diphenyl ethers (PBDEs) in Zebra mussels (D. polymorpha) from Lake Maggiore (Italy). Environmental Pollution **153**:610-617.

Chen, D., R. C. Hale, M. J. La Guardia, D. Luellen, S. Kim, and H. N. Geisz. 2015. Hexabromocyclododecane flame retardant in Antarctica: Research stations as sources. Environmental Pollution **206**:611-618.

Cincinelli, A., F. Pieri, T. Martellini, M. Passaponti, M. Del Bubba, S. Del Vento, and A. A. Katsoyiannis. 2014. Atmospheric occurrence and gas-particle partitioning of PBDEs in an industrialised and urban area of Florence, Italy. Aerosol and Air Quality Research **14**:1121-1130.

Ciparis, S. and R. C. Hale. 2005. Bioavailability of polybrominated diphenyl ether flame retardants in biosolids and spiked sediment to the aquatic oligochaete, Lumbriculus variegatus. Environ Toxicol Chem **24**:916-925.

Covaci, A., A. C. Gerecke, R. J. Law, S. Voorspoels, M. Kohler, N. V. Heeb, H. Leslie, C. R. Allchin, and J. De Boer. 2006a. Hexabromocyclododecanes (HBCDs) in the environment and humans: A review. Environmental Science and Technology **40**:3679-3688.

Covaci, A., A. Gheorghe, O. Hulea, and P. Schepens. 2006b. Levels and distribution of organochlorine pesticides, polychlorinated biphenyls and polybrominated diphenyl ethers in sediments and biota from the Danube Delta, Romania. Environmental Pollution **140**:136-149.

Covaci, A. and G. Malarvannan. 2016. Brominated flame retardants. Pages 379-410 Handbook of Environmental Chemistry. Springer Verlag.

de Wit, C. A. 2002. An overview of brominated flame retardants in the environment. Chemosphere **46**:583-624.

Directive, U. 2013. Directive of the European Parliament and the Council of the European Union for Environmental Quality Standards in the Field of Water Policy (WFD). Official Journal of European Communities.

Dong, L., L. Zheng, S. Yang, Z. Yan, W. Jin, and Y. Yan. 2017. Deriving freshwater safety thresholds for hexabromocyclododecane and comparison of toxicity of brominated flame retardants. Ecotoxicology and Environmental Safety **139**:43-49.

Drouillard, K. G., S. Chan, S. O'Rourke, G. Douglas Haffner, and R. J. Letcher. 2007. Elimination of 10 polybrominated diphenyl ether (PBDE) congeners and selected polychlorinated biphenyls (PCBs) from the freshwater mussel, Elliptio complanata. Chemosphere **69**:362-370.

Du, M., L. Lin, C. Yan, and X. Zhang. 2012. Diastereoisomer- and enantiomer-specific accumulation, depuration, and bioisomerization of hexabromocyclododecanes in Zebrafish (Danio rerio). Environmental Science and Technology **46**:11040-11046.

Hong, S., J. S. Khim, J. Park, H.-S. Son, S.-D. Choi, K. Choi, J. Ryu, C.-Y. Kim, G. S. Chang, and J. P. Giesy. 2014. Species- and tissue-specific bioaccumulation of arsenicals in various aquatic organisms from a highly industrialized area in the Pohang City, Korea. Environmental Pollution **192**:27-35.

Inoue, Y., N. Hashizume, T. Yoshida, H. Murakami, Y. Suzuki, Y. Koga, R. Takeshige, E. Kikushima, N. Yakata, and M. Otsuka. 2012. Comparison of Bioconcentration and Biomagnification Factors for Poorly Water-Soluble Chemicals Using Common Carp (Cyprinus carpio L.). Archives of Environmental Contamination and Toxicology **63**:241-248.

Iqbal, M., J. H. Syed, A. Katsoyiannis, R. N. Malik, A. Farooqi, A. Butt, J. Li, G. Zhang, A. Cincinelli, and K. C. Jones. 2017. Legacy and emerging flame retardants (FRs) in the freshwater ecosystem: A review. Environmental Research **152**:26-42.

Janák, K., A. Covaci, S. Voorspoels, and G. Becher. 2005. Hexabromocyclododecane in Marine Species from the Western Scheldt Estuary: Diastereoisomer- and Enantiomer-Specific Accumulation. Environmental Science & Technology **39**:1987-1994.

Kim, U. J., N. T. H. Yen, and J. E. Oh. 2014. Hydroxylated, methoxylated, and parent polybrominated diphenyl ethers (PBDEs) in the inland environment, Korea, and

potential OH- and MeO-BDE source. Environmental Science and Technology **48**:7245-7253.

Koch, C., T. Schmidt-Kötters, R. Rupp, and B. Sures. 2015. Review of hexabromocyclododecane (HBCD) with a focus on legislation and recent publications concerning toxicokinetics and -dynamics. Environmental Pollution **199**:26-34.

Lauzent, M. 2017. Study of ecodynamic persistent organic pollutants and emerging interest halogenated micropollutants in aquatic environments. Université de Bordeaux.

Law, K., V. P. Palace, T. Halldorson, R. Danell, K. Wautier, B. Evans, M. Alaee, C. Marvin, and G. T. Tomy. 2006a. Dietary accumulation of hexabromocyclododecane diastereoisomers in juvenile rainbow trout (Oncorhynchus mykiss) I: Bioaccumulation parameters and evidence of bioisomerization. Environmental Toxicology and Chemistry **25**:1757-1761.

Law, R. J., M. Alaee, C. R. Allchin, J. P. Boon, M. Lebeuf, P. Lepom, and G. A. Stern. 2003. Levels and trends of polybrominated diphenylethers and other brominated flame retardants in wildlife. Environment International **29**:757-770.

Law, R. J., C. R. Allchin, J. de Boer, A. Covaci, D. Herzke, P. Lepom, S. Morris, J. Tronczynski, and C. A. de Wit. 2006b. Levels and trends of brominated flame retardants in the European environment. Chemosphere **64**:187-208.

Law, R. J., A. Covaci, S. Harrad, D. Herzke, M. A. E. Abdallah, K. Fernie, L. M. L. Toms, and H. Takigami. 2014. Levels and trends of PBDEs and HBCDs in the global environment: Status at the end of 2012. Environment International **65**:147-158.

Lebrun, J. D., D. Leroy, A. Giusti, C. Gourlay-Francé, and J. P. Thomé. 2014. Bioaccumulation of polybrominated diphenyl ethers (PBDEs) in Gammarus pulex: Relative importance of different exposure routes and multipathway modeling. Aquatic Toxicology **154**:107-113.

Lebrun, J. D., M. Perret, A. Geffard, and C. Gourlay-Francé. 2012. Modelling copper bioaccumulation in Gammarus pulex and alterations of digestive metabolism. Ecotoxicology **21**:2022-2030.

Leppänen, M. T. and J. V. K. Kukkonen. 2004. Toxicokinetics of sediment-associated polybrominated diphenylethers (flame retardants) in benthic invertebrates (Lumbriculus variegatus, oligochaeta). Environmental Toxicology and Chemistry **23**:166-172.

Li, P., H. Wu, Q. Li, J. Jin, and Y. Wang. 2015. Brominated flame retardants in food and environmental samples from a production area in China: concentrations and human exposure assessment. Environmental Monitoring and Assessment **187**.

Luo, X. J., W. Ruan, Y. H. Zeng, H. Y. Liu, S. J. Chen, J. P. Wu, and B. X. Mai. 2013. Trophic dynamics of hexabromocyclododecane diastereomers and enantiomers in fish in a laboratory feeding study. Environmental Toxicology and Chemistry **32**:2565-2570.

MacKay, D. and A. Fraser. 2000. Bioaccumulation of persistent organic chemicals: Mechanisms and models. Environmental Pollution **110**:375-391.

Ming, S. J. H. 2006. Bioavailability of Heavy Metals in Water. Water Purification Technology.

Morrison, H. A., F. A. P. C. Gobas, R. Lazar, and G. D. Haffner. 1996. Development and Verification of a Bioaccumulation Model for Organic Contaminants in Benthic Invertebrates. Environmental Science & Technology **30**:3377-3384.

OECD. 2004. Sediment-Water Chironomid Toxicity Test Using Spiked Sediment. In: OECD Guidelines for the Testing of Chemicals. Pages 1-21.

Olukunle, O. I. and O. J. Okonkwo. 2015. Concentration of novel brominated flame retardants and HBCD in leachates and sediments from selected municipal solid waste landfill sites in Gauteng Province, South Africa. Waste Management **43**:300-306.

Plummer, M. 2016. rjags: Bayesian Graphical Models using MCMC.

R Core Team. 2017. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria.

Ratier, A., C. Lopes, P. Labadie, H. Budzinski, N. Delorme, H. Quéau, L. Peluhet, O. Geffard, and M. Babut. 2019. A Bayesian framework for estimating parameters of a generic toxicokinetic model for the bioaccumulation of organic chemicals by benthic invertebrates: Proof of concept with PCB 153 and two freshwater species. Ecotoxicology and Environmental Safety **180**:33-42.

Sanders, J. M., G. A. Knudsen, and L. S. Birnbaum. 2013. The fate of β-hexabromocyclododecane in female C57BL/6 mice. Toxicological Sciences **134**:251-257.

Schultz, I. R., S. Reed, A. Pratt, and A. D. Skillman. 2007. Quantitative oral dosing of water soluble and lipophilic contaminants in the Japanese medaka (Oryzias latipes). Comparative Biochemistry and Physiology - C Toxicology and Pharmacology **145**:86-95.

Shi, D., D. Lv, W. Liu, R. Shen, D. Li, and H. Hong. 2017. Accumulation and developmental toxicity of hexabromocyclododecanes (HBCDs) on the marine copepod Tigriopus japonicus. Chemosphere **167**:155-162.

Son, M. H., J. Kim, E. S. Shin, S. H. Seo, and Y. S. Chang. 2015. Diastereoisomer- and species-specific distribution of hexabromocyclododecane (HBCD) in fish and marine invertebrates. Journal of Hazardous Materials **300**:114-120.

Stapleton, H. M., R. J. Letcher, and J. E. Baker. 2004. Debromination of Polybrominated Diphenyl Ether Congeners BDE 99 and BDE 183 in the Intestinal Tract of the Common Carp (Cyprinus carpio). Environmental Science and Technology **38**:1054-1061.

Staskal, D. F., H. Hakk, D. Bauer, J. J. Diliberto, and L. S. Birnbaum. 2006. Toxicokinetics of polybrominated diphenyl ether congeners 47, 99, 100, and 153 in Mice. Toxicological Sciences **94**:28-37.

Szabo, D. T., J. J. Diliberto, H. Hakk, J. K. Huwe, and L. S. Birnbaum. 2010. Toxicokinetics of the flame retardant hexabromocyclododecane gamma: Effect of dose, timing, route, repeated exposure, and metabolism. Toxicological Sciences **117**:282-293.

Szabo, D. T., J. J. Diliberto, H. Hakk, J. K. Huwe, and L. S. Birnbaum. 2011. Toxicokinetics of the flame retardant hexabromocyclododecane alpha: Effect of dose, timing, route, repeated exposure, and metabolism. Toxicological Sciences **121**:234-244.

Tlili, K., P. Labadie, C. Bourges, A. Desportes, and M. Chevreuil. 2012. Bioaccumulation of polybrominated diphenyl ethers by the freshwater benthic amphipod gammarus pulex. Archives of Environmental Contamination and Toxicology **63**:69-76.

Tomy, G. T., W. Budakowski, T. Halldorson, D. M. Whittle, M. J. Keir, C. Marvin, G. Macinnis, and M. Alaee. 2004a. Biomagnification of α- and γ-Hexabromocyclododecane Isomers in a Lake Ontario Food Web. Environmental Science and Technology **38**:2298-2303.

Tomy, G. T., V. P. Palace, T. Halldorson, E. Braekevelt, R. Danell, K. Wautier, B. Evans, L. Brinkworth, and A. T. Fisk. 2004b. Bioaccumulation, Biotransformation, and Biochemical Effects of Brominated Diphenyl Ethers in Juvenile Lake Trout (Salvelinus namaycush). Environmental Science and Technology **38**:1496-1504.

Tomy, G. T., K. Pleskach, S. H. Ferguson, J. Hare, G. Stern, G. Macinnis, C. H. Marvin, and L. Loseto. 2009. Trophodynamics of some PFCs and BFRs in a western Canadian Arctic marine food web. Environmental Science and Technology **43**:4076-4081.

Van Ael, E., A. Covaci, R. Blust, and L. Bervoets. 2012. Persistent organic pollutants in the Scheldt estuary: Environmental distribution and bioaccumulation. Environment International **48**:17-27.

Viganò, L., C. Roscioli, C. Erratico, L. Guzzella, and A. Farkas. 2009. Polybrominated diphenyl ethers (PBDEs) in gammarids, caddisflies, and bed sediments of the lowland River Po. Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology **82**:200-205.

Watanabe, I. and S.-i. Sakai. 2003. Environmental release and behavior of brominated flame retardants. Environment International **29**:665-682.

Yang, J., H. Zhao, and K. M. Chan. 2017. Toxic effects of polybrominated diphenyl ethers (BDE 47 and 99) and localization of BDE 99–induced cyp1a mRNA in zebrafish larvae. Toxicology Reports **4**:614-624.

Zegers, B. N., A. Mets, R. Van Bommel, C. Minkenberg, T. Hamers, J. H. Kamstra, G. J. Pierce, and J. P. Boon. 2005. Levels of hexabromocyclododecane in harbor porpoises and common dolphins from western European seas, with evidence for stereoisomer-specific biotransformation by cytochrome P450. Environmental Science and Technology **39**:2095-2100.

Zhang, Y., H. Sun, and Y. Ruan. 2014. Enantiomer-specific accumulation, depuration, metabolization and isomerization of hexabromocyclododecane (HBCD) diastereomers in mirror carp from water. Journal of Hazardous Materials **264**:8-15.

Zhao, G., Z. Wang, M. H. Dong, K. Rao, J. Luo, D. Wang, J. Zha, S. Huang, Y. Xu, and M. Ma. 2008. PBBs, PBDEs, and PCBs levels in hair of residents around e-waste disassembly sites in Zhejiang Province, China, and their potential sources. Science of the Total Environment **397**:46-57.

5.3 MATERIEL SUPPLEMENTAIRE

Supplementary material

Bioaccumulation of Brominated Flame Retardants (BFRs) and their potential biotransformation by freshwater invertebrates.

Aude Ratier[a], Christelle Lopes[b,*], Véronique Duvillard[a], Pierre Labadie[c], Hélène Budzinski[c], Olivier Geffard[a], Marc Babut[a].

[a] Irstea, UR RiverLy, centre de Lyon-Villeurbanne, 5 Avenue de la Doua, CS20244, 69625 Villeurbanne Cedex, France.

[b] Univ Lyon, Université Lyon 1, CNRS, Laboratoire de Biométrie et Biologie Evolutive UMR5558, F-69622 Villeurbanne, France.

[c] CNRS, Environnements et Paléoenvironnements Océaniques et Continentaux (EPOC), UMR 5805, Laboratoire de Physico- et Toxico-Chimie de l'environnement (LPTC), Université de Bordeaux, 351 cours de la Libération, 33405 Talence, France.

[*] Corresponding author: christelle.lopes@univ-lyon1.fr

Appendix A – Quality control of analyses and LoD/LoQ

The limit of detection (LoD) was determined as the concentration with a signal-to-noise ratio of 3. For water samples, the LoD were between 0.07-0.53, 0.18-0.71 and 0.10-0.48 ng L^{-1} for α-β-γ-HBCD and between 0.04 and 0.09 ng L^{-1} for BDE 99. For solid matrix, the LoD were between 0.19-1.24, 0.14-0.55 and 0.39-1.62 ng g^{-1} dw for α-β-γ-HBCD, between 0.03 and 0.1 ng g^{-1} dw for BDE 99 and -47. If the value was under the LoD, we consider it a zero.

Native ΣHBCD and BDE 99 recovery was determined using spiked samples for water (103, 98 and 114% for α-β-γ-HBCD and 91% for BDE 99), technical sand (90 ± 7, 74 ± 10 and 85 ± 12% for α-β-γ-HBCD (n=6), 93 ± 5.2% for BDE 99 (n=8) and 94.5 ± 13.3% for BDE 47 (n=8)), mussel tissue (NIST SRM2947a Organics in Freeze-Dried *Mytilus edulis*, 107 ± 57 and 70 ± 47 % for α-β-HBCD (n=3) and 79.5 ± 16.2% for BDE 99 (n=2)) reference materials. In addition, homemade reference materials for BDE 99 and -47 using spiked leaves and gammarid were analyzed to obtain chemicals recoveries (respectively for leaves and gammarid 90.7 ± 4.0% and 104 ± 7.5% for BDE 99 (n=3) and 95.7 ± 5.0% and 109 ± 8.4% for BDE 47 (n=3)).

Replicate procedural blanks (respectively for water and solid matrix, n=2 and 6 for HBCD and n=4 and 9 for BDE 99) were analyzed for each series of samples where the ΣHBCD and BDE 99 concentration was always below the LoD.

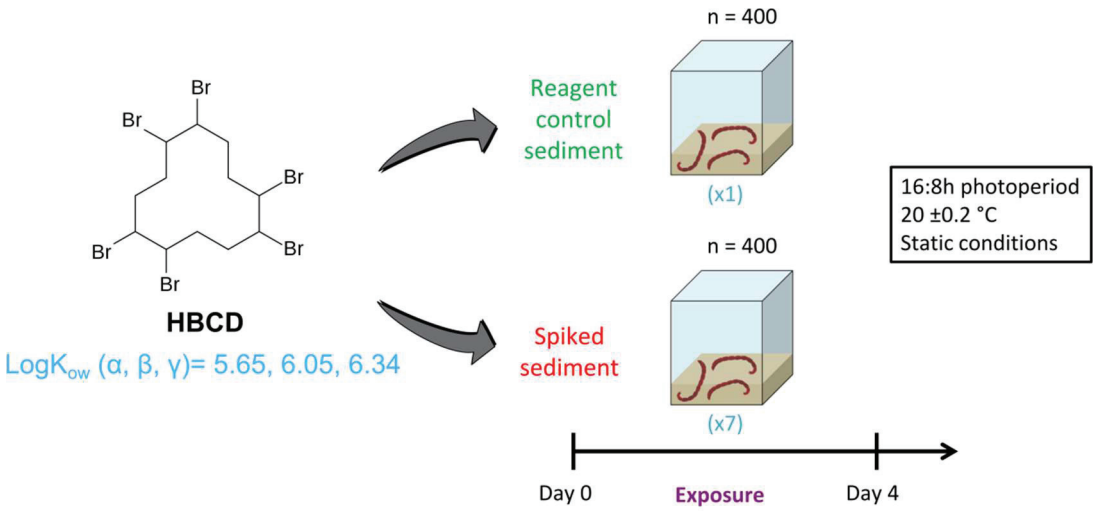


Figure A.1. Experimental design for chironomid exposed to HBCD commercial mixture spiked sediment.

Appendix B. Groundwater characteristics

Parameter	Unit	Value
HCO_3^-	mg/L	217
SiO_2		6.40
COT		2.40
Cl^-		11.5
SO_4^{2-}		36.2
Na^+		8.8
K^+		2.0
Mg^{2+}		7.1
Ca^{2+}		75.5
NH_4^+		< 0.02
NO_2^-		< 0.05
NO_3^-		7.0
PO_4^{3-}		< 0.10
pH	-	8.1
Conductivity	µS	443

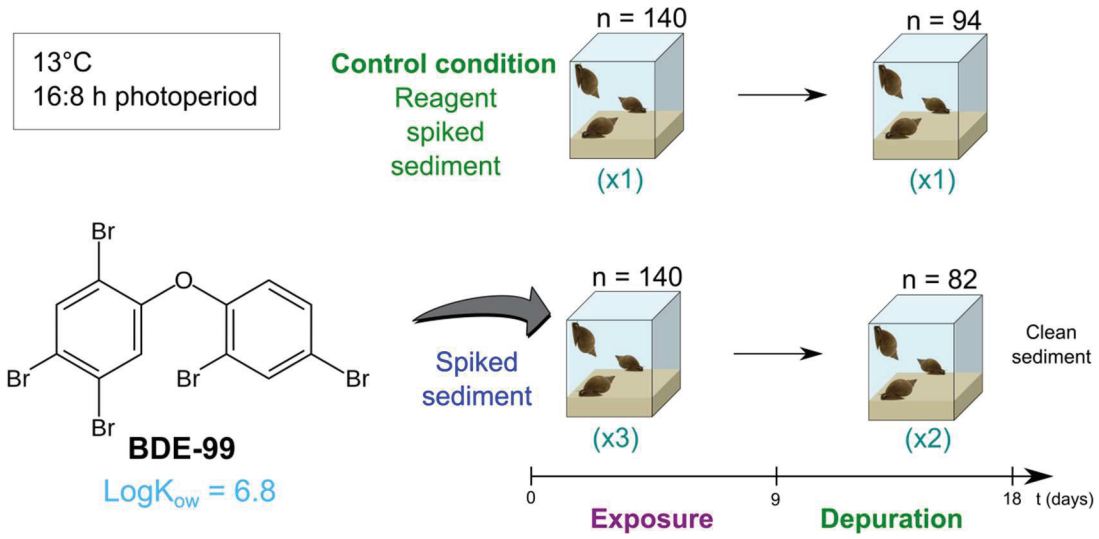


Figure A.2. Experimental design for radix exposed to BDE 99 spiked sediment.

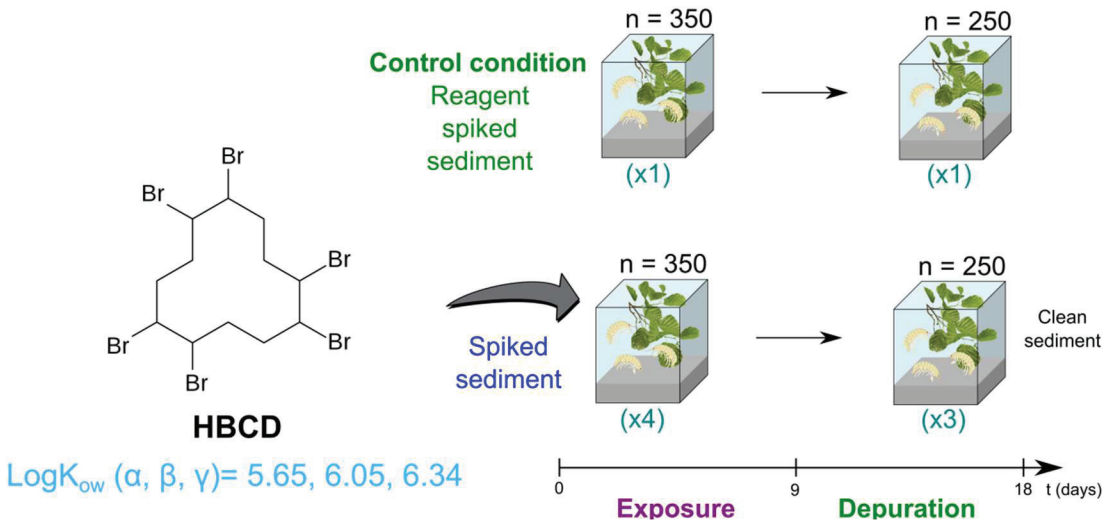
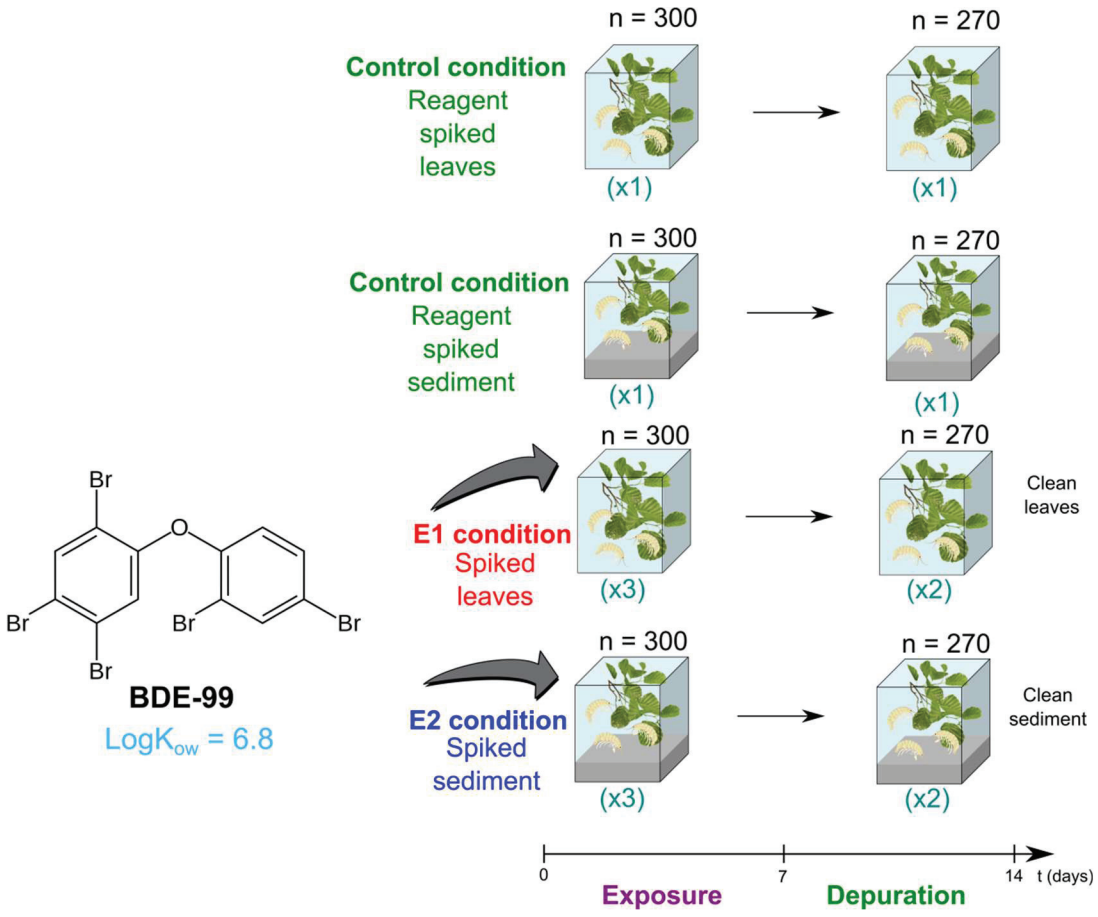


Figure A.3. Experimental design for gammarid exposed to HBCD commercial mixture spiked sediment.



FigureA.4. Experimental design for gammarid exposed to BDE 99 spiked leaves (E1 condition) or sediment (E2 condition).

Appendix C. Water samples analyses details.

For HBCD analyses, the injection volume was set at 100 µL and the separation was performed at a flow rate of 0.5 mL min^{-1} under gradient elution conditions using MeOH / MilliQ water (70/30; v/v) (A) and ACN (B). Gradient elution was from 35 % A to 0 % A in 3 min, kept isocratic for 1 min, 0 % A at 4.0 min to 90 % A at 4.5 min and kept isocratic for 2.5 min. Electrospray ionization was performed in the negative mode. Mass spectrometer parameters were: source temperature 150°C; desolvatation gas flow 15 L min^{-1} ; capillary voltage 3,000 V. Quantification was achieved by internal standard calibration, using a five-point calibration curve covering the concentration range 0 to 1,000 ng L^{-1} for HBCD isomers.

For PBDE analyses, the vector gas used was helium at a debit of 1.3 mL min^{-1} and nitrogen as auxiliary gas at a debit of 60 mL min^{-1}. Injector temperature was fixed at 300 °C and detector temperature at 300 °C. Kiln temperature program was: 80 °C during 2 min, 10 °C min^{-1} up to 290°C, 35 °C min^{-1} up to 315°C. The injection volume was set at 1 µL. BDE 99 and -47 were quantified relative to internal standard (F-BDE 47).

Appendix D. Solid samples analyses details.

For HBCD analyses, the injection volume was set at 5 µL and the separation was performed at a flow rate of 0.3 mL min^{-1} under gradient elution conditions using MeOH / MilliQ water (70/30; v/v) (A) and ACN (B). Gradient elution was from 90 % A to 0 % A in 4.75 min, kept isocratic for 1.25 min, 0 % A at 6 min to 90 % A at 6.10 min and kept isocratic for 2.90 min. Electrospray ionization was performed in the negative mode. Mass spectrometer parameters were: source temperature 120°C; desolvatation temperature 450°C; desolvatation gas flow 800 L h^{-1} ; capillary voltage 2,600 V; cone gas flow 50 L h^{-1}, cone voltage 20 V ; collision energy 10 eV. The mass spectrometer was operated in selected reaction monitoring mode (SRM) and the following SRM transitions were monitored: 640.5 > 80.9 and 640.5 > 78.9 for transition of quantification and confirmation of HBCD diastereoisomers respectively. The transition of quantification and confirmation of 13C12-α-HBCD were 652.6 > 80.9 *m/z* and 652.6 > 78.9 *m/z* respectively. Quantification was achieved by internal standard calibration, using a five-point calibration curve covering the concentration range 0 to 35 ng g^{-1} for HBCD isomers.

Appendix E. Prior distributions and implementation of the models.

We assumed a gaussian distribution of the contaminant concentration into the organism:

$$C_{obs}(t) \sim N(C(t), \sigma) \qquad \text{(A.S5)}$$

Where N stands for the Normal law, $C_{obs}(t)$ correspond to the contaminant concentration into the organism at time t measured during the experiments, $C(t)$ is the contaminant concentration at time t predicted by the model, and σ is the standard deviation of contaminant concentration into the organism.

To our knowledge, our study is the first to report chironomid, gammarid or radix exposures to HBCD or BDE 99 spiked sediment in controlled conditions. As a result, we used a non-informative (-5, 2) $\log_{10}$-uniform prior for uptake and elimination rate constants ($k_{s,chironomid}$, $k_{s,radix}$, $k_{s,gam}$, $k_{l,gam}$, $k_{e,gam}$ and $k_{e,chironomid}$). We used a $\log_{10}$-normal (0.236, 2) prior for k_g (in d^{-1}) according to Péry *et al.* (2002), corresponding to a growth rate of 1.72 d^{-1}. Priors for L_0 and L_{max} were assumed to follow $\log_{10}$-normal distributions and were set, respectively, at (0.778, 0.64; in days) corresponding to an initial size of 6.0 mm, and (1.056, 0.64; in days) corresponding to a mean limit size of 11.4 mm (Péry *et al.* 2002). We assumed a non-informative (0.001, 0.001) gamma prior for the precision, which is one of the most common priors for variance parameters (Lambert, 2005; Richards and Chaloupka, 2009).

For gammarids exposed to BDE 99, 300,000 iterations were realized after discarding the first 10,000 iterations. Samples from every 85th iteration were stored to reduce autocorrelation in the sample. For radix exposed to BDE 99, 11,238 iterations were realized after discarding the first 20,000 iterations. Samples from

every 3th iteration were stored to reduce autocorrelation in the sample. To monitor the convergence of the chains, we used a visual inspection as well as the Gelman criteria (Gelman, 1995).

From the joint posterior distribution, we can obtain the marginal posterior distribution for each parameter, which can be summarized by the mean or median and standard deviation. The accuracy of model parameter estimation can be visualized by comparing prior and posterior distributions: a thin posterior distribution reflects that data brought enough information to precisely estimate parameters. To check the relevance of model predictions, we represent, for each experiment, observed data superimposed to the model simulated with the median of the posterior distribution for each parameter and the 95% credibility band of the predicted data considering parameter uncertainties and stochasticity. To obtain the 95% credibility band, the predicted data were simulated with the model for each MCMC iteration and the stochastic model considered for observed data (Eq. (A.S5)).

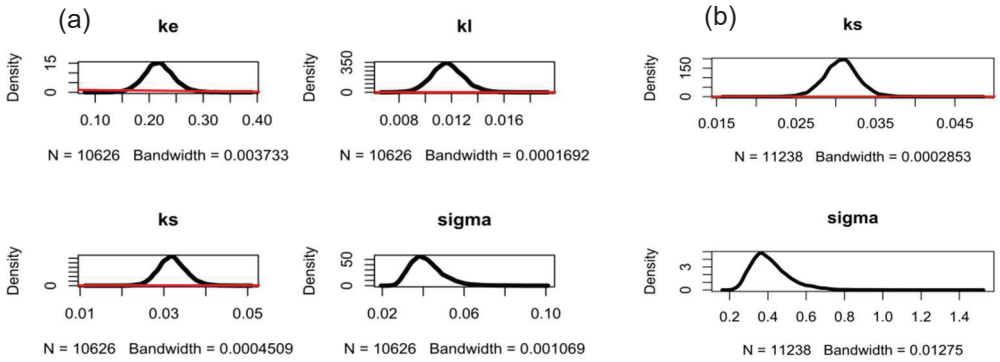


Figure A.5. Prior (red curve) and posterior (black curve) distributions obtained for model parameters when (a) gammarids and (b) radix were exposed to BDE 99.

Appendix F. Data files and R Codes of the models (R software (version 3.3.3 2017-03-06))

R Codes and corresponding .csv data files are available on DOI

5.4 NOTE 3 : COMPARAISON AVEC DES DONNEES *IN SITU*

5.4.1 Introduction

Etant donné que le cadre de modélisation présenté dans ce manuscrit a été développé en s'appuyant uniquement sur des données expérimentales acquises en conditions contrôlées, la question se pose de sa pertinence vis-à-vis de données « de terrain » (*in situ*), obtenues en conditions non contrôlées. Cette question, quoique légitime, ne devait en principe pas être abordée directement dans le cadre de cette thèse, mais quelques données issues d'observation de terrain sont disponibles pour les PBDE et l'HBCD (Babut *et al.* 2016b). Il m'a paru intéressant de comparer les données mesurées *in situ* et les données obtenues au laboratoire (article 3). Par ailleurs, il m'a semblé pertinent d'examiner si les modèles développés dans le cadre de ce chapitre (gammares exposés au BDE 99) permettent de relier les concentrations observées dans les sédiments et celles mesurées dans les organismes *in situ*.

5.4.2 Matériels et méthodes

Les données disponibles (Babut *et al.* 2016b) concernent :

- des mesures ponctuelles d'HBCD dans les sédiments de 3 sites (ADB : Andrézieux-Bouthéon, LUY : Luynes, TIJ : Tignieu-Jameyzieux) ;
- des mesures ponctuelles de PBDE dans les sédiments de 5 sites (TIJ, BOL : Le Bourget-du-Lac, FLO : Fleurey-sur-Ouche, MRG : St-Maurice de Gourdan, VAT : Viriat), mais dont seulement deux dépassent la limite de détection ;
- des mesures d'HBCD et de PBDE dans des organismes encagés aux mêmes sites, à savoir des chironomes (*C. riparius*) et des gammares (*G. fossarum* ou mélange *G. fossarum/G. pulex*). A noter que les organismes encagés ne sont pas exposés directement au sédiment des sites d'étude, mais aux matières en suspension ;
- des mesures d'HBCD et de PBDE, dont le BDE 99, dans des invertébrés collectés sur ces mêmes sites ; dans le cas du BDE 99, les gammares étaient présents sur tous les sites (une campagne en juin), les chironomes (espèce indéterminée) sur un seul site.

Pour prédire les concentrations observées en BDE 99 dans les gammares encagés à partir de celles mesurées dans les sédiments *in situ*, l'équation 6 de l'article 3 et les distributions marginales des paramètres correspondantes ont été utilisées (voir article 3).

5.4.3 Résultats et discussion

Les concentrations mesurées dans les différentes matrices sont présentées dans le **Tableau 16**. Les concentrations mesurées dans les sédiments de ces différents sites sont plus faibles (facteur 5 à 10) que celle du sédiment enrichi au laboratoire (3 ng g^{-1} ps) pour le BDE 99, tandis que pour l'HBCD deux sites (ADB et LUY) présentent des concentrations du même ordre de grandeur que la concentration du sédiment enrichi (ΣHBCD 13,5 ng g^{-1} ps), et le troisième site est encore plus contaminé, environ d'un facteur 3.

Tableau 16. Contamination observée et prédite (moyenne puis intervalle de crédibilité à 95 % entre crochets) *in situ* (sédiment, invertébrés autochtones et encagés) pour l'HBCD et le BDE 99 (na : non analysé, n.d : non détecté).

Site[13]	**Sédiment** (ng g^{-1} ps)	**Chironome** (ng g^{-1} pf)		**Gammare** (ng g^{-1} pf)		
		in situ	*encagé*	*in situ*	*encagé*	*Prédictions (jour 7)*
HBCD						
ADB	9,19	0,33	9,13	na	1,05	-
LUY	10,35	0,44	0,21	2,74	0,84	-
TIJ	39,95	na	9,83	2,76	0,69	-
BDE 99						
BOL	n.d	0,151	0,078	0,175	0,119	
FLO	n.d	na	0,019	n.d	0,012	
MRG	n.d	na	n.d	0,025	0,052	
TIJ	0,32	na	0,396	0,887	0,387	0,039 [0,034-0,043]
VAT	0,70	na	0,237	0,513	0,284	0,085 [0,075-0,095]

Les teneurs en ΣHBCD dans les chironomes et gammares exposés au laboratoire (cf. Figure 1 de l'article 3) ont atteint 0,760 et 0,12 ng g^{-1} pf respectivement au bout de 4 et 9 jours. Les concentrations (ΣHBCD) observées chez les chironomes autochtones présentent un niveau de contamination légèrement inférieur (0,38 ± 0,08 ng g^{-1} pf) aux concentrations observées au laboratoire (0,76 ng g^{-1} pf), où le sédiment était moins contaminé (4,83 ± 1,67 ng g^{-1} ps). Les concentrations dans les chironomes encagés sont comprises entre 0,21 ng g^{-1} pf et 9,83 ng g^{-1} pf, plus élevées (facteur 13) pour deux des trois sites que les chironomes exposés au laboratoire. Bien qu'au site TIJ la concentration dans le sédiment soit environ 4 fois plus élevée qu'au site LUY, les niveaux d'accumulation chez les chironomes encagés sur ces deux sites sont similaires.

Les concentrations (ΣHBCD) observées chez les gammares autochtones pour les sites

[13] Le détail des différents sites est disponible dans le rapport cité (Babut *et al.* 2016b).

de TIJ et LUY, qui présentent un niveau de contamination du sédiment supérieur ou proche de celui du sédiment enrichi au laboratoire (9,82 ± 2,83 ng g^{-1} ps), sont plus élevées (autour de 2,7 ng g^{-1} pf) que les concentrations observées au laboratoire. Les concentrations dans les gammares encagés sont comprises entre 0,7 ng g^{-1} pf et 1,05 ng g^{-1} pf, soit 5 à 10 fois celles mesurées au laboratoire.

De même, la concentration mesurée en BDE 99 dans les gammares exposés au laboratoire est égal à 0,43 ng g^{-1} pf au bout de 7 jours (cf. Figure 2 de l'article 3, condition E2) pour un sédiment contaminé à 3,4 ± 0,14 ng g^{-1} ps, soit une concentration légèrement plus basse que les gammares autochtones, et du même ordre de grandeur que les gammares encagés (**Tableau 16**).

Les prédictions du modèle concernent les gammares encagés exposés au BDE 99. Pour deux sites (TIJ et VAT), la concentration dans le sédiment a été mesurée. De ce fait, j'ai utilisé les distributions marginales de chacun des paramètres du modèle précédemment obtenues dans l'article 3, pour prédire la concentration en BDE 99 dans les organismes encagés après 7 jours, en remplaçant la concentration en BDE 99 du sédiment utilisé au laboratoire par celle mesurée *in situ*. Les concentrations prédites sont, respectivement pour les sites VAT et TIJ, 3 et 10 fois plus faibles que celles mesurées dans les gammares encagés (**Tableau 16**). De plus, les concentrations mesurées dans les gammares encagées ne sont pas dans les intervalles de crédibilité à 95 % des prédictions du modèle.

Plusieurs hypothèses peuvent être évoquées pour expliquer ces différences de dynamique d'accumulation :

- Les conditions d'exposition ne sont pas les mêmes, notamment la durée. Les gammares autochtones pourraient avoir atteint l'équilibre avec le milieu étant probablement exposés plus longtemps, bien qu'aucune donnée n'est disponible concernant leur histoire de vie et leur temps de résidence. De plus, les données concernant des organismes autochtones sont des données ponctuelles, une mesure correspondant à une durée d'exposition non définie. Les données des organismes encagés sont également des données ponctuelles, là où il faudrait des données au cours du temps. Par ailleurs, les organismes autochtones et encagés peuvent avoir des sources de contamination différentes (e.g. variabilité des sources d'alimentation exploitées), ce qui pourrait expliquer les différences de niveaux de contamination.

- Le taux de matière organique des sédiments module la disponibilité des composés hydrophobes (Di Toro *et al.* 1991). Malheureusement, ni la perte au feu, ni le taux de carbone organique n'ont été mesurés pour ces sites au moment de la collecte des échantillons et de la mise en place des organismes encagés. Le taux de carbone organique particulaire du sédiment utilisé pour les tests au laboratoire était compris entre 2,4 % et 12 % selon les dates de prélèvement (médiane 3,4 %), soit des taux comparables ou inférieurs à ceux rapportés aux sites LUY et TIJ dans le cadre du réseau de contrôle de surveillance de la DCE[14]. D'autres facteurs environnementaux peuvent également être suspectés, comme l'influence de la température sur les teneurs mesurées dans les organismes.

- Un effet de l'espèce ou de la population sur les concentrations observées peut également être suspecté : dans la présente étude, nous avons utilisé exclusivement *G. fossarum* provenant d'un site exempt de contamination, tandis que dans l'étude de terrain, les gammares encagés provenaient d'un site peu ou pas exposé où cohabitent *G. fossarum* et *G. pulex*, alors que les gammares autochtones pouvaient appartenir à diverses espèces du genre *Gammarus*.

5.4.4 Conclusion

Les gammares et chironomes sur le terrain semblent bioaccumuler le BDE 99 et l'HBCD de manière plus importante que ceux exposés au laboratoire. En l'état des données disponibles, il n'est pas possible de conclure sur les causes de ces différences. Une approche exploratoire pourrait néanmoins être testée en étudiant la biodisponibilité des contaminants à travers la variation du taux de MO, en utilisant une démarche similaire à celle développée dans cette thèse.

[14] Les données du taux de MO dans les sédiments des sites LUY et TIJ sont disponibles sur le site internet suivant : http://sierm.eaurmc.fr/surveillance/eaux-superficielles/index.php

5.5 NOTE 4 : TAUX D'INGESTION ET EFFICACITE D'ASSIMILATION

5.5.1 Introduction

Le cadre de modélisation développé dans les chapitres précédents considérait le taux d'absorption à partir de la nourriture comme une seule composante, ne distinguant pas le taux d'ingestion et l'efficacité d'assimilation comme initialement proposé dans le modèle original (Eq.(3)).

Le taux d'ingestion (IR) correspond à la quantité moyenne de nourriture que peut ingérer un individu. Le taux d'ingestion varie selon le mode d'alimentation des espèces, et aussi selon la concentration de nourriture ou la masse de l'organisme (Reinfelder *et al.* 1998). Une formule empirique reliant IR à la masse des organismes et à la teneur en matière organique (Eq. (27)) est parfois utilisée pour les organismes ingérant des particules de sédiment pour se nourrir (Casado-Martinez *et al.* 2009a) :

$$IR = 0{,}435 \times W^{0{,}771} \times MO^{-0{,}920} \qquad (27)$$

où MO désigne la fraction de matière organique dans le sédiment ingéré (mg) et W le poids sec de l'organisme (mg).

D'autres approches impliquent le marquage de la nourriture avec des composés radioactifs (Hirabayashi 1998) ou fluorescents (Romito *et al.* 2010), ou encore la dissection et pesée des tubes digestifs sur microbalance (Brooke *et al.* 1996).

L'efficacité d'assimilation (AE) est un processus physiologique, résultant du passage d'un contaminant à travers la membrane digestive. Elle varie en fonction de l'espèce et du contaminant (Reinfelder *et al.* 1998). Ce paramètre est difficile à estimer expérimentalement puisque cela requiert (*i*) l'utilisation de composés marqués nécessitant des équipements spécialisés et qui a surtout été appliquée aux éléments trace (Reinfelder *et al.* 1998, Casado-Martinez *et al.* 2009b, Janssen *et al.* 2010) ou (*ii*) l'analyse du contaminant d'intérêt dans les fèces collectés : l'AE est alors obtenue par différence entre le flux ingéré et le flux excrété (Wang et Fisher 1999). Cette approche est impraticable avec des organismes benthiques, pour lesquels les fèces sont impossibles à différencier du sédiment (Janssen *et al.* 2010). Ces difficultés ont conduit dans certains cas à considérer que l'AE peut être estimée à partir de l'équation du modèle décrit par l'équation (3), dès lors que tous les autres paramètres du modèle sont connus.

L'objectif de cette note est de considérer la biodisponibilité d'un contaminant dans différentes sources de nourriture. Pour cela, on peut distinguer l'IR de l'AE dans l'estimation des paramètres du modèle générique, à partir de données expérimentales obtenues pour l'IR. Les méthodes recourant au marquage par des composés radioactifs n'étant pas applicables au laboratoire d'écotoxicologie à Irstea, des approches alternatives ont été testées pour *Chironomus riparius* et *Gammarus fossarum*.

5.5.2 Matériels et méthodes

Taux d'ingestion

Chironomus riparius

La méthode choisie consiste à disséquer 10 chironomes au stade L4 sous loupe binoculaire pour récupérer leurs tubes digestifs, au début et à la fin de l'exposition. La dissection, opérée sur boîte de Pétri préalablement pesée, consiste à arracher la tête du chironome pour récupérer le tube digestif. Les tubes digestifs sont poolés par 10 et pesés frais sur une microbalance (moyenne de 20 pesées) afin de déterminer la teneur moyenne en nourriture qu'ils contiennent. Le taux d'ingestion (mg mg^{-1} j^{-1}) correspond au rapport entre l'accroissement de masse du tube digestif (mg, pf) et celui l'organisme (mg, pf).

Gammarus fossarum

Le taux d'ingestion des gammares peut être déterminé en mesurant la quantité de feuilles d'aulne consommées par les gammares selon le protocole du test d'alimentation (protocole standardisé interne au laboratoire, Coulaud *et al.* (2011), Annexe D) dans les aquariums exposés au contaminant. Brièvement, le test consiste à nourrir 20 gammares avec 20 disques de feuilles d'aulne calibrées (2.2 cm de diamètre) placés dans un système d'encagement (4 réplicats par condition). Les feuilles pouvant être attaquées par des micro-organismes, il convient aussi de mettre en place un témoin avec 10 disques de feuilles et sans gammares. A la fin du test, les feuilles sont récupérées et scannées, tandis que la taille des gammares est aussi mesurée. Les scans des disques de feuilles sont ensuite traités avec un logiciel d'analyse d'image (ImageJ). La valeur moyenne de consommation individuelle exprimée en mm^2 j^{-1} par individu peut être convertie en masse consommée (mg), à partir de la masse moyenne (ps) des disques de feuille. Le taux d'ingestion, exprimé en mg mg^{-1} j^{-1}, correspond à la masse consommée rapportée au poids moyen d'un individu. Le test d'alimentation doit être réalisé en parallèle dans les aquariums témoin sans contaminant et dans les aquariums exposés au contaminant. En effet, le contaminant peut avoir un effet

inhibiteur sur le taux d'ingestion (Forrow et Maltby 2000, Wilding et Maltby 2006).

Modélisation et inférence

Pour le chironome exposé au PCB 153, l'équation (28) a été utilisée pour distinguer l'IR de l'AE :

$$\frac{dC(t)}{dt} = [(AE \times IR \times C_s)] - [(k_e + k_g) \times C(t)] \quad \text{pour } 0 < t < t_c \qquad (28)$$

Pour le gammare exposé au PCB 153, l'équation (29) a été utilisée pour distinguer l'IR de l'AE :

$$\begin{cases} \frac{dC_{E1}(t)}{dt} = AE \times IR \times C_{l,E1} - k_e \times C_{E1}(t) & \text{pour } 0 < t < t_c \\ \frac{dC_{E2}(t)}{dt} = k_s \times C_s - k_e \times C_{E2}(t) & \text{pour } 0 < t < t_c \end{cases} \qquad (29)$$

Le processus d'inférence qui a été utilisé pour estimer les paramètres (notamment IR et AE) est identique à celui présenté dans l'article 1.

5.5.3 Résultats et discussion

Chironomus riparius

IR expérimental

Les résultats expérimentaux du taux d'ingestion obtenus sur la durée des tests sont reportés dans le **Tableau 17**.

Tableau 17. Résultats expérimentaux des taux d'ingestion (IR) pour les chironomes.

Expériences	**Masses des organismes entiers** (mg, moy/10)		**Masses des tubes digestifs** (mg, moy/10)		**IR 7 jours** (mg mg^{-1} j^{-1})
	J0	J7	J0	J7	
PCB 153	2,97	11,0	0,77	2,15	**0,17**
HBCD	1,05	3,10 [a]	0,36	1,19 [a]	**0,41** [a]

[a] : 4 jours d'exposition pour l'exposition à HBCD

Selon Brooke *et al.* (1996), le tube digestif du chironome représente 14,8 % à 24,5 % de la masse totale de la larve. Pour les chironomes exposés au PCB 153, le tube digestif représente en moyenne 23 % (14 – 30 %) de la masse totale de la larve, ce qui est cohérent avec la littérature. Les résultats restent cependant incertains car cette méthode tend à surestimer le taux d'ingestion, dans la mesure où le tube digestif n'est pas nécessairement vide au début de l'exposition.

Estimation de IR et AE

Dans le cas de l'expérimentation du chironome exposé au PCB 153, un IR égal à 0,17 mg mg^{-1} j^{-1} a été pris en compte dans le modèle sélectionné (Eq. (28)), en considérant pour ce paramètre une distribution gaussienne dont la moyenne est de 0,17 et un écart type de 0,07. Les sorties du modèle incluent alors non seulement le k_g et le k_e, comme vu précédemment dans l'article 1, mais également l'IR et l'AE, puisque le coefficient d'absorption à partir du sédiment (k_s) est égal au produit de l'IR et de l'AE. Les résultats obtenus sont reportés au **Tableau 18** ci-dessous.

Tableau 18. Paramètres TK estimés pour le chironome exposé au PCB 153 à partir de l'équation (28) et rappel des valeurs estimées à partir de l'Eq. (6) de l'article 1.

Modèle Eq. (28)				**Modèle Eq. (6) de l'article 1**			
Paramètre	Médiane	Percentiles		Paramètre	Médiane	Percentiles	
		2,5 %	97,5 %			2,5 %	97,5 %
AE (%)	2,52	1,31	7,16	**k_s** (j^{-1})	0,473	0,359	0,804
IR (j^{-1})	0,175	0,064	0,308				
k_e (j^{-1})	0,083	0,019	0,247	**k_e** (j^{-1})	0,121	0,041	0,392
k_g (j^{-1})	0,114	0,019	0,314	**k_g** (j^{-1})	0,123	0,029	0,356
L_0 (mm)	6,75	4,66	8,74	**L_0** (mm)	6,75	4,85	8,71
L_{max} (mm)	19,2	13,5	57,8	**L_{max}** (mm)	18,5	13,3	40,7

Les estimations des paramètres à partir du modèle tenant compte des données expérimentales pour l'IR (Eq. (28)) est aussi performant que lorsqu'on estime seulement k_s : le produit des valeurs médianes AE et IR est égal à la valeur médiane de k_s estimée par l'équation (6) de l'article 1 (**Tableau 18**). En revanche, de grandes incertitudes sont observées autour des paramètres AE et IR, en plus de l'augmentation des incertitudes pour les autres paramètres du modèle (sauf pour L_0). L'efficacité d'assimilation estimée pour le chironome exposé au PCB 153 est égale à 2,52 % ; elle est spécifique de l'espèce et du contaminant. Rasmussen (1984) ont estimé une AE de 5,9 % chez *C. riparius* au stade L4 exempt d'une contamination, et Janssen *et al.* (2010) ont estimé pour les PCB (moyenne de plusieurs congénères) une AE de 2 à 10 % chez le polychète *Neanthes arenaceodentata*.

Gammarus fossarum

IR expérimental

Les données de consommation de feuilles ont été collectées au cours des quatre expériences effectuées au cours de cette thèse. Bien qu'elles aient été obtenues sur toute la durée des tests (phase d'exposition et phase de dépuration), on ne s'intéressera ici qu'à celles directement exploitables pour l'estimation des taux d'ingestion, c'est-à-dire les données des gammares exposés et leurs témoins respectifs. Les données expérimentales obtenues pour les gammares témoins sont présentées dans le **Tableau 19**. Lorsque les surfaces consommées par les gammares témoins sont comparées à celles des gammares exposés test par test, aucune différence n'a été observée pour la condition contaminée (Annexe D, Tableau D.1) : l'exposition aux contaminants n'a pas eu d'effet sur l'alimentation des gammares.

Tableau 19. Distribution des surfaces de feuille consommées (mm^2 $individu^{-1}$ j^{-1}) par les gammares témoin.

	PCB 153	**HBCD**	**BDE 99**	**Pyrène**
Réplicats	4	4	8	8
Moyenne [min-max]	26,8 [24,2-30,6]	31,4 [21,4-38,4]	26,0 [16,7-38,9]	29,1 [19,2-33,8]
Valeur	29,7	29,1	28,8	31,6

[a] : modèle développé par Coulaud *et al*. (2011).

A titre indicatif, compte tenu d'une masse moyenne de 15,3 mg (ps) par disque de feuille d'une surface de 380 mm^2, et d'une masse sèche moyenne de 6,14 mg (ps) par gammare (Duvillard 2018), l'IR moyen pour l'ensemble des témoins tous essais confondus est égal à 0,157 ± 0,060 (témoins) ou 0,154 ± 0,068 (exposés), des valeurs inférieures à celle estimée par Lebrun *et al.* (2014) pour des gammares de l'espèce *G. pulex* nourris avec des feuilles de charme et exposés également à des PBDE (0,25 ± 0,03 mg mg^{-1} j^{-1}). Wilding et Maltby (2006) avaient pour leur part noté un IR égal à 0,28 ± 0,01 mg mg^{-1} j^{-1} chez les témoins de l'espèce *G. pulex* dans le cadre d'une exposition au zinc.

Prise en compte dans le cadre de modélisation et inférence

Dans le cas du gammare exposé au PCB 153, un IR égal à 26,8 ± 2,76 mm^2 $gammare^{-1}$ j^{-1} a été mesuré (soit relatif à la masse d'un gammare : 0,238 ± 0,049 mg mg^{-1} j^{-1}). Cette donnée peut être prise en compte dans le modèle Eq. (29), en considérant pour ce paramètre une distribution *a priori* gaussienne dont la moyenne et l'écart type sont ceux présentés par Wilding et Maltby (2006). Le coefficient d'absorption à partir des feuilles (k_l) est égal au produit de l'IR et de l'AE. Les estimations obtenues sont reportées dans le **Tableau 20**.

Tableau 20. Paramètres TK estimés pour le gammare exposé au PCB 153 et rappel des valeurs estimées à partir des Eqs. (12) et (14) de l'article 1.

Modèle Eq. (29)				**Modèle Eqs. (12) et (14) de l'article 1**			
Paramètre	Médiane	Percentiles		Paramètre	Médiane	Percentiles	
		2,5 %	97,5 %			2,5 %	97,5 %
AE (sans unité)	0,053	0,035	0,093	$\mathbf{k_I}$ (j^{-1})	0,013	0,010	0,016
IR (j^{-1})	0,237	0,141	0,333				
$\mathbf{k_s}$ (j^{-1})	0,071	0,057	0,087	$\mathbf{k_s}$ (j^{-1})	0,071	0,057	0,087
$\mathbf{k_e}$ (j^{-1})	0,178	0,131	0,229	$\mathbf{k_e}$ (j^{-1})	0,178	0,131	0,229

Le modèle tenant compte des données expérimentales pour l'IR (Eq. (29)) obtient des distributions de paramètres similaires à celui considérant seulement k_I. L'AE estimée pour le PCB 153 est égale à 5,3 %. Cette valeur est nettement plus basse que la borne inférieure de la gamme d'AE d'un hexachlorobiphényl (36 - 52 %) compilée par Wang et Fisher (1999) pour l'amphipode *Diporeia sp.*. En revanche Janssen *et al.* (2010) estiment l'AE du polychète *N. arenaceodentata* exposé à un sédiment contaminé par des PCB10 entre 6 et 10 %. Les résultats obtenus sont donc cohérents avec ceux de la littérature, en sachant que ce paramètre est à la fois dépendant du contaminant et de l'espèce.

5.5.4 Conclusion

Le modèle le plus parcimonieux est celui considérant le taux d'accumulation par la voie trophique uniquement, c'est-à-dire sans distinguer l'IR et l'AE. Cependant, selon les situations, il peut être utile de connaître ou d'estimer les valeurs de ces deux paramètres. Par exemple, il peut être pertinent d'avoir connaissance des valeurs d'IR et l'ordre de grandeur des valeurs d'AE si l'on souhaite appliquer ce modèle et son cadre d'inférence associé comme outil de prédiction à une situation où il n'est pas possible de le calibrer avec des données expérimentales (e.g. absence de données pour le taux d'accumulation relatif à la voie trophique). Par ailleurs, ce cadre peut être utilisé pour connaître la biodisponibilité d'un contaminant dans différentes sources de nourriture, en estimant l'efficacité d'assimilation.

5.6 NOTE 5 : MISE EN ŒUVRE DES DIRECTIVES 2000/60 ET 2013/039 – EXEMPLE DU BENZO-(A)-PYRENE

5.6.1 Introduction

Depuis un certain temps en France, les HAP sont généralement analysés dans le sédiment dans le cadre de suivis annuels (réseaux de surveillance « RNB »[15] puis « RCS/RCO »[16]). Cependant, la directive 2013/039 spécifie que pour les HAP, la norme de qualité environnementale (NQE) concerne le biote, en l'occurrence des invertébrés tels que des mollusques. Cependant, modifier le protocole de surveillance mis en place depuis plusieurs années conduirait à une perte de continuité des données. Afin de conserver l'historique des données tout en appliquant la directive (interprétation des résultats par rapport au biote), les modèles TK tels que celui développé dans ce manuscrit pourraient être employés. En effet, ils peuvent prédire (*i*) les concentrations dans le sédiment équivalent à la NQE_{biote} (i.e. la concentration dans le sédiment à ne pas dépasser à partir d'une concentration cible dans l'organisme) et (*ii*) les concentrations dans le biote, directement à partir de données mesurées dans le sédiment *in situ*, en comparant cette prédiction à la NQE_{biote}.

L'objectif de cette note est d'illustrer la première approche à l'aide du cadre de modélisation et d'inférence développé dans ce manuscrit. Cela pourra s'effectuer à partir d'une étude toxico-cinétique disponible dans la littérature, qui permettra d'estimer les distributions marginales des paramètres du modèle et ainsi de prédire la concentration dans le sédiment à ne pas dépasser pour respecter la NQE_{biote} associée. En l'occurrence, le benzo(a)pyrène (noté BaP) s'adsorbe fortement aux particules du sédiment, plus fortement que le PCB 153 (Schuler et al., 2003) malgré un log K_{ow} inférieur. Dans cette étude, les métabolites du BaP chez la hyalèlle étaient non détectés, alors que le chironome (*C. tentans*) a montré des capacités importantes à biotransformer le BaP.

5.6.2 Matériels et méthodes

Données expérimentales

Les jeux de données utilisés sont ceux de Schuler et al. (2003), où *Chironomus tentans* et *Hyalella azteca* ont été exposés trois jours à du sédiment contaminé en BaP puis transférés dans un milieu non contaminé pendant trois autres jours. Les cinétiques de concentrations

[15] RNB : Réseau National de Bassin
[16] RCS/RCO : Réseaux de Contrôle de Surveillance / Réseau de Contrôle Opérationnel

mesurées en BaP et ses métabolites dans les deux espèces ont été obtenues et utilisées pour ajuster le modèle et son cadre d'inférence.

Modélisation et inférence

L'équation (26) a été utilisée pour modéliser les cinétiques de BaP et ses métabolites dans la hyalèlle et le chironome, en supposant que l'exposition par l'eau est minoritaire en raison de la forte hydrophobicité du BaP ($\log K_{ow}$ = 6,13). Des distributions *a priori* uniformes ont été définies pour les paramètres : $\log_{10}(\theta) \sim U(-5,2)$. A noter que dans cette étude, les métabolites du BaP chez la hyalèlle étaient inférieurs à la limite de détection, alors que les chironomes ont montré des capacités importantes à métaboliser ce composé.

Les distributions marginales *a posteriori* des paramètres ainsi obtenues sont ensuite utilisées pour prédire une concentration dans le sédiment en BaP pour laquelle ces organismes présenteraient une concentration inférieure ou égale à la NQE_{biote} (5 ng g^{-1} pf).

5.6.3 Résultats et discussion

En appliquant le cadre de modélisation et d'inférence Bayésienne associée aux données expérimentales de Schuler *et al.* (2003) à deux invertébrés (chironome et hyalèlle) exposés à du sédiment contaminé en BaP (C_s = 0014 ng g^{-1} ps), les paramètres ont été estimés. Par exemple, pour *C. tentans*, le k_s estimé est égal à 0,73 [0,47 – 1,08] j^{-1}, k_e à 2,16 [0,63 – 4,20] j^{-1}, k_m à 1,65 [1,38 – 2,02] j^{-1} et k_{emet} à 0,76 [0,65 – 0,88] j^{-1}. Les distributions marginales de ces paramètres sont ensuite utilisées pour obtenir les prédictions des concentrations dans les organismes en BaP et ses métabolites pour lesquelles la NQE_{biote} n'est pas dépassée (**Figure 46**). Pour cela, j'ai fait varier la concentration d'exposition (i.e. concentration de BaP dans le sédiment) dans le processus d'inférence, jusqu'à obtenir la concentration à ne pas dépasser pour respecter la NQE_{biote} du BaP après 3 jours d'expositions. Ces prédictions correspondent à une concentration en BaP dans le sédiment estimée à 25 et 19 ng g^{-1} ps pour *C. tentans* et *H. azteca* respectivement. La capacité du chironome à métaboliser le BaP est telle que les métabolites (non identifiés dans l'étude d'origine) atteignent à eux seuls une concentration quasi double de la NQE_{biote} définie pour le composé parent, comme le montre la **Figure 46-a**. La simulation sur le crustacé amphipode *H. azteca* (i.e. sans métabolisation, **Figure 46-b**) quant à elle montre qu'il ne faudrait pas dépasser 19 ng g^{-1} ps de BaP pour que cette espèce n'accumule pas plus que la NQE_{biote}, bien que l'état d'équilibre ne soit pas atteint au bout de 3 jours d'exposition avec les prédictions.

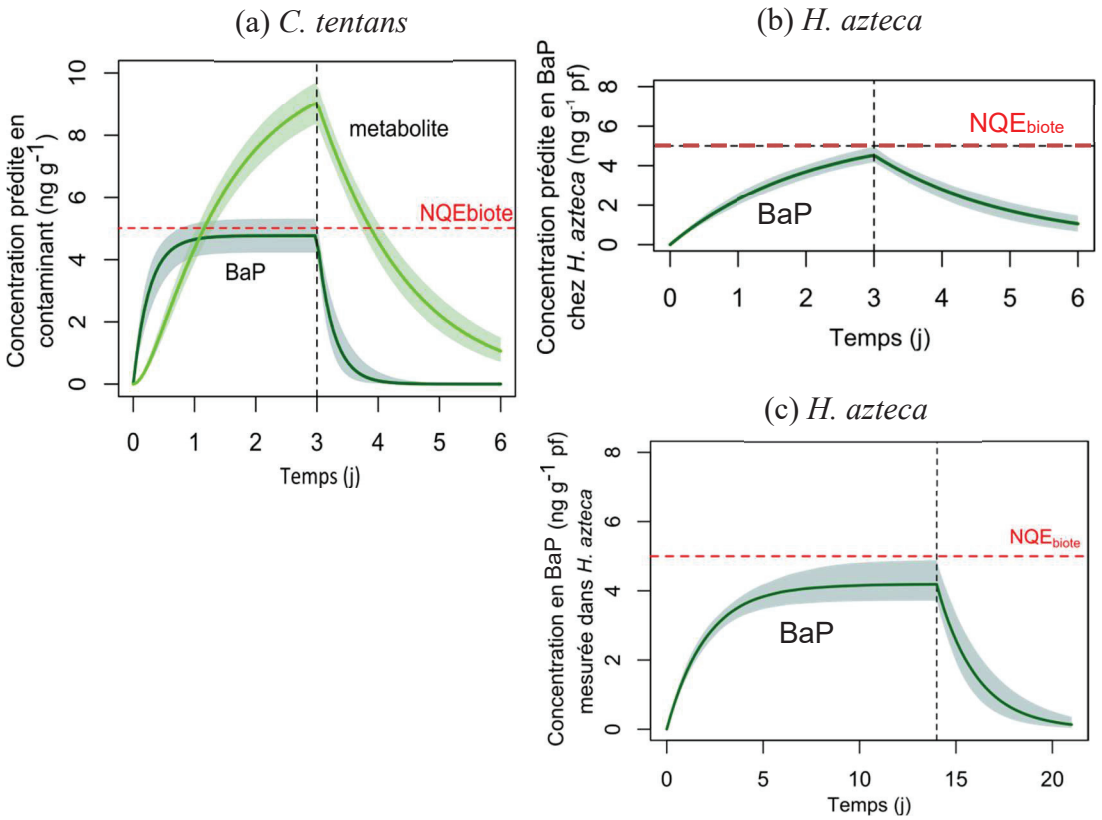


Figure 46. Prédictions de la bioaccumulation du BaP et des métabolites (a) par *C. tentans* exposé pendant 3 jours à 25 ng g^{-1} ps de sédiment contaminé, (b) par *H. azteca* exposé à 19 ng g^{-1} ps de sédiment contaminé pendant 3 jours et (c) par *H. azteca* exposé pendant 14 jours à 13.5 ng g^{-1} ps de sédiment contaminé. La ligne pointillée horizontale rouge représente la NQE_{biote} de 5 ng g^{-1} pf. La ligne verticale pointillée noire représente la fin de la phase d'exposition des organismes.

Pour prédire la concentration à ne pas dépasser en BaP dans le sédiment pour cette espèce à l'état d'équilibre, j'ai donc fait varier le temps d'exposition à 14 jours, ainsi que la concentration d'exposition pour obtenir les prédictions en **Figure 46-c**. En conséquence, pour la hyalèlle, il ne faudrait pas dépasser 13,5 ng g^{-1} ps de BaP pour que cette espèce n'accumule pas plus que la NQE_{biote} à l'état d'équilibre.

Dans cette application à la réglementation, cette approche permet de quantifier les incertitudes autour des prédictions, qui sont indispensables en évaluation du risque. De plus, l'approche développée ici est souvent appliquée à des données *in situ*, c'est-à-dire soumise aux conditions environnementales (e.g. taux de matière organique, température), que les incertitudes autour des prédictions devraient prendre en compte.

5.6.4 Conclusion

Pour répondre aux besoins d'interprétation des données de surveillance des sédiments dans le cadre imposé par la directive 2013/039/UE, de bonnes perspectives existent pour l'utilisation de ce cadre de modélisation et d'inférence. Par ailleurs, la NQE_{biote} est définie pour le composé parent, alors que les métabolites peuvent être plus toxiques. Il serait donc pertinent d'envisager une NQE_{biote} qui soit définie sur les métabolites d'une substance lorsque ces derniers ont des effets toxiques.

En résumé, ce chapitre a illustré des exemples d'applications du cadre de modélisation et d'inférence développé lors de ce travail. Entre autres, cette approche a permis :

- d'être appliquée à d'autres contaminants, comme les retardateurs de flammes bromés ;
- de prédire des concentrations dans le biote à partir des concentrations d'exposition *in situ* ;
- d'estimer l'efficacité d'assimilation d'un contaminant pour un organisme exposé par la voie trophique ;
- de prédire des concentrations dans le sédiment à ne pas dépasser pour respecter la NQE_{biote}.

Chapitre 6 : Discussion générale

L'objectif général de cette thèse était de développer un cadre générique de modélisation et d'inférence applicable à différentes espèces d'invertébré exposés à divers contaminants organiques, en incluant différentes voies d'exposition et différents processus, comme la dilution par la croissance et la biotransformation. Pour y répondre, deux objectifs ont été proposés, un méthodologique et un écotoxicologique. L'objectif méthodologique consistait à développer un cadre de modélisation TK et d'inférence, incluant toutes les possibilités, c'est-à-dire plusieurs voies d'exposition (dissoute et trophique) et d'élimination (excrétion, croissance, biotransformation), adapté à différents couples espèces-substances, à l'aide de l'inférence Bayésienne qui considère simultanément l'ensemble des données disponibles et qui permet de quantifier les incertitudes. L'objectif écotoxicologique, quant à lui, portait sur l'étude de la variabilité de la bioaccumulation de contaminants par différentes espèces, cela se traduisant par un apport de connaissances de la bioaccumulation de contaminants par les invertébrés (notamment sur l'HBCD pour lequel peu d'information est disponible), en particulier sur les différentes voies d'exposition et d'élimination, ou encore sur la variabilité des cinétiques selon le couple espèce/contaminant.

Dans ce chapitre, les résultats seront donc discutés en revenant sur les objectifs majeurs développés dans cette thèse.

6.1 VALIDATION DU MODELE GENERIQUE ET DU CADRE D'INFERENCE DEVELOPPE

Différents modèles TK ont été adaptés selon les processus considérés (différentes hypothèses) à tous les couples espèce/contaminant testés. La plus-value de ces travaux de thèse est d'avoir utilisé l'inférence Bayésienne pour estimer les paramètres des différents modèles. Cette approche a notamment permis de pallier certaines difficultés existantes, comme l'estimation des paramètres relatifs à la biotransformation. En effet, l'inférence Bayésienne possède plusieurs avantages, dont certains ont pu être mis en exergue tout au long de ce manuscrit : (*i*) les données *a priori*, (*ii*) la distribution jointe *a posteriori* intégrant la corrélation entre les paramètres, (*iii*) la prise en compte simultanée des données de nature différentes et (*iv*) sa mise en application.

La prise en compte des données *a priori* dans le processus d'inférence s'est révélée pertinente pour résumer l'information disponible sur les paramètres. Par exemple, dans certaines études d'origine relatives à la biotransformation, les valeurs estimées du paramètre k_m étaient négatives, alors qu'avec la prise en compte des données *a priori*, des intervalles de valeurs possibles (i.e. valeurs positives) ont pu être défini.

La distribution jointe *a posteriori* obtenue pour chacun des modèles a permis de prendre en compte les corrélations entre les paramètres, permettant une estimation plus précise et « juste » des incertitudes, indispensable dans l'ERE. Cela a particulièrement été mis en exergue dans l'article 2, lors de la comparaison entre les paramètres estimés par inférence Bayésienne et les valeurs de ces mêmes paramètres obtenues d'après les méthodes d'origine : l'approche Bayésienne donne des estimations précises des paramètres là où les approches utilisées dans les 7 études d'origine n'y arrivait pas. De plus, avec cette méthode, les incertitudes sur les paramètres ont facilement été « projetées » sur les prédictions du modèle pour obtenir « sans difficulté » les intervalles de crédibilité sur les prédictions.

Considérer simultanément des données expérimentales de différentes conditions a permis d'estimer simultanément les taux d'accumulation (k_w, k_l, k_s) et d'élimination (k_e) avec les données d'exposition et de dépuration, d'estimer le taux de croissance k_g simultanément avec les données de bioaccumulation et de croissance (article 1 et 3), mais aussi d'estimer le taux de biotransformation k_m simultanément avec les données de bioaccumulation du composé parent et du métabolite (article 2). De plus, dans les études d'origine mentionnées dans l'article 2, les valeurs de certains paramètres ont dû être fixées pour estimer correctement les autres paramètres du modèle. Cela n'a pas été le cas avec l'inférence Bayésienne, puisque cette dernière a permis d'éviter d'en fixer un (ou plusieurs), principalement grâce à l'estimation simultanée des paramètres.

Le processus d'inférence a été réalisé par les logiciels gratuits JAGS et R. Le logiciel R est largement utilisé par une vaste communauté scientifique, et les codes utilisés sont facilement à disposition. De plus, les temps de calculs sont relativement courts. Ainsi, la mise en place du modèle TK générique développé dans un cadre d'inférence Bayésienne est simple et accessible par différentes instances (e.g. laboratoires de recherche, bureaux d'études, agences réglementaires (EFSA 2018)).

Cependant, lors de l'utilisation de l'inférence Bayésienne appliquée au modèle TK, des précautions doivent être prises lors de la définition des distributions *a priori* des paramètres du modèle. En effet, le choix des lois *a priori* est une étape fondamentale dans l'analyse bayésienne et pourtant délicate, notamment lorsque des lois *a priori* non informatives sont utilisées. Par exemple, dans ces travaux et selon les données à disposition, cela nécessitait parfois de fixer des limites strictes lors de la définition des lois *a priori* vaguement informatives.

6.2 VARIABILITE INTERSPECIFIQUE, CONTAMINANTS ET FACTEURS ENVIRONNEMENTAUX

La bioaccumulation des contaminants organiques est en partie régie par leur biodisponibilité dans le milieu. La biodisponibilité d'un contaminant dépend à la fois de l'espèce exposée, des propriétés physico-chimiques des contaminants (e.g. hydrophobicité) ainsi que des caractéristiques environnementales (e.g. température, matière organique) (Di Toro *et al.* 1991). Il semble donc pertinent de comparer d'une part les valeurs estimées des paramètres TK d'un même contaminant pour différentes espèces, c'est-à-dire étudier l'influence de l'espèce (e.g. les traits de vie) sur les paramètres TK et d'autre part, les valeurs estimées des paramètres TK d'une même espèce pour différents contaminants. Pour cela, le **Tableau 21** présente, pour les substances étudiées, les valeurs médianes ainsi que les intervalles de crédibilité à 95 % des paramètres toxico-cinétiques estimés à l'aide des modèles. Le **Tableau 22** résume les principales différences observées dans la bioaccumulation des différents contaminants chez les organismes d'études, c'est-à-dire une traduction biologique des valeurs des paramètres TK estimés.

Tableau 21. Résumé de l'ensemble des valeurs médianes des paramètres toxico-cinétiques estimés à partir des expériences réalisées au laboratoire et du cadre de modélisation et d'inférence. Les intervalles de crédibilité à 95 % sont indiqués entre crochets.

	Substance	k_s (j^{-1})	k_l (j^{-1})	k_g (j^{-1})	k_e (j^{-1})	k_m (j^{-1})	k_{emet} (j^{-1})
Chironomus riparius	PCB 153	0,47 [0,36-0,80]	-	0,12 [0,03-0,36]	0,12 [0,04-0,39]	-	-
	ΣHBCD[1]	NA[1]	-	NA[1]	-	-	-
Gammarus fossarum	PCB 153	0,07 [0,06-0,09]	0,013 [0,010-0,016]	-	0,18 [0,13-0,23]	-	-
	ΣHBCD	NA[1]	-	-	NA[1]	-	-
	BDE 99	0,03 [0,02-0,04]	0,012 [0,009-0,014]	-	0,22 [0,16-0,28]	-	-
	Pyrène	0,02 [0,00005-0,517]	0,003 [0,00002-0,095]		0,05 [0,00002-70,5]	4,64 [0,0005-84,9]	0,52 [0,0002-3,48]
Radix auricularia	PCB 153	0,047 [0,044-0,050]	-	-	Fixé à 0	-	-
	BDE 99	0,031 [0,026 - 0,035]	-	-	Fixé à 0	-	-

[1] : L'HBCD a été faiblement accumulé, proche des limites de quantification. Le modèle n'a pas été appliqué pour ce contaminant.

Tableau 22. Principales différences de bioaccumulation des contaminants étudiés chez les trois espèces d'invertébrés sélectionnées.

	Chironome	**Radix**	**Gammare**
PCB 153	Accumulation rapide	Accumulation lente à moyenne	Accumulation moyenne
	Elimination rapide	Pas d'élimination	Elimination rapide
BDE 99	-	Accumulation lente	Accumulation lente
		Pas d'élimination	Elimination rapide
		Absence de débromination (BDE 47)	Absence de débromination (BDE 47)
HBCD	Accumulation très faible	-	Accumulation très faible
	Absence de bio-isomérisation		Absence de bio-isomérisation
Pyrène	-	-	Accumulation lente
			Elimination lente
			Biotransformation rapide

6.2.1 Variabilité des espèces

Pour un même contaminant, les données toxico-cinétiques peuvent varier selon les espèces, s'expliquant au moins en partie par des traits de vie différents mais aussi par leur physiologie. Lors de ce travail, trois espèces d'invertébrés ont été étudiées : le chironome (benthique), le gammare et le radix (épibenthique). Lorsque ces espèces ont été exposées à un même contaminant, elles ont présentées des profils TK variés (**Tableau 21** et **Tableau 22**).

Les plus grandes différences ont été observées pour le chironome, qui présente un taux d'accumulation par le sédiment nettement supérieur (6 à 10 fois supérieurs) à celui des deux autres organismes dans le cas de l'exposition au PCB 153. De la même manière, pour l'HBCD, même si le modèle n'a pas été ajusté sur les données expérimentales, la concentration mesurée dans les chironomes à la fin de l'exposition était environ deux fois plus élevée que dans les gammares (0,760 contre 0,358 ng g^{-1} pf respectivement) malgré une concentration d'exposition dans le sédiment deux fois plus faible dans l'expérience chironome (4,83 contre 9,82 ng g^{-1} ps respectivement). Ces résultats peuvent s'expliquer du fait que les chironomes sont exposés par voie trophique, en contact permanent avec le sédiment contaminé (ingestion des particules).

Entre le gammare et le radix, aucune différence notable n'a été observée pour le taux d'accumulation du PCB 153 et du BDE 99, malgré une bioaccumulation légèrement plus importante du PCB 153 chez le gammare. Cependant, les taux d'élimination entre ces deux espèces sont très différents : le radix ne semble pas éliminer ces deux contaminants. Parmi les hypothèses évoquées dans le chapitre 3 (section 3.4.3) et le chapitre 5 (section 5.2), la plus plausible serait que les radix, une fois transférés en milieu propre pour la dépuration, se contamineraient par leurs fèces encore contaminés, entrainant l'apparition d'un état stationnaire en phase de dépuration. Par ailleurs, peu d'informations sont disponibles sur leur gestion de détoxification de contaminants organiques (Legierse *et al.* 1998), mais cela pourrait être une hypothèse à examiner de plus près, d'autant plus que la glande digestive d'un autre gastéropode, *L. stagnalis*, accumule et retient certains métaux en quantité plus importante que dans les tissus mous (Elangovan *et al.* 1997).

D'un autre côté, les taux d'élimination entre le chironome et le gammare sont du même ordre de grandeur pour le PCB 153.

Par ailleurs, les paramètres TK du gammare exposé au pyrène via le sédiment peuvent être comparés à ceux d'autres espèces exposées à cette même substance (article 2), par exemple le polychète marin *N. diversicolor* (Giessing *et al.* 2003). Le taux d'accumulation

par le sédiment est plus important pour *N. diversicolor* ($k_{s,N.diversicolor} > k_{s,G.\ fossarum}$) et présente un taux d'élimination plus faible ($k_{e,G.\ fossarum} > k_{e,N.diversicolor}$). Cependant, le gammare présente une meilleure capacité à métaboliser le pyrène ($k_{m,G.\ fossarum} > k_{m,N.diversicolor}$).

Ainsi, les différences observées pour la bioaccumulation de contaminants selon les espèces s'expliquent entre autres par la différence du mode de fonctionnement dans le milieu de ces trois organismes, et dans une moindre mesure par leur physiologie.

6.2.2 Les contaminants

Pour une même espèce (gammare ou radix), le PCB 153 semble être plus bioaccumulé que le BDE 99 ($k_{s,PCB\ 153} > k_{s,BDE\ 99}$). En revanche, le taux d'élimination est similaire entre ces deux contaminants. En se focalisant sur les propriétés physico-chimiques des contaminants, ces résultats pourraient s'expliquer par (*i*) le caractère hydrophobe de la molécule, (*ii*) la biotransformation, (*iii*) le mélange de contaminants (ou effet « cocktail ») et (*iv*) la dépendance à la concentration. En effet, le PCB 153 est légèrement plus hydrophobe ($logK_{ow}$ = 7,22) que le BDE 99 ($logK_{ow}$ = 6,84) et moins sujet à une possible biotransformation, bien que ce processus n'a pas été observé pour le BDE 99 dans les expériences. Plus le contaminant est hydrophobe, plus une augmentation du taux d'accumulation par le sédiment ou par les feuilles est attendue. C'est d'ailleurs ce qui est observé chez le gammare (**Figure 47**), où $k_{s,PCB\ 153} > k_{s,BDE\ 99} > k_{s,pyrène}$. En revanche, la moyenne estimée du k_e pour le pyrène est beaucoup plus faible que pour les autres contaminants qui sont plus hydrophobes qui s'explique en partie par sa biotransformation.

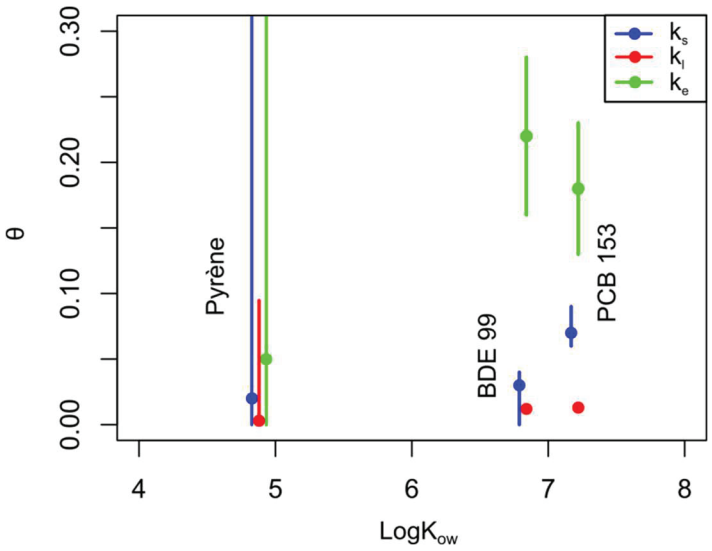


Figure 47. Distribution des valeurs des paramètres (j^{-1}) pour le PCB 153, BDE 99 et pyrène chez *G. fossarum* en fonction de leur caractère hydrophobe ($LogK_{ow}$). Les points représentent les valeurs moyennes et les barres d'erreurs leurs intervalles de crédibilité à 95 %.

Par ailleurs, pour l'expérience du radix, le PCB 153 et le BDE 99 étaient en mélange, pouvant influencer sur les cinétiques d'accumulation et l'élimination de ces contaminants par un effet de compétition. Ceci laisse supposer que le PCB 153 est légèrement plus compétiteur que le BDE 99 dans cette espèce, par exemple au niveau des sites de liaison membranaires ou de stockage. Aussi, la dépendance à la concentration n'a pas été étudiée dans ces travaux, mais pourrait avoir une incidence sur les paramètres TK. En effet, lorsque le processus d'accumulation met en jeu des sites de liaison spécifiques au niveau des membranes ou des organes de stockage, la concentration accumulée va dépendre non seulement de la concentration d'exposition, mais également de la disponibilité (ou de la saturation) des sites de liaison. Ce mécanisme a notamment été décrit pour des métaux (Lebrun *et al.* 2011) et pour des composés perfluorés (Liu *et al.* 2011).

D'autre part, le pyrène présente un profil particulier puisqu'il s'accumule lentement chez le gammare, du même ordre de grandeur que le BDE 99. Son accumulation est suivie d'une biotransformation rapide en 1-OH-pyrène et de son élimination. A ma connaissance, et à l'exception de l'étude présentée dans ce manuscrit (Note 2), aucune étude de toxico-cinétique n'a été menée sur *G. fossarum* exposé à des HAP et leur potentiel biotransformation.

Ces travaux ont montré que, pour l'ensemble des expériences réalisées, le sédiment est la voie d'accumulation principale, celle par l'eau étant négligeable du fait des propriétés hydrophobes des contaminants étudiés. Ainsi, les contaminants ont une influence sur les cinétiques de bioaccumulation dans les organismes en fonction de leurs propriétés physico-chimiques.

6.2.3 Les facteurs environnementaux

L'influence des facteurs environnementaux sur la bioaccumulation n'a pas été étudiée ici, bien que ce volet ait tout aussi son importance. En effet, il est pertinent de s'intéresser à l'étude de la variation de ces facteurs dans la perspective de se rapprocher des conditions environnementales observées sur le terrain. En particulier, il a été montré que la voie trophique est la voie d'exposition principale pour les substances étudiées dans cette thèse, en particulier par le sédiment, et dans une moindre mesure par la litière (feuilles). Cependant, la teneur en matière organique (MO) et sa qualité pourraient modifier la biodisponibilité des contaminants. En effet, la MO évolue au cours du temps (processus d'humification), ce qui conduit à la rétention croissante des composés hydrophobes (résidus liés).

Par ailleurs, dans le contexte des potentiels effets du changement climatique, la

variation de la température sur les teneurs en contaminants pourrait être étudiée puisqu'elle présente la capacité à modifier le devenir des contaminants ainsi que les processus biologiques des espèces (Noyes *et al.* 2009).

6.3 PERTINENCE DE L'OUTIL DANS L'EVALUATION DU RISQUE ENVIRONNEMENTAL

Les modèles TK permettent d'établir un lien entre l'exposition d'un organisme à un contaminant dans le milieu et sa concentration mesurée dans les tissus, constituant la première étape en ERE. Cependant, la toxicité d'un contaminant est évaluée dans la phase toxico-dynamique, qui prédit les effets du contaminant sur l'organisme à partir de la concentration interne. Par conséquent, plus la concentration interne est précise, meilleurs seront les prédictions des effets. La quantification des incertitudes est un point crucial pour une meilleure évaluation du risque. Le cadre d'inférence développé ici est donc pertinent dans son utilisation en ERE, comme démontré entre autres dans l'article 2 pour l'estimation du k_m.

6.4 DIFFICULTES RENCONTREES

Au cours de ces travaux de thèse, plusieurs difficultés ont été rencontrées, liées aux organismes et molécules étudiés.

L'utilisation du chironome a présenté une certaine difficulté du fait de son court cycle de vie au stade larvaire L4 (de 7 jours maximum), seule la phase d'accumulation a pu être étudiée. Ainsi, le taux d'élimination a été estimé qu'à partir des données d'exposition, pouvant introduire un biais dans les estimations. Par ailleurs, un problème de maintien au laboratoire de *Physa acuta* (mortalité systématique des adultes après la ponte) m'a amenée à choisir un autre gastéropode d'eau douce (*Radix auricularia*) comme modèle d'étude. Plusieurs hypothèses ont été envisagées, principalement la qualité de l'eau (présence de cuivre auquel les mollusques sont particulièrement sensibles).

Par ailleurs, le dosage des contaminants nécessitait une matrice minimale (entre 0,2 et 0,5 g), ce qui m'a contraint dans la plupart des expériences à un seul point de mesure par point de prélèvement. De plus, un des critères de sélection des contaminants était la disponibilité du protocole d'extraction et des méthodes d'analyses. Ces derniers avaient déjà été développés au LPTC pour l'ensemble des contaminants étudiés, excepté pour le métabolite du pyrène qui a été uniquement développé sur des matrices poisson. Le temps d'adaptation du protocole d'extraction du métabolite à la matrice gammare s'est révélé un peu plus long que prévu.

Perspectives

Plusieurs perspectives peuvent être proposées afin de consolider la pertinence de ce modèle et son cadre d'inférence, ainsi que son utilisation dans divers aspects (e.g. opérationnels et réglementaires).

D'autres points d'ouverture pourraient être considérés dans le modèle TK, comme par exemple le processus de dépendance à la concentration/saturation et la variation au cours du temps des concentrations d'expositions. L'étude de la dépendance à la concentration ou phénomène de saturation permettrait de mieux comprendre les processus de transports membranaires ou de stockage des contaminants organiques chez les invertébrés et leur incidence sur les cinétiques d'accumulation. De plus, dans cette thèse, les concentrations d'expositions étaient supposées constantes alors qu'elles sont souvent variables dans l'environnement.

Par ailleurs, la prise en compte des facteurs abiotiques pourraient être intégrée au modèle, tels que la matière organique, la température et le pH. En effet, il parait essentiel d'explorer l'influence de la matière organique, ou d'autres adsorbants, sur les cinétiques de bioaccumulation de contaminants. Si la MO, qui stocke et retient les contaminants, est ingérée par les invertébrés benthiques et épibenthiques, elle devient un vecteur de contamination. Ce développement serait utile pour plusieurs applications : la contribution à l'évaluation de la dangerosité des sédiments ou encore l'interprétation de données de surveillance (s'affranchir de la variation de MO entre les sédiments utilisés dans les tests de laboratoire et ceux *in situ*, prise en compte de la MO dans la transposition de NQE_{biote}). Par ailleurs, la température peut affecter le devenir des contaminants, notamment leurs dégradations, ainsi que les processus biologiques des espèces (e.g. croissance, alimentation). Il serait donc pertinent d'étudier son impact sur les cinétiques de bioaccumulation chez les invertébrés. De plus, le pH peut affecter la physiologie de l'organisme et dans une moindre mesure la forme chimique sous laquelle le contaminant organique (molécules polaires seulement) (Hamelink *et al.* 1994).

L'acquisition de données cinétiques *in situ*, impliquant des organismes encagés puis l'estimation des paramètres TK de terrain, devrait permettre d'une manière générale de

diminuer l'incertitude inhérente à l'utilisation de paramètres TK acquis au laboratoire sur des données *in situ*.

La mise à disposition du code des différents sous-modèles ouvre la possibilité d'étendre ce cadre de modélisation et d'inférence à d'autres organismes et d'autres substances, comme par exemple à des mélanges de contaminants pouvant inclure des processus de compétition.

Le modèle TK pourra être utilisé comme outil de prédiction, pour guider les choix expérimentaux (design expérimentaux) dans le cadre de l'ERE par exemple, avec comme objectif de gagner du temps et une diminution des coûts relatifs aux expérimentations.

Toujours dans un objectif d'évaluation des risques, le code pourra par exemple être intégré à la plateforme MOSAIC précédant l'analyse toxico-dynamique (Charles *et al.* 2018). De plus, dans cette perspective d'ERE, il est pertinent de s'intéresser à la bioamplification de ces substances dans la chaîne trophique. Ainsi, une possibilité serait de considérer l'organisme comme un ensemble de plusieurs compartiments selon les différents organes le constituant (organotropisme). Cela permettrait d'évaluer la fraction trophique disponible pour les prédateurs ou les consommateurs dans les tissus comestibles, ou encore d'identifier des organes de stockage particuliers (en particulier pour le radix) et la détoxification. Ainsi les prédictions des effets seront plus précises.

Références bibliographiques

76/769/EEC. Directive 76/769/EEC du 27 juillet 1976 sur la restriction de la vente et l'usage de certaines substances toxiques. Amendée plusieurs fois, elle a donné lieu à une interdiction définitive des PCB en 1985, avec la directive 85/467/EEC. Suivra la directive 96/59/EC prévoyant l'élimination de ces substances.

2000/60/CE, D. Directive 2000/60/CE du Parlement et du Conseil du 23 octobre 2000 établissant un cadre pour une politique communautaire dans le domaine de l'eau.

2003/11/CE, D. Directive Européenne n°2003-11 du 6 février 2003 du Parlement Européen et du Conseil portant vingt-quatrième modification de la directive 76/769/CEE du Conseil relative à la limitation de la mise sur le marché et de l'emploi de certaines substances et préparations dangereuses (pentabromodihényléther, octabromodiphényléther).

2008/105/CE, D. Directive fille de la directive 2000/60/CE. Normes de qualité environnementale dans le domaine de l'eau, modifiant et abrogeant les directives du Conseil 82/176/CEE, 83/513/CEE, 84/156/CEE, 84/491/CEE, 86/280/CEE et modifiant la directive 2000/60/CE.

2013/39/CE, D. Directive 2013/39/UE du Parlement européen et du Conseil du 12 août 2013 modifiant les directives 2000/60/CE et 2008/105/CE en ce qui concerne les substances prioritaires pour la politique dans le domaine de l'eau.

A. Hussain, Q. 2012. Macroinvertebrates in streams: A review of some ecological factors.

Abdallah, M. A. E., C. Uchea, J. K. Chipman, and S. Harrad. 2014. Enantioselective biotransformation of hexabromocyclododecane by in vitro rat and trout hepatic sub-cellular fractions. Environmental Science and Technology **48**:2732-2740.

AFNOR. 2010. Determination of the Toxicity of Fresh Water Sediments to Chironomous Riparius - Part 1: Natural Sediments Water Quality.

Ahmadov, I., N. Agayeva, and N. Sadigova. 2017. The impact of nanoparticles on the embrional and postembrional development in molluscs Lymnaea Auricularia. European Journal of Biomedical and Life Sciences:19-22.

Aksenova, O., M. Vinarski, I. Bolotov, A. Kondakov, Y. Bespalaya, A. Tomilova, I. Paltser, and M. Gofarov. 2017. Two Radix spp. (Gastropoda: Lymnaeidae) endemic to thermal springs around Lake Baikal represent ecotypes of the widespread Radix auricularia. Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research **55**:298-309.

Al-Hassen, S., A. Jafar, and I. Al Qarooni. 2014. Estimation and comparative acute toxicity of some heavy metals on two freshwater snails. **3**:13-19.

Ali, A. and C. Morris. 1992. Management of non-biting aquatic midges. IFAS, Univ. of Florida Medical Entomology Laboratory Technical Bulletin.

Almamoori, A., K. Al-Morshidy, R. Banwawi, and A. Kadhim. 2015. Molecular Biomarker of heavy metal toxicity in Lymnaea auricularia (L.,1758) after acute exposure. IOSR-JESTFT **9**:21-24.

Alric, B., O. Geffard, A. Chandesris, M. Ferréol, A. François, O. Perceval, J. Piffady, B. Villeneuve, and A. Chaumot. 2019. Multisubstance Indicators Based on Caged Gammarus Bioaccumulation Reveal the Influence of Chemical Contamination on Stream Macroinvertebrate Abundances across France. Environmental Science & Technology.

Amorim, J., I. Abreu, P. Rodrigues, D. Peixoto, C. Pinheiro, A. Saraiva, A. P. Carvalho, L. Guimarães, and L. Oliva-Teles. 2019. Lymnaea stagnalis as a freshwater model

invertebrate for ecotoxicological studies. Science of the Total Environment **669**:11-28.
ANSES. 2016. Étude de l'alimentation totale infantile.
Armitage, P. D. C., P.S. ; Pinder, L.C.V. 1995. The Chironomidae: Biology and ecology of non-biting midges, London.
Arnot, J. A. and F. A. P. C. Gobas. 2006. A review of bioconcentration factor (BCF) and bioaccumulation factor (BAF) assessments for organic chemicals in aquatic organisms. Environmental Reviews **14**:257-297.
Arnot, J. A., D. Mackay, and M. Bonnell. 2008a. Estimating metabolic biotransformation rates in fish from laboratory data. Environmental Toxicology and Chemistry **27**:341-351.
Arnot, J. A., D. Mackay, T. F. Parkerton, and M. Bonnell. 2008b. A database of fish biotransformation rates for organic chemicals. Environmental Toxicology and Chemistry **27**:2263-2270.
Ashauer, R., I. Caravatti, A. Hintermeister, and B. I. Escher. 2010a. Bioaccumulation kinetics of organic xenobiotic pollutants in the freshwater invertebrate Gammarus pulex modeled with prediction intervals. Environmental Toxicology and Chemistry **29**:1625-1636.
Ashauer, R. and B. I. Escher. 2010. Advantages of toxicokinetic and toxicodynamic modelling in aquatic ecotoxicology and risk assessment. J Environ Monit **12**:2056-2061.
Ashauer, R., A. Hintermeister, I. Caravatti, A. Kretschmann, and B. I. Escher. 2010b. Toxicokinetic and toxicodynamic modeling explains carry-over toxicity from exposure to diazinon by slow organism recovery. Environmental Science and Technology **44**:3963-3971.
Ashauer, R., A. Hintermeister, I. O'Connor, M. Elumelu, J. Hollender, and B. I. Escher. 2012. Significance of xenobiotic metabolism for bioaccumulation kinetics of organic chemicals in gammarus pulex. Environmental Science and Technology **46**:3498-3508.
Ashauer, R. and T. Jager. 2018. Physiological modes of action across species and toxicants: the key to predictive ecotoxicology. Environmental Science: Processes & Impacts.
Atli, G. and M. Grosell. 2016. Characterization and response of antioxidant systems in the tissues of the freshwater pond snail (Lymnaea stagnalis) during acute copper exposure. Aquatic Toxicology **176**:38-44.
Babut, M. 2016. Conception d'une stratégie de veille vis-à-vis des contaminants émergents dans le bassin Rhône-Méditerrannée. Irstea, Lyon.
Babut, M., B. Ferrari, M. Lauzent, C. Simonnet-Laprade, P. Labadie, and H. Budzinski. 2016a. 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. ONEMA, Paris, France.
Babut, M., B. J. D. Ferrari, M. Lauzent, C. Simonnet-Laprade, P. Labadie, and H. Budzinski. 2016b. Accumulation de contaminants prioritaires par des invertébrés et poissons d'eau douce - Facteurs d'amplification trophique pour l'hexabromocyclododécane, le perfluorooctane sulfonate et les polybromodiphényléthers. Onema.
Babut, M., A. Roy, C. Lopes, and S. Pradelle. 2011. Contamination des poissons d'eau douce par les PCB et d'autres contaminants persistants dans le bassin Rhône-Méditerranée. Détermination de facteurs d'accumulation sédiments-poissons et d'une valeur seuil dans le sédiment au-delà de laquelle les poissons risquent de dépasser le seuil réglementaire de consommation. Cemagref - DREAL Rhône-Alpes, Délégation de bassin, Lyon.
Balian, E. V. 2008. Freshwater Animal Diversity Assessment. Springer Netherlands.

Bandow, C. and L. Weltje. 2012. Development of an embryo toxicity test with the pond snail Lymnaea stagnalis using the model substance tributyltin and common solvents. Sci Total Environ **435-436**:90-95.

Barón, E., G. Santín, E. Eljarrat, and D. Barceló. 2014. Occurrence of classic and emerging halogenated flame retardants in sediment and sludge from Ebro and Llobregat river basins (Spain). Journal of Hazardous Materials **265**:288-295.

Barsi, A. 2015. Couplage d'approches expérimentales et modélisatrices pour l'étude des mécanismes d'effet de perturbateurs endocriniens chez la limnée des étangs, Lymnaea stagnalis.*in* Ecologie, Environnement, Agrocampus Ouest, France.

Baudrimont, M., S. Andres, G. Durrieu, and A. Boudou. 2003. The key role of metallothioneins in the bivalve Corbicula fluminea during the depuration phase, after in situ exposure to Cd and Zn. Aquat Toxicol **63**:89-102.

Bernillon, P. and F. Y. Bois. 2000. Statistical issues in toxicokinetic modeling: A Bayesian perspective. Environmental Health Perspectives **108**:883-893.

Bertin, D., B. J. D. Ferrari, P. Labadie, A. Sapin, D. Da Silva Avelar, R. Beaudouin, A. Péry, J. Garric, H. Budzinski, and M. Babut. 2018. Refining uptake and depuration constants for fluoroalkyl chemicals in Chironomus riparius larvae on the basis of experimental results and modelling. Ecotoxicology and Environmental Safety **149**:284-290.

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

Bertin, D., P. Labadie, B. J. D. Ferrari, A. Sapin, J. Garric, O. Geffard, H. Budzinski, and M. Babut. 2016. Potential exposure routes and accumulation kinetics for poly- and perfluorinated alkyl compounds for a freshwater amphipod: Gammarus spp. (Crustacea). Chemosphere **155**:380-387.

Bervoets, L., G. Meregalli, W. De Cooman, B. Goddeeris, and R. Blust. 2004. Caged midge larvae (Chironomus riparius) for the assessment of metal bioaccumulation from sediments in situ. Environmental Toxicology and Chemistry **23**:443-454.

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

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

Bilitewski, B., R. M. Darbra, and D. Barcelo. 2012. Global Risk-Based Management of Chemical. Additives I: Production, Usage and Environmental Occurence.

Billoir, E., H. Delhaye, B. Clément, M. L. Delignette-Muller, and S. Charles. 2011. Bayesian modelling of daphnid responses to time-varying cadmium exposure in laboratory aquatic microcosms. Ecotoxicology and Environmental Safety **74**:693-702.

Binelli, A., L. Guzzella, and C. Roscioli. 2008. Levels and congener profiles of polybrominated diphenyl ethers (PBDEs) in Zebra mussels (D. polymorpha) from Lake Maggiore (Italy). Environmental Pollution **153**:610-617.

Boisseaux, P. 2017. Développement de marqueurs d'immunocompétence chez le gastéropode d'eau douce Lymnaea stagnalis et applications en écotoxicologie.

Booij, K., F. Smedes, E. M. Van Weerlee, and P. J. C. Honkoop. 2006. Environmental monitoring of hydrophobic organic contaminants: The case of mussels versus

semipermeable membrane devices. Environmental Science and Technology **40**:3893-3900.

Boon, J. P., J. van der Meer, C. R. Allchin, R. J. Law, J. Klungsoyr, P. E. Leonards, H. Spliid, E. Storr-Hansen, C. McKenzie, and D. E. Wells. 1997. Concentration-dependent changes of PCB patterns in fish-eating mammals: structural evidence for induction of cytochrome P450. Arch Environ Contam Toxicol **33**:298-311.

Bouétard, A., C. Noirot, A.-L. Besnard, O. Bouchez, D. Choisne, E. Robe, C. Klopp, L. Lagadic, and M.-A. Coutellec. 2012. Pyrosequencing-based transcriptomic resources in the pond snail Lymnaea stagnalis, with a focus on genes involved in molecular response to diquat-induced stress. Ecotoxicology **21**:2222-2234.

Bourgeault, A. and C. Gourlay-Francé. 2013. Monitoring PAH contamination in water: Comparison of biological and physico-chemical tools. Science of the Total Environment **454-455**:328-336.

Brandsma, S. H., L. T. Van der Ven, J. De Boer, and P. E. Leonards. 2009. Identification of hydroxylated metabolites of hexabromocyclododecane in wildlife and 28-days exposed Wistar rats. Environ Sci Technol **43**:6058-6063.

Brooke, L. T., G. T. Ankley, D. J. Call, and P. M. Cook. 1996. Gut content weight and clearance rate for three species of freshwater invertebrates. Environmental Toxicology and Chemistry **15**:223-228.

Brunet, J. F. 2007. Etat des lieux sur la pollution des fleuves par les PCB dans le monde. Actions des pouvoirs publics. Exemples de décontamination.

Budzinski, H., I. Jones, J. Bellocq, C. Piérard, and P. Garrigues. 1997. Evaluation of sediment contamination by polycyclic aromatic hydrocarbons in the Gironde estuary. Marine Chemistry **58**:85-97.

Butler, G. 1978. Principles of ecotoxicology. Wiley edition, New York.

Cachot, J., O. Geffard, S. Augagneur, S. Lacroix, K. Le Menach, L. Peluhet, J. Couteau, X. Denier, M. H. Devier, D. Pottier, and H. Budzinski. 2006. Evidence of genotoxicity related to high PAH content of sediments in the upper part of the Seine estuary (Normandy, France). Aquat Toxicol **79**:257-267.

Carrasco-Navarro, V., I. Jæger, J. O. Honkanen, J. V. K. Kukkonen, J. Carroll, and L. Camus. 2015. Bioconcentration, biotransformation and elimination of pyrene in the arctic crustacean Gammarus setosus (Amphipoda) at two temperatures. Marine Environmental Research **110**:101-109.

Carrasco Navarro, V., M. T. Leppänen, J. O. Honkanen, and J. V. K. Kukkonen. 2012. Trophic transfer of pyrene metabolites and nonextractable fraction from Oligochaete (Lumbriculus variegatus) to juvenile brown trout (Salmo trutta). Chemosphere **88**:55-61.

Carrier, G., M. Bouchard, N. H. Gosselin, and N. El Majidi. 2006. Réévaluation des risques toxicologiques des biphényls polychlorés. Institut national de santé publique du Québec.

Carson, R. 1962. Silent Spring. Pages 61-106 *in* K. F. Stein, editor. Rachel Carson: Challenging Authors. SensePublishers, Rotterdam.

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

Casado-Martinez, M. C., B. D. Smith, T. A. DelValls, S. N. Luoma, and P. S. Rainbow. 2009a. Biodynamic modelling and the prediction of accumulated trace metal concentrations in the polychaete Arenicola marina. Environmental Pollution **157**:2743-2750.

Casado-Martinez, M. C., B. D. Smith, T. A. DelValls, and P. S. Rainbow. 2009b. Pathways of trace metal uptake in the lugworm Arenicola marina. Aquatic Toxicology **92**:9-17.

Casado-Martinez, M. C., B. D. Smith, S. N. Luoma, and P. S. Rainbow. 2010. Bioaccumulation of arsenic from water and sediment by a deposit-feeding polychaete (Arenicola marina): A biodynamic modelling approach. Aquatic Toxicology **98**:34-43.

Casado-Martinez, M. C., B. D. Smith, and P. S. Rainbow. 2013. Assessing metal bioaccumulation from estuarine sediments: Comparative experimental results for the polychaete Arenicola marina. Journal of Soils and Sediments **13**:429-440.

Charles, S., V. Ducrot, D. Azam, R. Benstead, D. Brettschneider, K. De Schamphelaere, S. F. Goncalves, J. W. Green, H. Holbech, and T. H. Hutchinson. 2016. Optimizing the design of a reproduction toxicity test with the pond snail Lymnaea stagnalis. Regulatory Toxicology and Pharmacology **81**:47-56.

Charles, S. and C. Lopes. 2018. TKTD modelling - Theoritical aspects.*in* Groupe de recherche Ecotoxicologie Aquatique, Irstea Antony, France.

Charles, S., P. Veber, and M. L. Delignette-Muller. 2018. MOSAIC: a web-interface for statistical analyses in ecotoxicology. Environmental Science and Pollution Research **25**:11295-11302.

Charron, L. 2014. Biomarqueurs énergétiques chez un amphipode d'eau douce Gammarus fossarum : Développement, lien avec le succès reproducteur et application in situ.

Chen, C. C. and D. T. F. Kuo. 2018. Bioconcentration model for non-ionic, polar, and ionizable organic compounds in amphipod. Environmental Toxicology and Chemistry **37**:1378-1386.

Chen, D., R. C. Hale, M. J. La Guardia, D. Luellen, S. Kim, and H. N. Geisz. 2015. Hexabromocyclododecane flame retardant in Antarctica: Research stations as sources. Environmental Pollution **206**:611-618.

Cincinelli, A., F. Pieri, T. Martellini, M. Passaponti, M. Del Bubba, S. Del Vento, and A. A. Katsoyiannis. 2014. Atmospheric occurrence and gas-particle partitioning of PBDEs in an industrialised and urban area of Florence, Italy. Aerosol and Air Quality Research **14**:1121-1130.

Ciparis, S. and R. C. Hale. 2005. Bioavailability of polybrominated diphenyl ether flame retardants in biosolids and spiked sediment to the aquatic oligochaete, Lumbriculus variegatus. Environ Toxicol Chem **24**:916-925.

Clément, B., N. Cauzzi, M. Godde, K. Crozet, and N. Chevron. 2005. Pyrene toxicity to aquatic pelagic and benthic organisms in single-species and microcosm tests.

Coeurdassier, M., A. de Vaufleury, R. Scheifler, E. Morhain, and P. M. Badot. 2004. Effects of Cadmium on the Survival of Three Life-Stages of the Freshwater Pulmonate Lymnaea stagnalis (Mollusca: Gastropoda). Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology **72**:1083-1090.

Commission Européenne. 2014. Common Implementation Strategy for the Water Framework Directive (2000/60/EC) - Guidance Document No. 32 on Biota monitoring (The implementation of EQSBIOTA) under the Water Framework Directive. Page 87 *in* U. Européenne, editor.

Coulaud, R., Coulaud. 2012. Modelling and change of scales in ecotoxicological risk assessmment : methodological developments for two freshwater macroinvertebrates, Gammarus pulex (crustacean) and Potamopyrgus antipodarum (gastropod). Université Claude Bernard - Lyon I.

Coulaud, R., O. Geffard, B. Xuereb, E. Lacaze, H. Quéau, J. Garric, S. Charles, and A. Chaumot. 2011. In situ feeding assay with Gammarus fossarum (Crustacea):

Modelling the influence of confounding factors to improve water quality biomonitoring. Water Research **45**:6417-6429.

Covaci, A., A. C. Gerecke, R. J. Law, S. Voorspoels, M. Kohler, N. V. Heeb, H. Leslie, C. R. Allchin, and J. De Boer. 2006a. Hexabromocyclododecanes (HBCDs) in the environment and humans: A review. Environmental Science and Technology **40**:3679-3688.

Covaci, A., A. Gheorghe, O. Hulea, and P. Schepens. 2006b. Levels and distribution of organochlorine pesticides, polychlorinated biphenyls and polybrominated diphenyl ethers in sediments and biota from the Danube Delta, Romania. Environmental Pollution **140**:136-149.

Covaci, A. and G. Malarvannan. 2016. Brominated flame retardants. Pages 379-410 Handbook of Environmental Chemistry. Springer Verlag.

Covaci, A., S. Voorspoels, and J. de Boer. 2003. Determination of brominated flame retardants, with emphasis on polybrominated diphenyl ethers (PBDEs) in environmental and human samples—a review. Environment International **29**:735-756.

Craig, A. a. H., L. and Charest, P.M. and Tessier, A. 1998. effect of exposure regime on the internal distribution of cadmium in Chironomus staegeri larvae (Insecta, Disptera). Aquatic Toxicology **41**:265-275.

Croteau, M.-N. and S. N. Luoma. 2009. Predicting Dietborne Metal Toxicity from Metal Influxes. Environmental Science & Technology **43**:4915-4921.

Croteau, M. N., L. Hare, P. G. Campbell, and Y. Couillard. 2002. Metallothionein-like metal-binding protein in the biomonitor Chaoborus: occurrence and relationship to ambient metal concentrations in lakes. Environ Toxicol Chem **21**:737-741.

Dangles, O., M. O. Gessner, F. Guerold, and E. Chauvet. 2004. Impacts of stream acidification on litter breakdown: implications for assessing ecosystem functioning. Journal of Applied Ecology **41**:365-378.

de Wit, C. A. 2002. An overview of brominated flame retardants in the environment. Chemosphere **46**:583-624.

Delignette-Muller, M. L., C. Lopes, P. Veber, and S. Charles. 2014. Statistical handling of reproduction data for exposure-response modeling. Environ Sci Technol **48**:7544-7551.

Di Toro, D. M., C. S. Zarba, D. J. Hansen, W. J. Berry, R. C. Swartz, C. E. Cowan, S. P. Pavlou, H. E. Allen, N. A. Thomas, and P. R. Paquin. 1991. Technical basis for establishing sediment quality criteria for nonionic organic chemicals using equilibrium partitioning. Environmental Toxicology and Chemistry **10**:1541-1583.

Directive, U. 2013. Directive of the European Parliament and the Council of the European Union for Environmental Quality Standards in the Field of Water Policy (WFD). Official Journal of European Communities.

Dong, L., L. Zheng, S. Yang, Z. Yan, W. Jin, and Y. Yan. 2017. Deriving freshwater safety thresholds for hexabromocyclododecane and comparison of toxicity of brominated flame retardants. Ecotoxicology and Environmental Safety **139**:43-49.

Drouillard, K. G., S. Chan, S. O'Rourke, G. Douglas Haffner, and R. J. Letcher. 2007. Elimination of 10 polybrominated diphenyl ether (PBDE) congeners and selected polychlorinated biphenyls (PCBs) from the freshwater mussel, Elliptio complanata. Chemosphere **69**:362-370.

Du, M., L. Lin, C. Yan, and X. Zhang. 2012. Diastereoisomer- and enantiomer-specific accumulation, depuration, and bioisomerization of hexabromocyclododecanes in Zebrafish (Danio rerio). Environmental Science and Technology **46**:11040-11046.

Duvillard, V. 2018. Cinétiques d'accumulation et d'élimination d'un retardateur de flamme et de son/ses métabolite(s) par un invertébré benthique d'eau douce, Gammarus sp., Université Paris-Descartes.

Eau France. 2015. Fiche état des eaux : RIZAN A MEYZIEU (code station : 06082510). Page Consulté le 08/07/2019.

ECHA. 2008. Member state committee support document for identification of hexabromocyclododecane and all major diastereoisomers identified as a substance of very high concern.

ECHA. 2011. Report of the Persistent Organic Pollutants Review Committee on the work of its seventh meeting. Addendum: Risk management evaluation on hexabromocyclododecane. Persistent Organic Pollutants Review Committee UNEP/POPS/POPRC.7/5:30.

EFSA, E. F. S. A. 2018. Scientific Opinion on the state of the art of Toxicokinetic/Toxicodynamic (TKTD) effect models for regulatory risk assessment of pesticides for aquatic organisms. EFSA Journal **16**.

Efsa, P. o. C. i. t. F. C. 2011. Scientific Opinion on Hexabromocyclododecanes (HBCDDs) in Food. EFSA Journal **9**:2296.

Elangovan, R., K. N. White, and C. R. McCrohan. 1997. Bioaccumulation of aluminium in the freshwater snail Lymnaea stagnalis at neutral pH. Environmental Pollution **96**:29-33.

Englert, D., N. Bakanov, J. P. Zubrod, R. Schulz, and M. Bundschuh. 2017. Modeling Remobilization of Neonicotinoid Residues from Tree Foliage in Streams - A Relevant Exposure Pathway in Risk Assessment? Environmental Science and Technology **51**:1785-1794.

EPA, U. 2000a. Chironomus tentans 10-d Survival and Growth Test for Sediments, Methods for Measuring The Toxicity and Bioaccumualtion of Sediment-associated Contaminants with Freshwater Invertebrates.55-62.

EPA, U. 2000b. Life-cycle Test for Measuring the Effects of Sediment-associated Contaminants on Chironomus tentans, Methods for Measuring the Toxicity and Bioaccumualtion of Sediment-associated Contaminants with Freshwater Invertebrates.84-96.

Esslinger, S., R. Becker, R. Maul, and I. Nehls. 2011. Hexabromocyclododecane enantiomers: microsomal degradation and patterns of hydroxylated metabolites. Environ Sci Technol **45**:3938-3944.

Farid, W. A. and W. A. Farid. 2011. Acute toxicity of benzene on two snails found in Shatt Al-Arab river. AL-TAQANI **24**:86-89.

Fauches, R. l. 2017. Transfer of polyaromatic hydrocarbon in watershed : characterization of sources by stable isotopy. PSL Research University.

Feldmeyer, B., C. W. Wheat, N. Krezdorn, B. Rotter, and M. Pfenninger. 2011. Short read Illumina data for the de novo assembly of a non-model snail species transcriptome (Radix balthica, Basommatophora, Pulmonata), and a comparison of assembler performance. BMC Genomics **12**:317.

Felten, V. 2003. Effets de l'acidification des ruisseaux vosgiens sur la biologie, l'écologie et l'écophysiologie de Gammarus fossarum Koch, 1835 (Crustacea Amphipoda) : Approche intégrée à différents niveaux d'organisation.

Felten, V., G. Charmantier, R. Mons, A. Geffard, P. Rousselle, M. Coquery, J. Garric, and O. Geffard. 2008. Physiological and behavioural responses of Gammarus pulex (Crustacea: Amphipoda) exposed to cadmium. Aquatic Toxicology **86**:413-425.

Ferrari, B. J. D., D. A. L. Vignati, and J. Dominik. 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**:456-469.

Ferrari, B. J. D., D. A. L. Vignati, J. L. Roulier, M. Coquery, E. Szalinska, A. Bobrowski, A. Czaplicka, and J. Dominik. 2019. Chromium bioavailability in aquatic systems impacted by tannery wastewaters. Part 2: New insights from laboratory and in situ testing with Chironomus riparius Meigen (Diptera, Chironomidae). Science of the Total Environment **653**:1-9.

Fisher, S., D. Gossiaux, K. Bruner, and P. Landrum. 1993. Investigations of the toxicokinetics of hydrophobic contaminants in the zebra mussel (Dreissena polymorpha). Zebra mussels: biology, impacts, and control **28**:465–490.

Fliedner, A., N. Lohmann, H. Rüdel, D. Teubner, J. Wellmitz, and J. Koschorreck. 2016. Current levels and trends of selected EU Water Framework Directive priority substances in freshwater fish from the German environmental specimen bank. Environmental Pollution **216**:866-876.

Forfait-Dubuc, C., S. Charles, E. Billoir, and M. L. Delignette-Muller. 2012. Survival data analyses in ecotoxicology: critical effect concentrations, methods and models. What should we use? Ecotoxicology **21**:1072-1083.

Forrow, D. M. and L. Maltby. 2000. Toward a mechanistic understanding of contaminant-induced changes in detritus processing in streams: Direct and indirect effects on detritivore feeding. Environmental Toxicology and Chemistry **19**:2100-2106.

Frank, A. P., P. F. Landrum, and B. J. Eadie. 1986. Polycyclic aromatic hydrocarbon rates of uptake, depuration, and biotransformation by Lake Michigan Stylodrilus heringianus. Chemosphere **15**:317-330.

Frederiksen, M., K. Vorkamp, M. Thomsen, and L. E. Knudsen. 2009. Human internal and external exposure to PBDEs--a review of levels and sources. Int J Hyg Environ Health **212**:109-134.

Fu, Q., A. Rösch, D. Fedrizzi, C. Vignet, and J. Hollender. 2018. Bioaccumulation, Biotransformation, and Synergistic Effects of Binary Fungicide Mixtures in Hyalella azteca and Gammarus pulex: How Different/Similar are the Two Species? Environmental Science and Technology **52**:13491-13500.

Garcia-Galan, M. J., M. Sordet, A. Buleté, J. Garric, and E. Vulliet. 2017. Evaluation of the influence of surfactants in the bioaccumulation kinetics of sulfamethoxazole and oxazepam in benthic invertebrates. Science of the Total Environment **592**:554-564.

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

Gelman, A., J. Carlin, H. Stern, and D. Rubin. 1995. Bayesian Data Analysis, New York, NY, USA.

Gelman, A. and D. B. Rubin. 1992. Inference from Iterative Simulation Using Multiple Sequences. Statist. Sci. **7**:457-472.

Geweke, J. 1989. Bayesian Inference in Econometric Models Using Monte Carlo Integration. Econometrica **57**:1317-1339.

Giessing, A. M. B., L. M. Mayer, and T. L. Forbes. 2003. Synchronous fluorescence spectrometry of 1-hydroxypyrene: A rapid screening method for identification of PAH exposure in tissue from marine polychaetes. Marine Environmental Research **56**:599-615.

Golding, L. A., U. Borgmann, and D. George Dixon. 2013. Cadmium bioavailability to Hyalella azteca from a periphyton diet compared to an artificial diet and application of a biokinetic model. Aquatic Toxicology **126**:291-298.

Gramaglia, C. and M. Babut. 2014. L'expertise à l'épreuve d'une controverse environnementale et sanitaire : la production des savoirs et des ignorances à propos des PCB du Rhône (France). VertigO - la revue électronique en sciences de l'environnement.

Grech, A., C. Brochot, J. L. Dorne, N. Quignot, F. Y. Bois, and R. Beaudouin. 2017. Toxicokinetic models and related tools in environmental risk assessment of chemicals. Science of the Total Environment **578**:1-15.

Gross-Sorokin, M. Y., E. P. M. Grist, M. Cooke, and M. Crane. 2003. Uptake and depuration of 4-nonylphenol by the benthic invertebrate Gammarus pulex: How important is feeding rate? Environmental Science and Technology **37**:2236-2241.

Gundacker, C. 2000. Comparison of heavy metal bioaccumulation in freshwater molluscs of urban river habitats in Vienna. Environmental Pollution **110**:61-71.

Gust, M., M. Fortier, J. Garric, M. Fournier, and F. Gagné. 2013. Effects of short-term exposure to environmentally relevant concentrations of different pharmaceutical mixtures on the immune response of the pond snail Lymnaea stagnalis. Science of the Total Environment **445**:210-218.

Habdija, I., J. Lajtner, and I. Belinić. 1995. The Contribution of Gastropod Biomass in Macrobenthic Communities of a Karstic River. Internationale Revue der gesamten Hydrobiologie und Hydrographie **80**:103-110.

Hakk, H. and R. J. Letcher. 2003. Metabolism in the toxicokinetics and fate of brominated flame retardants--a review. Environ Int **29**:801-828.

Hakk, H., D. T. Szabo, J. Huwe, J. Diliberto, and L. S. Birnbaum. 2012. Novel and distinct metabolites identified following a single oral dose of α- or γ-hexabromocyclododecane in mice. Environmental Science & Technology **46**:13494-13503.

Hamelink, J., P. F. Landrum, H. Bergman, and W. H. Benson. 1994. Bioavailability: physical, chemical, and biological interactions. CRC press.

Hansen, D., D. Di Toro, J. McGrath, R. Swartz, D. Mount, R. Burgess, R. Ozretich, H. Bell, and T. Linton. 2003. Procedures for the derivation of equilibrium partitioning sediment benchmarks (ESBs) for the protection of benthic organisms: PAH mixtures. Narragansett.

Hieber, M. and M. O. Gessner. 2002. Contribution of Stream Detrivores, Fungi, and Bacteria to Leaf Breakdown Based on Biomass Estimates. Ecology **83**:1026-1038.

Hirabayashi, K. 1998. Organic matter processing by chironomid larvae (Diptera: Chironomidae). Hydrobiologia **382**:113-118.

Hong, S., J. S. Khim, J. Park, H.-S. Son, S.-D. Choi, K. Choi, J. Ryu, C.-Y. Kim, G. S. Chang, and J. P. Giesy. 2014. Species- and tissue-specific bioaccumulation of arsenicals in various aquatic organisms from a highly industrialized area in the Pohang City, Korea. Environmental Pollution **192**:27-35.

Hong, S. H., N. Kannan, Y. Jin, J. H. Won, G. M. Han, and W. J. Shim. 2010. Temporal trend, spatial distribution, and terrestrial sources of PBDEs and PCBs in Masan Bay, Korea. Marine Pollution Bulletin **60**:1836-1841.

Hwang, H., S. W. Fisher, and P. F. Landrum. 2001. Identifying body residues of HCBP associated with 10-d mortality and partial life cycle effects in the midge, Chironomus riparius. Aquatic Toxicology **52**:251-267.

Ichihara, M., A. Yamamoto, K.-i. Takakura, N. Kakutani, and M. Sudo. 2014. Distribution and pollutant load of hexabromocyclododecane (HBCD) in sewage treatment plants and water from Japanese Rivers. Chemosphere **110**:78-84.

Ifremer. 2018. Valorisation des données de la surveillance chimique DCE dans les masses d'eau du bassin Adour-Garonne (2008- 2015)

Ikenaka, Y., H. Eun, M. Ishizaka, and Y. Miyabara. 2006. Metabolism of pyrene by aquatic crustacean, Daphnia magna. Aquat Toxicol **80**:158-165.

INERIS. 2009. Portail des substances chimiques. Page Consulté le 05/07/2019.

INERIS. 2011. Rapport d'étude - Méthodologie utilisée pour la détermination de normes de qualité environnementale (NQE). Verneuil-en-Halatte, Oise.

Inoue, Y., N. Hashizume, T. Yoshida, H. Murakami, Y. Suzuki, Y. Koga, R. Takeshige, E. Kikushima, N. Yakata, and M. Otsuka. 2012. Comparison of Bioconcentration and Biomagnification Factors for Poorly Water-Soluble Chemicals Using Common Carp (Cyprinus carpio L.). Archives of Environmental Contamination and Toxicology **63**:241-248.

Iqbal, M., J. H. Syed, A. Katsoyiannis, R. N. Malik, A. Farooqi, A. Butt, J. Li, G. Zhang, A. Cincinelli, and K. C. Jones. 2017. Legacy and emerging flame retardants (FRs) in the freshwater ecosystem: A review. Environmental Research **152**:26-42.

Jager, T., F. A. A. Sánchez, B. Muijs, E. G. van der Velde, and L. Posthuma. 2000. Toxicokinetics of polycyclic aromatic hydrocarbons in Eisenia andrei (Oligochaeta) using spiked soil. Environmental Toxicology and Chemistry **19**:953-961.

Janák, K., A. Covaci, S. Voorspoels, and G. Becher. 2005. Hexabromocyclododecane in Marine Species from the Western Scheldt Estuary: Diastereoisomer- and Enantiomer-Specific Accumulation. Environmental Science & Technology **39**:1987-1994.

Janssen, E. M. L., M.-N. l. Croteau, S. N. Luoma, and R. G. Luthy. 2010. Measurement and Modeling of Polychlorinated Biphenyl Bioaccumulation from Sediment for the Marine Polychaete *Neanthes arenaceodentata* and Response to Sorbent Amendment. Environmental Science & Technology **44**:2857-2863.

Janssen, E. M. L., J. K. Thompson, S. N. Luoma, and R. G. Luthy. 2011. PCB-induced changes of a benthic community and expected ecosystem recovery following in situ sorbent amendment. Environmental Toxicology and Chemistry **30**:1819-1826.

Jensen, S. 1966. Report of a new chemical hazard. New scientist **32**:612.

Jensen, S. 1972. The PCB story. Ambio **1**:123-131.

Jeon, J., D. Kurth, R. Ashauer, and J. Hollender. 2013. Comparative toxicokinetics of organic micropollutants in freshwater crustaceans. Environmental Science and Technology **47**:8809-8817.

Jin, X., F. Liu, Y. Wang, L. Zhang, Z. Li, Z. Wang, J. P. Giesy, and Z. Wang. 2015. Probabilistic ecological risk assessment of copper in Chinese offshore marine environments from 2005 to 2012. Marine Pollution Bulletin **94**:96-102.

Jouany, J. 1971. Nuisances et Ecologie. Actualités Pharmaceutiques **69**:11-22.

Journal Officiel. 2005. Arrêté du 30 juin 2005 relatif au programme national d'action contre la pollution des milieux aquatiques par certaines substances dangereuses.

Jubeaux, G., R. Simon, A. Salvador, H. Queau, A. Chaumot, and O. Geffard. 2012. Vitellogenin-like proteins in the freshwater amphipod Gammarus fossarum (Koch, 1835): functional characterization throughout reproductive process, potential for use as an indicator of oocyte quality and endocrine disruption biomarker in males. Aquat Toxicol **112-113**:72-82.

Katagi, T. 2010. Bioconcentration, bioaccumulation, and metabolism of pesticides in aquatic organisms. Rev Environ Contam Toxicol **204**:1-132.

Kelly, D. W., J. T. A. Dick, and W. I. Montgomery. 2002. The functional role of Gammarus(Crustacea, Amphipoda): shredders, predators, or both? Hydrobiologia **485**:199-203.

Kendall, R. J. A., Todd A.; Baker, Robert J.; Bens, Catherine M.; Carr, James A.; Chiodo, Louis A.; Cobb, George P. III;Dickerson, Richard L.; Dixon, Kenneth R.; Frame, Lynn T.; Hooper, Michael J.; Martin, Clyde F.; McMurry, Scott T.; Patino,Reynaldo; Smith, Ernest E.; and Theodorakis, Christopher 2001. Ecotoxicology. USDA National Wildlife ResearchCenter - Staff Publications.

Kim, U. J., N. T. H. Yen, and J. E. Oh. 2014. Hydroxylated, methoxylated, and parent polybrominated diphenyl ethers (PBDEs) in the inland environment, Korea, and potential OH- and MeO-BDE source. Environmental Science and Technology **48**:7245-7253.

Koch, C., T. Schmidt-Kötters, R. Rupp, and B. Sures. 2015. Review of hexabromocyclododecane (HBCD) with a focus on legislation and recent publications concerning toxicokinetics and -dynamics. Environmental Pollution **199**:26-34.

Kohler, M., M. Zennegg, C. Bogdal, A. C. Gerecke, P. Schmid, N. V. Heeb, M. Sturm, H. Vonmont, H. P. E. Kohler, and W. Giger. 2008. Temporal trends, congener patterns, and sources of octa-, nona-, and decabromodiphenyl ethers (PBDE) and hexabromocyclododecanes (HBCD) in Swiss Lake sediments. Environmental Science and Technology **42**:6378-6384.

Kuhlmann, J., A. C. Kretschmann, K. Bester, U. E. Bollmann, K. Dalhoff, and N. Cedergreen. 2019. Enantioselective mixture toxicity of the azole fungicide imazalil with the insecticide α-cypermethrin in Chironomus riparius: Investigating the importance of toxicokinetics and enzyme interactions. Chemosphere **225**:166-173.

Kuhnert, A., C. Vogs, R. Altenburger, and E. Kuster. 2013. The internal concentration of organic substances in fish embryos--a toxicokinetic approach. Environ Toxicol Chem **32**:1819-1827.

Kukkonen, J. and P. F. Landrum. 1995. Measuring assimilation efficiencies for sediment-bound PAH and PCB congeners by benthic organisms. Aquatic Toxicology **32**:75-92.

Kunz, P. Y., C. Kienle, and A. Gerhardt. 2010. Gammarus spp. in Aquatic Ecotoxicology and Water Quality Assessment: Toward Integrated Multilevel Tests. Pages 1-76 *in* D. M. Whitacre, editor. Reviews of Environmental Contamination and Toxicology Volume 205. Springer New York, New York, NY.

Kuo, D. T. F. and C. C. Chen. 2016. Deriving in vivo biotransformation rate constants and metabolite parent concentration factor/stable metabolite factor from bioaccumulation and bioconcentration experiments: An illustration with worm accumulation data. Environmental Toxicology and Chemistry **35**:2903-2909.

Kupfer, M. H., J.P. . 2019. Radix auricularia (Linnaeus, 1758). DORIS.

Labadie, P., K. Tlili, F. Alliot, C. Bourges, A. Desportes, and M. Chevreuil. 2010. Development of analytical procedures for trace-level determination of polybrominated diphenyl ethers and tetrabromobisphenol A in river water and sediment. Analytical and Bioanalytical Chemistry **396**:865-875.

Lacaze, E. 2011. A biomarker of genotoxicity in Gammarus fossarum : development, functionnal significance and enrinnemental assessment. Université Paul Verlaine - Metz.

Lambert, P. C., A. J. Sutton, P. R. Burton, K. R. Abrams, and D. R. Jones. 2005. How vague is vague? A simulation study of the impact of the use of vague prior distributions in MCMC using WinBUGS. Statistics in Medicine **24**:2401-2428.

Landrum, P. F. 1989. Bioavailability and Toxicokinetics of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons Sorbed to Sediments for the Amphipod Pontoporeia hoyi. Environmental Science and Technology **23**:588-595.

Landrum, P. F., M. J. Lydy, and H. Lee, II. 1992. Toxicokinetics in aquatic systems: Model comparisons and use in hazard assessment. Environmental Toxicology and Chemistry **11**:1709-1725.

Lauzent, M. 2017. Study of ecodynamic persistent organic pollutants and emerging interest halogenated micropollutants in aquatic environments. Université de Bordeaux.

Law, K., V. P. Palace, T. Halldorson, R. Danell, K. Wautier, B. Evans, M. Alaee, C. Marvin, and G. T. Tomy. 2006a. Dietary accumulation of hexabromocyclododecane diastereoisomers in juvenile rainbow trout (Oncorhynchus mykiss) I: Bioaccumulation parameters and evidence of bioisomerization. Environmental Toxicology and Chemistry **25**:1757-1761.

Law, R. J., M. Alaee, C. R. Allchin, J. P. Boon, M. Lebeuf, P. Lepom, and G. A. Stern. 2003. Levels and trends of polybrominated diphenylethers and other brominated flame retardants in wildlife. Environment International **29**:757-770.

Law, R. J., C. R. Allchin, J. de Boer, A. Covaci, D. Herzke, P. Lepom, S. Morris, J. Tronczynski, and C. A. de Wit. 2006b. Levels and trends of brominated flame retardants in the European environment. Chemosphere **64**:187-208.

Law, R. J., A. Covaci, S. Harrad, D. Herzke, M. A. E. Abdallah, K. Fernie, L. M. L. Toms, and H. Takigami. 2014. Levels and trends of PBDEs and HBCDs in the global environment: Status at the end of 2012. Environment International **65**:147-158.

Lebrun, J. D., D. Leroy, A. Giusti, C. Gourlay-Francé, and J. P. Thomé. 2014. Bioaccumulation of polybrominated diphenyl ethers (PBDEs) in Gammarus pulex: Relative importance of different exposure routes and multipathway modeling. Aquatic Toxicology **154**:107-113.

Lebrun, J. D., M. Perret, A. Geffard, and C. Gourlay-Francé. 2012. Modelling copper bioaccumulation in Gammarus pulex and alterations of digestive metabolism. Ecotoxicology **21**:2022-2030.

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

Lee, J.-H., P. F. Landrum, and C.-H. Koh. 2002. Toxicokinetics and Time-Dependent PAH Toxicity in the Amphipod Hyalella azteca. Environmental Science & Technology **36**:3124-3130.

Lee, J.-H., R. G. Richards, and G. F. Birch. 2016. A novel coupled biokinetic-equilibrium model to capture oyster metal bioaccumulation in a contaminated estuary (Sydney estuary, Australia). Environmental Modelling & Software **82**:152-166.

Lee, R. 2003. Photo-oxidation and Photo-toxicity of Crude and Refined Oil Spills.

Leeuwen, C. J. V. 2007. General Introduction. Pages 1-36 *in* C. J. v. Leeuwen and T. G. Vermeire, editors. Risk Assessment of Chemicals: An Introduction. Springer Netherlands, Dordrecht.

Legierse, K. C. H. M., D. T. H. M. Sijm, C. J. Van Leeuwen, W. Seinen, and J. L. M. Hermens. 1998. Bioconcentration kinetics of chlorobenzenes and the organophosphorus pesticide chlorthion in the pond snail Lymnaea stagnalis - A comparison with the guppy Poecilia reticulata. Aquatic Toxicology **41**:301-323.

Leppänen, M. T. and J. V. K. Kukkonen. 1998. Relative importance of ingested sediment and pore water as bioaccumulation routes for pyrene to oligochaete (Lumbriculus variegatus, Muller). Environmental Science and Technology **32**:1503-1508.

Leppänen, M. T. and J. V. K. Kukkonen. 2004. Toxicokinetics of sediment-associated polybrominated diphenylethers (flame retardants) in benthic invertebrates (Lumbriculus variegatus, oligochaeta). Environmental Toxicology and Chemistry **23**:166-172.

Li, P., H. Wu, Q. Li, J. Jin, and Y. Wang. 2015. Brominated flame retardants in food and environmental samples from a production area in China: concentrations and human exposure assessment. Environmental Monitoring and Assessment **187**.

Liu, C., K. Y. H. Gin, V. W. C. Chang, B. P. L. Goh, and M. Reinhard. 2011. Novel perspectives on the bioaccumulation of PFCs - The concentration dependency. Environmental Science and Technology **45**:9758-9764.

Liu, P., D. Ren, G. Du, Y. Zhao, Y. Zhang, and Z. Qin. 2013a. Accumulation of Polybrominated Diphenyl Ethers (PBDEs) in Mudsnails (Cipangopaludina cahayensis) Did Not Increase with Age. Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology **91**:1-5.

Liu, T., J. M. Koene, X. Dong, and R. Fu. 2013b. Sensitivity of isolated eggs of pond snails: a new method for toxicity assays and risk assessment. Environmental Monitoring and Assessment **185**:4183-4190.

Livingstone, D. R. 1994. Recent developments in marine invertebrate organic xenobiotic metabolism. . Toxicological and Ecotoxicological News **1**:88-94.

Livingstone, D. R. 1998. The fate of organic xenobiotics in aquatic ecosystems: quantitative and qualitative differences in biotransformation by invertebrates and fish. Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology **120**:43-49.

Loizeau, J. L., S. Makri, P. Arpagaus, B. Ferrari, C. Casado-Martinez, T. Benejam, and P. Marchand. 2017. Micropolluants métalliques et organiques dans les sédiments superficiels du Léman. Rapports sur les études et recherches entreprises dans le bassin Lémanique. . Commission internationale pour la protection des eaux du Léman contre la pollution- CIPEL, Nyon, Suisse.

Lopes, C., H. Persat, and M. Babut. 2012. Transfer of PCBs from bottom sediment to freshwater river fish: A food-web modelling approach in the RhOne River (France) in support of sediment management. Ecotoxicology and Environmental Safety **81**:17-26.

Lu, G., A. Zhu, H. Fang, Y. Dong, and W. X. Wang. 2019. Establishing baseline trace metals in marine bivalves in China and worldwide: Meta-analysis and modeling approach. Sci Total Environ **669**:746-753.

Luigi, V., M. Giuseppe, and R. Claudio. 2015. Emerging and priority contaminants with endocrine active potentials in sediments and fish from the River Po (Italy). Environ Sci Pollut Res Int **22**:14050-14066.

Luo, X. J., W. Ruan, Y. H. Zeng, H. Y. Liu, S. J. Chen, J. P. Wu, and B. X. Mai. 2013. Trophic dynamics of hexabromocyclododecane diastereomers and enantiomers in fish in a laboratory feeding study. Environmental Toxicology and Chemistry **32**:2565-2570.

Luoma, S. N. and P. S. Rainbow. 2005. Why is metal bioaccumulation so variable ? Biodynamics as a unifying concept. Environmental Science and Technology **39**:1921-1931.

Lydy, M. J., W. L. Hayton, A. E. Staubus, and S. W. Fisher. 1994. Bioconcentration of 5,5′,6 -trichlorobiphenyl and pentachlorophenol in the midge, Chironomus riparius, as measured by a pharmacokinetic model. Archives of Environmental Contamination and Toxicology **26**:251-256.

Lydy, M. J., J. L. Lasater, and P. F. Landrum. 2000. Toxicokinetics of DDE and 2-chlorobiphenyl in Chironomus tentans. Archives of Environmental Contamination and Toxicology **38**:163-168.

Lynch, J. W., A. ; De Leij, FAAM. 2007. Ecotoxicology. Pages 363-373 *in* Elsevier, editor. Encyclopedia of biodyversity, Amsterdam.

MacDonald, D. D., L. M. Dipinto, J. Field, C. G. Ingersoll, E. R. Long, and R. C. Swartz. 2000. Development and evaluation of consensus-based sediment effect concentrations for polychlorinated biphenyls. Environmental Toxicology and Chemistry **19**:1403-1413.

MacKay, D. and A. Fraser. 2000. Bioaccumulation of persistent organic chemicals: Mechanisms and models. Environmental Pollution **110**:375-391.

Macneil, C., J. T. A. Dick, and R. W. Elwood. 1997. The trophic ecology of freshwater Gammarus spp. (crustacea:amphipoda): Problems and perspectives concerning the functional feeding group concenpt. Biological Reviews **72**:349-364.

Macneil, C., J. T. A. Dick, and R. W. Elwood. 1999. The dynamics of predation on Gammarus spp. (Crustacea: Amphipoda). Biological Reviews **74**:375-395.

Mäenpää, K., M. T. Leppänen, and J. V. K. Kukkonen. 2009. Sublethal toxicity and biotransformation of pyrene in Lumbriculus variegatus (Oligochaeta). Science of the Total Environment **407**:2666-2672.

Maltby, L., S. A. Clayton, R. M. Wood, and N. McLoughlin. 2002. Evaluation of the Gammarus pulex in situ feeding assay as a biomonitor of water quality: Robustness, responsiveness, and relevance. Environmental Toxicology and Chemistry **21**:361-368.

Maltby, L. and M. Crane. 1994. Responses of Gammarus pulex (amphipoda, crustacea) to metalliferous effluents: Identification of toxic components and the importance of interpopulation variation. Environmental Pollution **84**:45-52.

Marie, B. 2008. Evolution of nacreous biomineralization in molluscs. Université de Bourgogne.

Martellini, T., G. Diletti, G. Scortichini, M. Lolini, E. Lanciotti, A. Katsoyiannis, and A. Cincinelli. 2016. Occurrence of polybrominated diphenyl ethers (PBDEs) in foodstuffs in Italy and implications for human exposure. Food Chem Toxicol **89**:32-38.

Marvin, C. H., G. T. Tomy, J. M. Armitage, J. A. Arnot, L. McCarty, A. Covaci, and V. Palace. 2011. Hexabromocyclododecane: Current Understanding of Chemistry, Environmental Fate and Toxicology and Implications for Global Management. Environmental Science & Technology **45**:8613-8623.

Massarin, S., R. Beaudouin, F. Zeman, M. Floriani, R. Gilbin, F. Alonzo, and A. R. R. Pery. 2011. Biology-Based Modeling To Analyze Uranium Toxicity Data on Daphnia magna in a Multigeneration Study. Environmental Science & Technology **45**:4151-4158.

Mathieu, A. and M. Babut. 2012. Contamination des poissons d'eau douce par des contaminants persistants - Etude des relations biote-sédiment (PCB). Vincennes.

McElroy, A. E., A. Bogler, D. Weisbaum, M. Norris, L. V. Mendelman, R. Setlow, and R. Winn. 2006. Uptake, metabolism, mutant frequencies and mutational spectra in lambda transgenic medaka embryos exposed to benzo[alpha]pyrene dosed sediments. Marine Environmental Research **62 Suppl**:S273-277.

McLeod, P. B., S. N. Luoma, and R. G. Luthy. 2008. Biodynamic modeling of PCB uptake by Macoma balthica and Corbicula fluminea from sediment amended with activated carbon. Environmental Science and Technology **42**:484-490.

McMahon, R. F. 1983. 9 - Physiological Ecology of Freshwater Pulmonates. Pages 359-430 *in* W. D. Russell-Hunter, editor. Ecology. Academic Press.

Miller, T. H., N. R. Bury, S. F. Owen, and L. P. Barron. 2017. Uptake, biotransformation and elimination of selected pharmaceuticals in a freshwater invertebrate measured using liquid chromatography tandem mass spectrometry. Chemosphere **183**:389-400.

Ming, S. J. H. 2006. Bioavailability of Heavy Metals in Water. Water Purification Technology.

Moller Pillot, H. K. M. 2009. Chironomidae larvae. KNNV Uitgeverij, Utrecht.

Moriarty, F. 1983. Ecotoxicology: the study of pollutants in ecosystems. Academic edition, London.

Moriarty, F. 1988. Ecotoxicology. Human Toxicology **7**:437-441.

Morrison, H. A., F. A. P. C. Gobas, R. Lazar, and G. D. Haffner. 1996. Development and Verification of a Bioaccumulation Model for Organic Contaminants in Benthic Invertebrates. Environmental Science & Technology **30**:3377-3384.

Mourier, B., M. Desmet, P. C. Van Metre, B. J. Mahler, Y. Perrodin, G. Roux, J. P. Bedell, I. Lefevre, and M. Babut. 2014. Historical records, sources, and spatial trends of PCBs along the Rhone River (France). Sci Total Environ **476-477**:568-576.

Mouthon, J. 1982. Les mollusques dulcicoles - Données biologiques et écologiques - Clés de détermination des principaux genres de bivalves et de gastéropodes de France. Bull. Fr. Piscic.:1-27.

Mouthon, J. 2001. Mollusques dulcicoles et pollutions biodégradables des cours d'eau : échelle de sensibilité des espèces, genres et familles. Ingénieries - E A T:p. 3 - p. 15.

Mum, D. C. G., B. E. Townsend, and W. L. Lockhart. 1983. Bioavailability of six organic chemicals to Chironomus Tentans larvae in sediment and water. Environmental Toxicology and Chemistry **2**:269-281.

Muralikrishna, I. V. and V. Manickam. 2017. Chapter Eight - Environmental Risk Assessment. Pages 135-152 *in* I. V. Muralikrishna and V. Manickam, editors. Environmental Management. Butterworth-Heinemann.

Naylor, C. and C. Rodrigues. 1995. Development of a test method for Chironomus riparius using a formulated sediment. Chemosphere **31**:3291-3303.

Neeratanaphan. 2008. Water quality and heavy metals contamination in sediment and edible mollusks at Beung Jode reservoir, Khon Kaen province. Warasan Wichai Mokho:197-207.

Newman, M. C. and Y. Zhao. 2008. Ecotoxicology Nomenclature: LC, LD, LOC, LOEC, MAC. Pages 1187-1193 *in* S. E. Jørgensen and B. D. Fath, editors. Encyclopedia of Ecology. Academic Press, Oxford.

Newsted, J. L. and J. P. Giesy. 1987. Predictive models for photoinduced acute toxicity of polycyclic aromatic hydrocarbons to Daphnia magna, strauss (cladocera, crustacea). Environmental Toxicology and Chemistry **6**:445-461.

NF EN 12880. 2000. Caractérisation des boues - Détermination de la teneur en matière sèche et de la teneur en eau. AFNOR.

NF ISO 10694. 1995. Qualité du sol - Dosage du carbone organique et du carbone total après combustion sèche (analyse élémentaire). AFNOR.

NF ISO 11261. 1995. Qualité du sol - Dosage de l'azote total - Méthode de Kjeldahl modifiée. AFNOR.

Nichols, J. W., P. N. Fitzsimmons, and L. P. Burkhard. 2007. In vitro-in vivo extrapolation of quantitative hepatic biotransformation data for fish. II. Modeled effects on chemical bioaccumulation. Environmental Toxicology and Chemistry **26**:1304-1319.

Norstrom, R. J., A. E. McKinnon, and A. S. W. deFreitas. 1976. A Bioenergetics-Based Model for Pollutant Accumulation by Fish. Simulation of PCB and Methylmercury Residue Levels in Ottawa River Yellow Perch (Perca flavescens). Journal of the Fisheries Research Board of Canada **33**:248-267.

Note technique. 2017. Note technique du 26/12/17 relative à la mise en oeuvre du suivi des substances de l'état chimique des eaux de surface dans le biote dans le cadre de la directive, cadre sur l'eau conformément à la directive 2013/39/UE du Parlement européen et du Conseil du 12 août 2013.

Noyes, P. D., M. K. McElwee, H. D. Miller, B. W. Clark, L. A. Van Tiem, K. C. Walcott, K. N. Erwin, and E. D. Levin. 2009. The toxicology of climate change: environmental contaminants in a warming world. Environ Int **35**:971-986.

OCDE. 2008. Test No. 315: Bioaccumulation in Sediment-dwelling Benthic Oligochaetes.

OCDE. 2012. Essai n° 305 : Bioaccumulation chez le poisson : exposition via le milieu aquatique et via la voie alimentaire.

OCDE. 2016. Essai n° 243: Essai de reproduction chez Lymnaea stagnalis.

OECD. 2004a. Sediment-Water Chironomid Toxicity Test Using Spiked Sediment. In: OECD Guidelines for the Testing of Chemicals. Pages 1-21.

OECD. 2004b. Sediment-Water Chironomid Toxicity Test Using Spiked Water. In: OECD Guidelines for the Testing of Chemicals. Pages 1-21.

OECD. 2010. Sediment-Water Chironomid Life-Cycle Toxicity Test Using Spiked Water or Spiked Sediment. In: OECD Guidelines for the Testing of Chemicals. Pages 1-29.

OECD. 2016. Guidance document to OECD TG 305, 2nd DRAFT.86.

Oetken, M., K.-U. Ludwichowski, and R. Nagel. 2001. Validation of the preliminary EU-concept of assessing the impact of chemicals to organisms in sediment by using selected substances., nstitute of Hydrobiology, Dresden University of Technology, Dresden, Germany.

Olukunle, O. I. and O. J. Okonkwo. 2015. Concentration of novel brominated flame retardants and HBCD in leachates and sediments from selected municipal solid waste landfill sites in Gauteng Province, South Africa. Waste Management **43**:300-306.

OMS. 1994. Brominated diphenyl ethers. Environmental Health Criteria International Programme on Chemical Safety:162.

ONEMA. 2014. Contamination des sédiments fluviaux et estuariens par les PCB en France métropolitaine. Données 2008 à 2010 du plan national d'échantillonnage PCB. Page Consulté le 05/07/2019. Ministère de la transition écologique et solidaire - Agence française pour la biodiversité.

Parashar, B., M. Kaushik, A. Gupta, R. Swamy, and K. Rao. 1995. Toxicity of some molluscicides to freshwater snail Lymnaea auricularia the vector of animal fasciolasis and to non-target organisms. Proc Acad Environ Biol **4**:183-187.

Peled, M., R. Scharia, and D. Sondack. 1995. Thermal rearrangement of hexabromo-cyclododecane (HBCD).

Perceval, O. and M. Babut. 2012. Projet de directive susbstances prioritaires / NQE (2011/0429) - Evaluation de l'impact des NQE biote en France. Onema, Irstea.

Péry, A. R. R. and J. Garric. 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., R. Mons, P. Flammarion, L. Lagadic, and J. Garric. 2002. A modeling approach to link food availability, growth, emergence, and reproduction for the midge Chironomus riparius. Environmental Toxicology and Chemistry **21**:2507-2513.

Petersen, D. G., F. Reichenberg, and I. Dahllof. 2008. Phototoxicity of pyrene affects benthic algae and bacteria from the Arctic. Environ Sci Technol **42**:1371-1376.

Pfenninger, M., M. Salinger, T. Haun, and B. Feldmeyer. 2011. Factors and processes shaping the population structure and distribution of genetic variation across the species range of the freshwater snail radix balthica(Pulmonata, Basommatophora). BMC Evolutionary Biology **11**:135.

Pinkney, A. E., G. V. Poje, R. M. Sansur, C. C. Lee, and J. M. O'Connor. 1985. Uptake and Retention of14C-Aroclor® 1254 in the Amphipod, Gammarus tigrinus, Fed Contaminated Fungus, Fusarium oxysporum. Archives of Environmental Contamination and Toxicology **14**:59-64.

Pinkster, S. 1972. On members of the Gammarus pulex-group (Crustacea- Amphipoda) from western Europe. Bijdragen tot de Dierkunde **42**:164 - 188.

Piscart, C. and L. Bollache. 2012. Crustacés amphipodes de surface : gammares d'eau douce. Association Française de Limnologie.

Plummer, M. 2016. rjags: Bayesian Graphical Models using MCMC.

PNUE. 2010. Plan des Nations Unies pour l'Environnement : Les inventaires des PCB, le point de départ. Page 122 PEN Mag.

Poma, G., A. Binelli, P. Volta, C. Roscioli, and L. Guzzella. 2014. Evaluation of spatial distribution and accumulation of novel brominated flame retardants, HBCD and PBDEs in an Italian subalpine lake using zebra mussel (Dreissena polymorpha). Environmental Science and Pollution Research **21**:9655-9664.

Programme d'actions 2011-2013. Rapport final du programme d'actions 2011-2013 du bassin Rhône-Méditerranée., DREAL Rhône-Alpes.

R Core Team. 2017. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria.

Raftery, A. E. and S. M. Lewis. 1992. [Practical Markov Chain Monte Carlo]: Comment: One Long Run with Diagnostics: Implementation Strategies for Markov Chain Monte Carlo. Statist. Sci. **7**:493-497.

Rainbow, P. S. 2007. Trace metal bioaccumulation: Models, metabolic availability and toxicity. Environment International **33**:576-582.

Ramade, F. 1977. Ecotoxicologie. Masson edition, Paris.

Rasmussen, J. B. 1984. Comparison of gut contents and assimilation efficiency of fourth instar larvae of two coexisting chironomids Chironomus riparius Meigen and Glyptotendipes paripes (Edwards). Canadian Journal of Zoology **62**:1022-1026.

Ratier, A., C. Lopes, P. Labadie, H. Budzinski, N. Delorme, H. Quéau, L. Peluhet, O. Geffard, and M. Babut. 2019. A Bayesian framework for estimating parameters of a generic toxicokinetic model for the bioaccumulation of organic chemicals by benthic invertebrates: Proof of concept with PCB153 and two freshwater species. Ecotoxicology and Environmental Safety **180**:33-42.

Reátegui-Zirena, E. G. and C. J. Salice. 2018. Parental diet affects embryogenesis of the great pond snail (Lymnaea stagnalis) exposed to cadmium, pyraclostrobin, and tributyltin. Environmental Toxicology and Chemistry **37**:2428-2438.

Règlement 1907/2006. 2006. Règlement (CE) n° 1907/2006 du 18/12/06 concernant l'enregistrement, l'évaluation et l'autorisation des substances chimiques, ainsi que les restrictions applicables à ces substances (REACH), instituant une agence européenne des produits chimiques (Annexe XVII).

Règlement n°143/2011. 2011. Règlement n°143/2011 de la Commission du 17 février 2011 modifiant l'annexe XIV du règlement (CE) n°1907/2006 du Parlement européen et du Conseil concernant l'enregistrement, l'évaluation et l'autorisation des substances chimiques, ainsi que les restrictions applicables à ces substances (REACH). Journal officiel de l'Union Européenne.

Règlement n°1259/2011. 2011. Règlement n°1259/2011 modifiant le règlement (CE) n°1881/2006 en ce qui concerne les teneurs maximales en dioxines, en PCB de type dioxine et en PCB autres que ceux de type dioxine des denrées alimentaires.*in* C. Européenne, editor. Journal officiel de l'Union européenne.

Reinfelder, J. R., N. S. Fisher, S. N. Luoma, J. W. Nichols, and W. X. Wang. 1998. Trace element trophic transfer in aquatic organisms: A critique of the kinetic model approach. Science of the Total Environment **219**:117-135.

Richards, R. G. and M. Chaloupka. 2009. Temperature-dependent bioaccumulation of copper in an estuarine oyster. Science of the Total Environment **407**:5901-5906.

Roberts, S. C., P. D. Noyes, E. P. Gallagher, and H. M. Stapleton. 2011. Species-specific differences and structure-activity relationships in the debromination of PBDE congeners in three fish species. Environ Sci Technol **45**:1999-2005.

Romito, A. M., S. L. Eggert, J. M. Diez, and J. Bruce Wallace. 2010. Effects of seasonality and resource limitation on organic matter turnover by Chironomidae (Diptera) in southern Appalachian headwater streams. Limnology and Oceanography **55**:1083-1092.

Rösch, A., S. Anliker, and J. Hollender. 2016. How Biotransformation Influences Toxicokinetics of Azole Fungicides in the Aquatic Invertebrate Gammarus pulex. Environmental Science and Technology **50**:7175-7188.

Rossetti, Y., L. Rossetti, and M. Cabanac. 1989. Annual oscillation of preferred temperature in the freshwater snail Lymnaea auricularia: effect of light and temperature. Animal Behaviour **37**:897-907.

Roux, C. and A. L. Roux. 1967. Température et métabolisme respiratoire d'espèces sympatriques de gammares du Groupe Pulex [Crustacés, Amphipodes]. Annls Limnol. **3**:3-16.

Rudel, H., J. Muller, J. Nowak, M. Ricking, R. Klein, and M. Kotthoff. 2017. Hexabromocyclododecane diastereomers in fish and suspended particulate matter from selected European waters-trend monitoring and environmental quality standard compliance. Environ Sci Pollut Res Int **24**:18048-18062.

Runck, C. 2007. Macroinvertebrate production and food web energetics in an industrially contaminated stream. Ecological Applications **17**:740-753.

Rust, A. J., R. M. Burgess, B. J. Brownawell, and A. E. McElroy. 2004. Relationship between metabolism and bioaccumulation of benzo[a]pyrene in benthic invertebrates. Environ Toxicol Chem **23**:2587-2593.

Salmelin, J., A. K. Karjalainen, H. Hämäläinen, M. T. Leppänen, H. Kiviranta, J. V. K. Kukkonen, and K. M. Vuori. 2016. Biological responses of midge (Chironomus riparius) and lamprey (Lampetra fluviatilis) larvae in ecotoxicity assessment of PCDD/F-, PCB- and Hg-contaminated river sediments. Environmental Science and Pollution Research **23**:18379-18393.

Sanders, J. M., G. A. Knudsen, and L. S. Birnbaum. 2013. The fate of β-hexabromocyclododecane in female C57BL/6 mice. Toxicological Sciences **134**:251-257.

Santodonato, J., P. Howard, and D. Basu. 1981. Health and Ecological Assessment of Polynuclear Aromatic Hydrocarbons, Park Forest South, Illinois.

Schiavone, S. and M. Coquery. 2010. Guide d'échantillonnage et de prétraitement des sédiments en milieu continental pour les analyses physico-chimiques de la DCE. Cemagref.

Schlenk, D., M. Celander, E. Gallagher, S. George, M. James, S. Kullman, P. Van den Hurk, and K. Willett. 2008. Biotransformation in Fishes. Pages 153-234.

Schniebs, K., P. Gler, M. Vinarski, and A. Hundsdoerfer. 2011. Intraspecific morphological and genetic variability in textitRadixbalthica (textscLinnaeus 1758) (Gastropoda: Basommatophora: Lymnaeidae)with morphological comparison to other European textitRadix species.

Schuler, L. J. and M. J. Lydy. 2001. Chemical and biological availability of sediment-sorbed benzo[a]pyrene and hexachlorobiphenyl. Environmental Toxicology and Chemistry **20**:2014-2020.

Schuler, L. J., M. Wheeler, A. J. Bailer, and M. J. Lydy. 2003. Toxicokinetics of sediment-sorbed benzo[a]pyrene and hexachlorobiphenyl using the freshwater invertebrates Hyalella azteca, Chironomus tentans, and Lumbriculus variegatus. Environmental Toxicology and Chemistry **22**:439-449.

Schultz, I. R., S. Reed, A. Pratt, and A. D. Skillman. 2007. Quantitative oral dosing of water soluble and lipophilic contaminants in the Japanese medaka (Oryzias latipes). Comparative Biochemistry and Physiology - C Toxicology and Pharmacology **145**:86-95.

Sciences et Techniques de l'Environnement, S. 2014. Étude des plans d'eau du programme de surveillance des bassins Rhône-Mediterranée et Corse. Rapport de données brutes et interprétations. Lac du Bourget.

Shi, D., D. Lv, W. Liu, R. Shen, D. Li, and H. Hong. 2017. Accumulation and developmental toxicity of hexabromocyclododecanes (HBCDs) on the marine copepod Tigriopus japonicus. Chemosphere **167**:155-162.

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

Son, M. H., J. Kim, E. S. Shin, S. H. Seo, and Y. S. Chang. 2015. Diastereoisomer- and species-specific distribution of hexabromocyclododecane (HBCD) in fish and marine invertebrates. Journal of Hazardous Materials **300**:114-120.

Spacie, A. and J. L. Hamelink. 1982. Alternative models for describing the bioconcentration of organics in fish. Environmental Toxicology and Chemistry **1**:309-320.

Stapleton, H. M., R. J. Letcher, and J. E. Baker. 2004. Debromination of Polybrominated Diphenyl Ether Congeners BDE 99 and BDE 183 in the Intestinal Tract of the Common Carp (Cyprinus carpio). Environmental Science and Technology **38**:1054-1061.

Staskal, D. F., H. Hakk, D. Bauer, J. J. Diliberto, and L. S. Birnbaum. 2006. Toxicokinetics of polybrominated diphenyl ether congeners 47, 99, 100, and 153 in Mice. Toxicological Sciences **94**:28-37.

Stegeman, J. J. and J. J. Lech. 1991. Cytochrome P-450 monooxygenase systems in aquatic species: carcinogen metabolism and biomarkers for carcinogen and pollutant exposure. Environ Health Perspect **90**:101-109.

Strong, E. E., O. Gargominy, W. F. Ponder, and P. Bouchet. 2008. Global diversity of gastropods (Gastropoda; Mollusca) in freshwater. Hydrobiologia **595**:149-166.

Stroomberg, G. J., F. Ariese, C. A. Gestel, B. Hattum Bv, N. H. Velthorst, and N. M. Straalen. 2004. Pyrene biotransformation and kinetics in the hepatopancreas of the isopod Porcellio scaber. Arch Environ Contam Toxicol **47**:324-331.

Stroomberg, G. J., J. A. de Knecht, F. Ariese, C. A. M. van Gestel, and N. H. Velthorst. 1999. Pyrene metabolites in the hepatopancreas and gut of the isopod Porcellio scaber, a new biomarker for polycyclic aromatic hydrocarbon exposure in terrestrial ecosystems. Environmental Toxicology and Chemistry **18(10)**:2217-2224.

Stuart, H., C. Ibarra, M. A.-E. Abdallah, R. Boon, H. Neels, and A. Covaci. 2008. Concentrations of brominated flame retardants in dust from United Kingdom cars, homes, and offices: Causes of variability and implications for human exposure. Environment International **34**:1170-1175.

Sutton, R., D. Chen, J. Sun, D. J. Greig, and Y. Wu. 2019. Characterization of brominated, chlorinated, and phosphate flame retardants in San Francisco Bay, an urban estuary. Science of the Total Environment **652**:212-223.

Szabo, D. T., J. J. Diliberto, H. Hakk, J. K. Huwe, and L. S. Birnbaum. 2010. Toxicokinetics of the flame retardant hexabromocyclododecane gamma: Effect of dose, timing, route, repeated exposure, and metabolism. Toxicological Sciences **117**:282-293.

Szabo, D. T., J. J. Diliberto, H. Hakk, J. K. Huwe, and L. S. Birnbaum. 2011. Toxicokinetics of the flame retardant hexabromocyclododecane alpha: Effect of dose, timing, route, repeated exposure, and metabolism. Toxicological Sciences **121**:234-244.

Tachet, H. 2010. Invertébrés d'eau douce : Systématique, biologie, écologie. CNRS Editions edition, Paris.

Tanabe, S. 1988. PCB problems in the future: Foresight from current knowledge. Environmental Pollution **50**:5-28.

Teil, M.-J., K. Tlili, M. Blanchard, P. Labadie, F. Alliot, and M. Chevreuil. 2014. Polychlorinated Biphenyls, Polybrominated Diphenyl Ethers, and Phthalates in Roach from the Seine River Basin (France): Impact of Densely Urbanized Areas. Archives of Environmental Contamination and Toxicology **66**:41-57.

Teorell, T. 1937. Kinetics of distribution of substances administered to the body. Archives internationales de pharmacodynamie et de thérapie **57**:205-240.

Thollet, F., C. Le Bescond, M. Lagouy, G. A., G. Grisot, J. Le Coz, M. Coquery, H. Lepage, S. Gairoard, J. C. Gattacceca, J.-P. Ambrosi, and O. Radakovitch. 2018. Observatoire des Sédiments du Rhône. Irstea.

Thomas, S., H. O. Kreuger, and T. Z. Kendall. 2003. Hexabromocyclododecane (HBCD): a prolonged sediment toxicity test with Hyalella azteca using spiked sediment with 2% total organic carbon. Easton, Maryland, USA.

Thorsten, S., A. Körner, M. Ricking , G. Sawal, E. Warmbrunn-Suckrow, and P. Lepom. 2008. PBDE and HBCD levels in surface sediments from German rivers. Pages 1590-1593 Organohalogen Compounds.

Tlili, K., P. Labadie, C. Bourges, A. Desportes, and M. Chevreuil. 2012. Bioaccumulation of polybrominated diphenyl ethers by the freshwater benthic amphipod gammarus pulex. Archives of Environmental Contamination and Toxicology **63**:69-76.

Tomy, G. T., W. Budakowski, T. Halldorson, D. M. Whittle, M. J. Keir, C. Marvin, G. Macinnis, and M. Alaee. 2004a. Biomagnification of α- and γ-Hexabromocyclododecane Isomers in a Lake Ontario Food Web. Environmental Science and Technology **38**:2298-2303.

Tomy, G. T., V. P. Palace, T. Halldorson, E. Braekevelt, R. Danell, K. Wautier, B. Evans, L. Brinkworth, and A. T. Fisk. 2004b. Bioaccumulation, Biotransformation, and Biochemical Effects of Brominated Diphenyl Ethers in Juvenile Lake Trout (Salvelinus namaycush). Environmental Science and Technology **38**:1496-1504.

Tomy, G. T., K. Pleskach, S. H. Ferguson, J. Hare, G. Stern, G. Macinnis, C. H. Marvin, and L. Loseto. 2009. Trophodynamics of some PFCs and BFRs in a western Canadian Arctic marine food web. Environmental Science and Technology **43**:4076-4081.

UNEP. 2010. Technical review of the implications of recycling commercial penta and octabromodiphenyl ethers., Geneva.

Union Européenne. 2003. European Union risk assessment report. Bis(pentabromophenyl) ether. CAS No.: 1163-19-5. EINECS No.: 214-604-9. Rapport final. France et Royaume-Uni au nom de l aCEE.

Urien, N., J. D. Lebrun, L. C. Fechner, E. Uher, A. François, H. Quéau, M. Coquery, A. Chaumot, and O. Geffard. 2016. Environmental relevance of laboratory-derived kinetic models to predict trace metal bioaccumulation in gammarids: Field experimentation at a large spatial scale (France). Water Research **95**:330-339.

Urien, N., E. Uher, E. Billoir, O. Geffard, L. C. Fechner, and J. D. Lebrun. 2015. A biodynamic model predicting waterborne lead bioaccumulation in Gammarus pulex:

Influence of water chemistry and in situ validation. Environmental Pollution **203**:22-30.
US EPA. 2011. Exposure factors handbook: 2011 edition (final). EPA Report EPA/600/R-090/052F, U.S. Environmental Protection Agency, Office of Research and Development, National Center for Environmental Assessment, Washington, DC.
Väinölä, R., J. D. S. Witt, M. Grabowski, J. H. Bradbury, K. Jazdzewski, and B. Sket. 2008. Global diversity of amphipods (Amphipoda; Crustacea) in freshwater. Hydrobiologia **595**:241-255.
Van Ael, E., A. Covaci, R. Blust, and L. Bervoets. 2012. Persistent organic pollutants in the Scheldt estuary: Environmental distribution and bioaccumulation. Environment International **48**:17-27.
Van der Linde, A., A. Jan Hendriks, and D. T. H. M. Sijm. 2001. Estimating biotransformation rate constants of organic chemicals from modeled and measured elimination rates. Chemosphere **44**:423-435.
Verslycke, T. A., A. D. Vethaak, K. Arijs, and C. R. Janssen. 2005. Flame retardants, surfactants and organotins in sediment and mysid shrimp of the Scheldt estuary (The Netherlands). Environmental Pollution **136**:19-31.
Viganò, L., A. Farkas, L. Guzzella, C. Roscioli, and C. Erratico. 2007. The accumulation levels of PAHs, PCBs and DDTs are related in an inverse way to the size of a benthic amphipod (Echinogammarus stammeri Karaman) in the River Po. Science of the Total Environment **373**:131-145.
Viganò, L., C. Roscioli, C. Erratico, L. Guzzella, and A. Farkas. 2009. Polybrominated diphenyl ethers (PBDEs) in gammarids, caddisflies, and bed sediments of the lowland River Po. Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology **82**:200-205.
Vinarski, M., S. Andreeva, and N. Andreev. 2010. Key to freshwater gastropods of Western Siberia (Mollusca: Gastropoda). V. 1. Gastropoda: Pulmonata. Fasc. 1. Families Acroloxidae and Lymnaeidae. [In Russian].
Voorspoels, S., A. Covaci, and P. Schepens. 2003. Polybrominated diphenyl ethers in marine species from the Belgian North Sea and the Western Scheldt Estuary: Levels, profiles, and distribution. Environmental Science and Technology **37**:4348-4357.
Wang, W.-X. and P. S. Rainbow. 2008. Comparative approaches to understand metal bioaccumulation in aquatic animals. Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology **148**:315-323.
Wang, W.-X. and Q.-G. Tan. 2019. Applications of dynamic models in predicting the bioaccumulation, transport and toxicity of trace metals in aquatic organisms. Environmental Pollution **252**:1561-1573.
Wang, W. X. and N. S. Fisher. 1999. Assimilation efficiencies of chemical contaminants in aquatic invertebrates: A synthesis. Environmental Toxicology and Chemistry **18**:2034-2045.
Watanabe, I. and S.-i. Sakai. 2003. Environmental release and behavior of brominated flame retardants. Environment International **29**:665-682.
Wayne, N. L. 2001. Regulation of seasonal reproduction in mollusks. J Biol Rhythms **16**:391-402.
Webster, J. R. and E. F. Benfield. 1986. VASCULAR PLANT BREAKDOWN IN FRESHWATER ECOSYSTEMS. Annual Review of Ecology and Systematics **17**:567-594.
Weltje, L., H. Rufli, F. Heimbach, J. Wheeler, M. Vervliet-Scheebaum, and M. Hamer. 2010. The chironomid acute toxicity test: development of a new test system. Integr Environ Assess Manag **6**:301-307.

Welton, J. S. and R. T. Clarke. 1980. Laboratory Studies on the Reproduction and Growth of the Amphipod, Gammarus pulex (L.). Journal of Animal Ecology **49**:581-592.

Wiest, L., R. Baudot, F. Lafay, E. Bonjour, C. Becouze-Lareure, J.-B. Aubin, P. Jame, S. Barraud, G. L. Kouyi, C. Sébastian, and E. Vulliet. 2018. Priority substances in accumulated sediments in a stormwater detention basin from an industrial area. Environmental Pollution **243**:1669-1678.

Wiklund, C. 1977. Why do males emerge before females? A hypothesis to explain the incidenceof protandry in butterflies. Oecologia **31**:153-158.

Wilding, J. and L. Maltby. 2006. Relative toxicological importance of aqueous and dietary metal exposure to a freshwater crustacean: Implications for risk assessment. Environmental Toxicology and Chemistry **25**:1795-1801.

Xuereb, B., E. Lefevre, J. Garric, and O. Geffard. 2009. Acetylcholinesterase activity in Gammarus fossarum (Crustacea Amphipoda): linking AChE inhibition and behavioural alteration. Aquat Toxicol **94**:114-122.

Yang, J., H. Zhao, and K. M. Chan. 2017. Toxic effects of polybrominated diphenyl ethers (BDE 47 and 99) and localization of BDE-99–induced cyp1a mRNA in zebrafish larvae. Toxicology Reports **4**:614-624.

Zapata, F., G. Wilson Nerida, M. Howison, C. S. Andrade Sónia, M. Jörger Katharina, M. Schrödl, E. Goetz Freya, G. Giribet, and W. Dunn Casey. 2014. Phylogenomic analyses of deep gastropod relationships reject Orthogastropoda. Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences **281**:20141739.

Zegers, B. N., A. Mets, R. Van Bommel, C. Minkenberg, T. Hamers, J. H. Kamstra, G. J. Pierce, and J. P. Boon. 2005. Levels of hexabromocyclododecane in harbor porpoises and common dolphins from western European seas, with evidence for stereoisomer-specific biotransformation by cytochrome P450. Environmental Science and Technology **39**:2095-2100.

Zhang, Y., Y. Lu, P. Wang, Q. Li, M. Zhang, and A. Johnson. 2017. Transport of Hexabromocyclododecane (HBCD) into the soil, water and sediment from a large producer in China.

Zhang, Y., Y. Ruan, H. Sun, L. Zhao, and Z. Gan. 2013. Hexabromocyclododecanes in surface sediments and a sediment core from Rivers and Harbor in the northern Chinese city of Tianjin. Chemosphere **90**:1610-1616.

Zhang, Y., H. Sun, and Y. Ruan. 2014. Enantiomer-specific accumulation, depuration, metabolization and isomerization of hexabromocyclododecane (HBCD) diastereomers in mirror carp from water. Journal of Hazardous Materials **264**:8-15.

Zhao, C. M. and W. X. Wang. 2010. Biokinetic uptake and efflux of silver nanoparticles in Daphnia magna. Environmental Science and Technology **44**:7699-7704.

Zhao, G., Z. Wang, M. H. Dong, K. Rao, J. Luo, D. Wang, J. Zha, S. Huang, Y. Xu, and M. Ma. 2008. PBBs, PBDEs, and PCBs levels in hair of residents around e-waste disassembly sites in Zhejiang Province, China, and their potential sources. Science of the Total Environment **397**:46-57.

Annexes

Annexe A Mesure de la taille des gammares 290
Annexe B Complément des schémas expérimentaux.....291
Annexe C Limites de détection et de quantification 292
Annexe D Test d'alimentation des gammares (test ALIM©) 293

Annexe A

Mesure de la taille des gammares

Pour chaque expérience, la taille moyenne des gammares est obtenue en mesurant la taille de 20 individus placés dans de l'alcool au moment du lancement du test. La mesure de la taille pour chacun des organismes s'effectue en deux étapes :

- Prise de photos

Les photos sont prises à l'aide de la loupe binoculaire équipée d'une caméra, avec le grossissement de 1x pour observer l'organisme entier (logiciel Leica Application Suite (LAS)). Pour chaque série de photo, un étalon taille va être photographié (quadrillage de 5mm de côté). Par la suite, les gammares sont photographiés individuellement après les avoir disposés sur une lame.

- Mesure des tailles

Avec le logiciel SigmaScan Pro, les 20 gammares ont été mesurés de la base de l'antenne jusqu'à l'extrémité du dixième segment, au début et à la fin de l'expérience afin de contrôler la croissance des individus (**Figure A.1**).

Figure A.1. Mesure de la taille des gammares (distance de la base des antennes jusqu'au $10^{ème}$ segment.

Annexe B

Complément des schémas expérimentaux

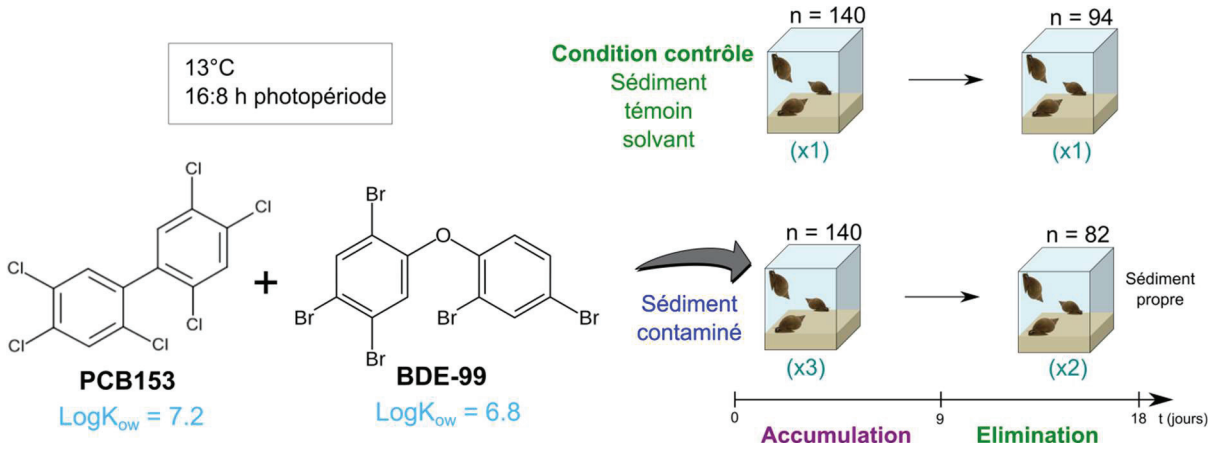


Figure B1. Design expérimental de l'exposition des radix au mélange PCB 153/BDE 99.

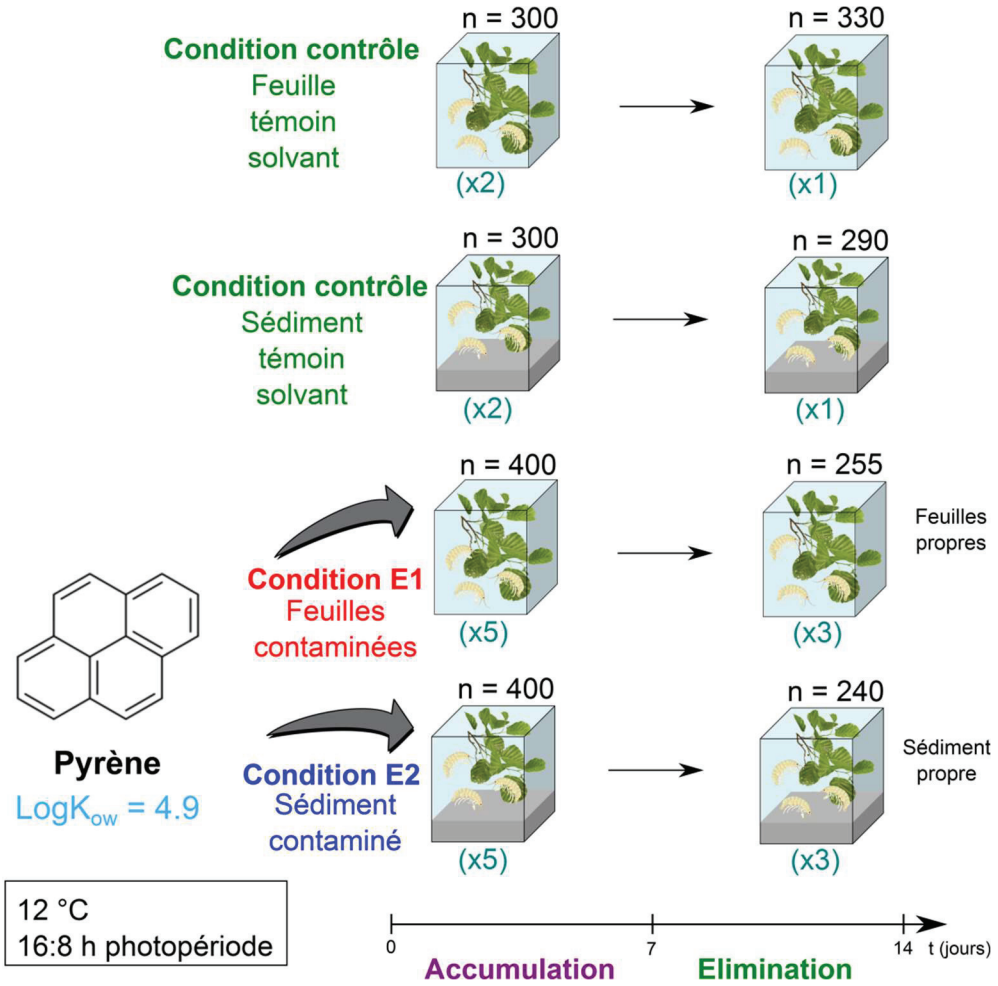


Figure B2. Design expérimental de l'exposition des gammares au pyrène.

Annexe C

Limites de détection et de quantification

Tableau C.1. Limites de détection et de quantification dans les différentes matrices.

	Eau	Sédiment	Feuille	Gammare	Chironome	Radix
LoD (ng L^{-1} ou ng g^{-1} ps)						
PCB 153	0.003-0.06	0.003-0.04	0.003-0.04	0.003-0.04	0.003-0.04	0.09
BDE 99	0.04-0.09	0.088	0.064	0.095	-	0.03
BDE 47	-	-	-	0.099	-	0.03
α-HBCD	0.072-0.531	0.19-1.24	0.43-1.24	0.5-0.57	0.5	-
β-HBCD	0.18-0.708	0.14-0.55	0.24-0.55	0.2-0.27	0.2	-
γ-HBCD	0.096-0.483	0.39-1.62	1.17-1.62	0.48-0.59	0.48	-
Pyrène	0.15	0.02-0.05	0.01-0.07	0.015-0.06	-	-
1-OH-Pyrène	-	5.1	-	0.05	-	-
LoQ (ng L^{-1} ou ng g^{-1} ps)						
PCB 153	0.01-0.19	0.010-0.12	0.010-0.12	0.010-0.12	0.010-0.12	0.3
BDE 99	0.11-0.27	0.265	0.19	0.284	-	0.09
BDE 47	-	-	-	0.297	-	0.10
α-HBCD	0.24-1.77	0.58-3.72	1.29-3.72	1.49-1.72	1.49	-
β-HBCD	0.6-2.36	0.41-1.65	0.72-1.65	0.59-0.82	0.59	-
γ-HBCD	0.32-1.61	1.16-4.85	3.53-4.85	1.43-1.76	1.43	-
Pyrène	0.45	0.05-0.16	0.04-0.2	0.046-0.19	-	-
1-OH-Pyrène	-	15.3	-	0.15	-	-

Annexe D

Test d'alimentation des gammares (test ALIM©)

L'ensemble du protocole utilisé est résumé dans la **Figure D.1**.

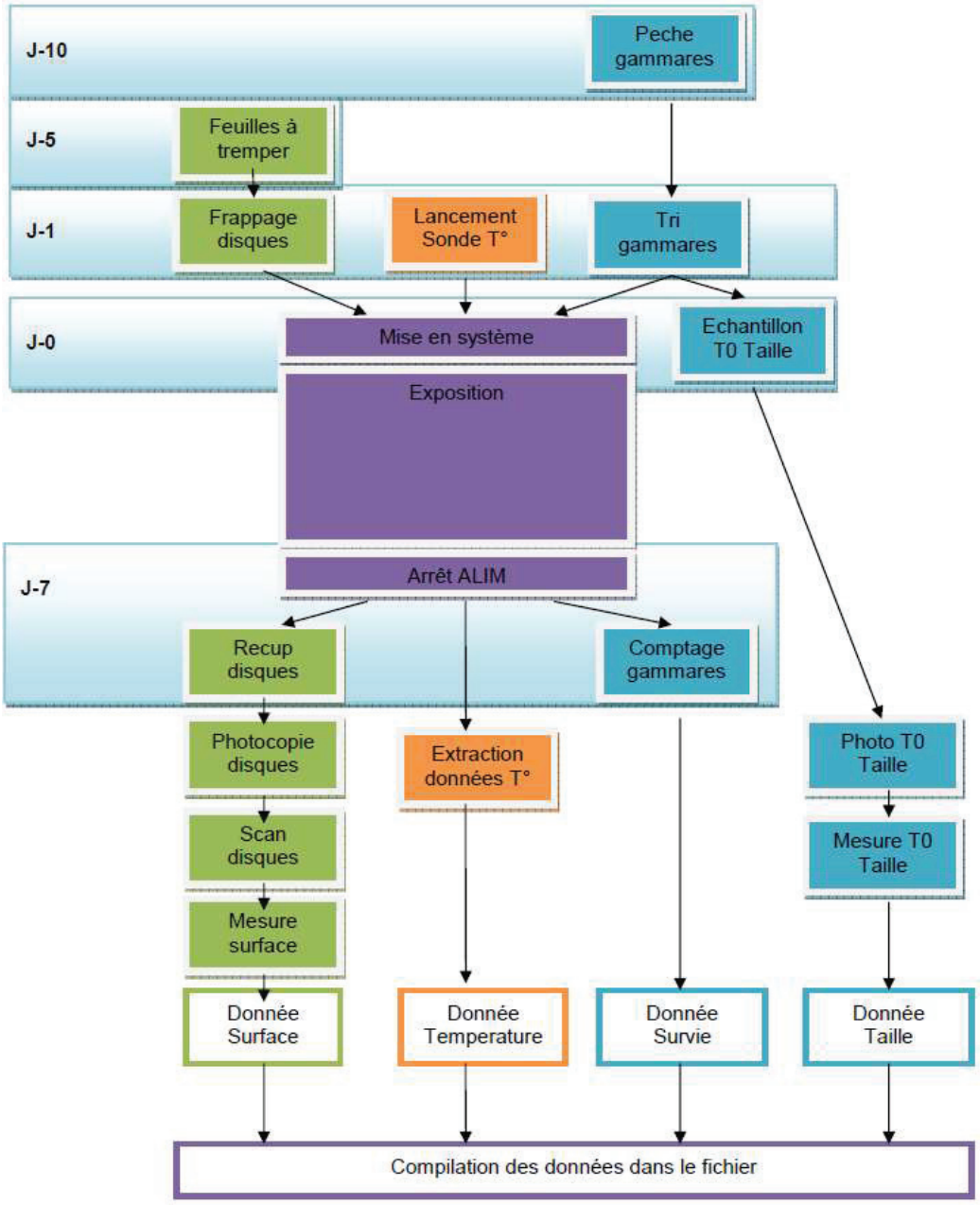


Figure D.1. Synthèse du mode opératoire du test alimentation. *Source : Irstea – N. Delorme.*

Les feuilles pour la préparation des disques sont mises à tremper 4 jours à température ambiante dans de l'eau non contaminée. Les disques de feuilles sont obtenus à l'aide des emporte pièces de 22 mm de diamètre et d'un maillet. Les feuilles épaisses et rougeâtres sont

à proscrire, tout en évitant également de prendre la nervure centrale de la feuille, de ne pas laisser de trous à l'intérieur du disque et d'avoir le pourtour parfaitement rond. Le nombre de disque nécessaire pour l'expérience (10 pour les témoins et 20 pour les réplicats avec gammares) est placé dans un pilulier étiqueté et contenant de l'eau de forage et conservé à 4 °C. Pour chaque condition testée, plusieurs réplicats (généralement 4) sont réalisés. Les gammares exposés sont des mâles calibrés, homogène en taille proche de 10,6 mm. Chaque réplicat contient 20 gammares et autant de disques de feuilles (**Figure D.2-a**). Un témoin feuille est également ajouté au test, constitué de 10 disques et d'aucun gammare.

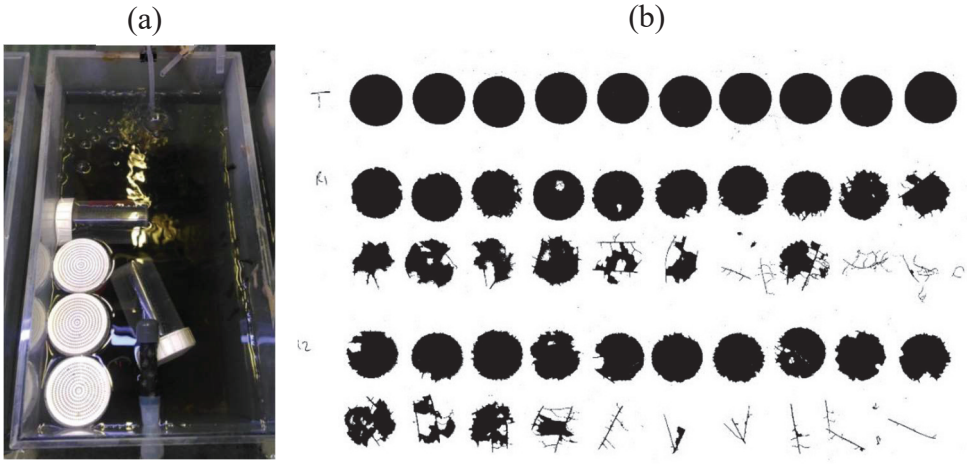
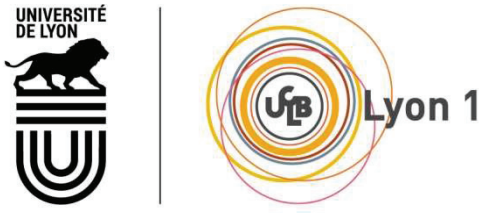


Figure D.2. Systèmes du test alimentation dans l'aquarium (a) et scan de disques de feuilles (exemple de disques suite à l'exposition au BDE 99) (b).

La durée du test est de 7 jours généralement, et la température est mesurée durant toute la durée du test à l'aide d'une sonde paramétrée pour prendre une mesure par heure. Le résultat du test s'obtient en compilant 4 types de données : la survie, la température, la taille (Annexe A) et la surface des disques obtenue par photocopie et scan des disques (**Figure D.2-b**) via le logiciel ImageJ. La compilation des données s'effectue sur un fichier Excel disponible en interne au laboratoire. L'ensemble des taux d'ingestion (IR, ou surfaces de feuilles consommées) obtenus au cours de cette thèse sont présentés dans le **Tableau D.1**.

Tableau D.1. Synthèse des surfaces de feuilles consommées par les gammares.

	Témoin	**E1** (feuilles contaminées)	**E2** (sédiment contaminé)
PCB 153 (J0-J7)	26,8 ± 2,39	25,0 ± 3,05	26,9 ± 3,63
PCB 153 (J7-J14)	31,1 ± 4,76	20,3 ± 4,18	31,8 ± 3,65
HBCD (J0-J9)	31,3 ± 7,38	-	30,9 ± 2,81
HBCD (J9-J18)	17,3 ± 5,73	-	22,3 ± 1,65
BDE 99 (J0-J7)	26,0 ± 9,03	36,5 ± 6,60	26,5 ± 2,47
BDE 99 (J7-J14)	17,7 ± 6,56	15,3 ± 9,22	15,5 ± 7,94
Pyrène (J0-J7)	29,7 ± 6,35	32,3 ± 4,21	29,2 ± 3,17
Pyrène (J7-J14)	25,2 ± 5,36	22,9 ± 3,89	24,4 ± 3,29


UNIVERSITÉ
DE LYON
Lyon 1

irstea

EPOC
LPTC

université
de BORDEAUX

cnrs

LBBE
BIOMETRIE ET BIOLOGIE EVOLUTIVE

biodiversité
Vers une agence française pour la Biodiversité