



# **Devenir et comportement des métaux dans l'eau : biodisponibilité et modèles BLM**

Rapport technique

Ministère de l'Ecologie et du Développement Durable  
Direction de l'Eau  
20, avenue de Ségur – 75302 PARIS 07 SP

Convention DE n° CV03000081 – Opération n° 2

*François LE GOFF - Vincent BONNOMET*

*Direction des Risques Chroniques  
Unité « Evaluation des Risques Ecotoxicologiques »*

**MARS 2004**

# Devenir et comportement des métaux dans l'eau : biodisponibilité et modèles BLM

Rapport technique

Ministère de l'Ecologie et du Développement Durable  
Direction de l'Eau  
20, avenue de Ségur – 75302 PARIS 07 SP

Convention DE n° CV03000081 – Opération n° 2

**MARS 2004**

## PERSONNES AYANT PARTICIPE A L'ETUDE :

**J.P. BLANQUET - V. BONNOMET - M. COQUERY - A. GAUDILLOT  
- F. GONDELLE - N. HOUEIX - F. LE GOFF - H. MAGAUD -  
L. MEUNIER - W. SANCHEZ**

Ce document comporte 85 pages (hors couverture)

	<b>Rédaction</b>	<b>Vérification</b>	<b>Approbation</b>
<b>NOM</b>	F. LE GOFF V. BONNOMET	H. MAGAUD	E. THYBAUD
<b>Qualité</b>	Ingénieurs à l'Unité Evaluation des Risques Ecotoxicologiques	Ingénieur à l'Unité Evaluation des Risques Ecotoxicologiques	Responsable de l'Unité Evaluation des Risques Ecotoxicologiques
<b>Visa</b>			

## RESUME

La directive européenne 2000/60/CE établit un cadre pour maintenir et améliorer la qualité des eaux d'ici 2015. Cette directive présente, en particulier, une stratégie pour le contrôle de la pollution par les substances les plus préoccupantes en imposant de définir des normes de qualité. Ces normes de qualité sont des concentrations seuils qui ne doivent pas être dépassées dans l'eau pour assurer la protection des écosystèmes et de la santé humaine. Quatre métaux font partie de la liste des substances prioritaires accompagnant cette directive : le cadmium, le plomb, le mercure et le nickel.

La détermination des normes de qualité est problématique pour les métaux :

- Les éléments métalliques sont présents, de façon ubiquitaire, en traces dans l'environnement. Il est nécessaire de distinguer les contributions d'origine naturelle des apports anthropiques.
- Les organismes vivants ont évolué en présence des éléments métalliques. Les êtres vivants ont besoin de métaux qualifiés d'essentiels et certains sont adaptés pour vivre dans des environnements particulièrement riches en métaux.
- Dans l'eau, les métaux sont présents sous forme d'ions libres mais ils peuvent aussi se complexer avec des ligands inorganiques et organiques présents, sous forme dissoute, en solution. Seules certaines formes du métal peuvent être assimilables et induire un effet sur les organismes : ce sont les formes biodisponibles.

L'ensemble de ces particularités fait que l'évaluation des risques liés aux métaux ne peut être conduite de la même manière que pour les substances chimiques organiques. De nouvelles méthodes d'évaluation prenant en compte ce particularisme ont commencé à être appliquées dans les évaluations des risques pour les métaux au niveau européen<sup>1</sup>. C'est notamment le cas pour le cadmium, le nickel, le zinc, le chrome, le plomb et le cuivre, ces deux derniers faisant l'objet d'évaluations des risques proposées par l'Industrie.

Les interactions entre les espèces métalliques en solution et les organismes vivants font l'objet de nombreuses études. De la même manière que pour la spéciation des métaux avec les ligands inorganiques et organiques, des programmes de calcul ont été développés pour modéliser la fixation du métal au niveau des « ligands biotiques » (sites de fixation des métaux sur les organismes vivants). Ces modèles dits « *Biotic Ligand Models* » ont été mis au point, pour quelques espèces aquatiques et quelques métaux, afin de prédire la toxicité (aiguë) de ces métaux en fonction des conditions physico-chimiques d'un milieu donné.

Dans le cadre du règlement CE/793/93 pour l'évaluation et le contrôle des risques présentés par les substances existantes, l'évaluation des risques liés à la production et à l'utilisation du zinc pour le milieu aquatique tient compte de la biodisponibilité de celui-ci suivant les milieux étudiés. La méthodologie retenue utilise les BLM développés pour le zinc, pour différents organismes vivants (une algue, un invertébré et un poisson). Des approches similaires seront peut-être proposées dans les années à venir pour la détermination de seuils de qualité. Toutefois ces modèles récents sont encore en cours d'élaboration pour certains et nécessitent des étapes de validation supplémentaires pour d'autres.

L'étude présentée ici a montré l'intérêt mais aussi les limites des BLM proposés pour l'estimation de la biodisponibilité des métaux dans les milieux naturels. En effet, les incertitudes sur les résultats sont encore très importantes et de nombreuses hypothèses n'ont pas encore été validées. Par ailleurs, il est indispensable de bien cerner le domaine d'utilisation des modèles développés compte tenu du peu de validation de leur applicabilité à différentes espèces, différents stades de développement et milieux aquatiques.

---

<sup>1</sup> Evaluation des risques des substances existantes (Règlement CE/793/93)

# TABLE DES MATIERES

<b>RÉSUMÉ</b>	<b>1</b>
<b>TABLE DES MATIÈRES</b>	<b>2</b>
<b>TABLE DES ILLUSTRATIONS</b>	<b>4</b>
<b>INTRODUCTION</b>	<b>7</b>
<b>1. GÉNÉRALITÉS SUR LES MÉTAUX</b>	<b>8</b>
1.1. ORIGINE ET DEVENIR DES MÉTAUX DANS L'ENVIRONNEMENT	8
1.1.1. Apports telluriques naturels : érosion, transport, sédimentation	8
1.1.2. Autres apports d'origine naturelle	9
1.1.3. Apports anthropiques	9
1.1.4. Devenir des métaux dans l'environnement aquatique	10
1.1.5. Détermination des concentrations naturelles en métaux	10
1.1.5.1. Concentrations de référence	11
1.1.5.2. Modélisation géochimique	18
1.2. EVOLUTION DES ORGANISMES EN PRÉSENCE DES MÉTAUX	19
1.2.1. Le caractère essentiel de certains métaux	19
1.2.2. Acclimatation, adaptation, sélection	21
1.2.2.1. Acclimatation	21
1.2.2.2. Sélection et adaptation.	21
1.2.2.3. Implications	22
<b>2. COMPORTEMENT DES MÉTAUX ET BIODISPONIBILITÉ</b>	<b>23</b>
2.1. FORMATION DE COMPLEXES INORGANIQUES	24
2.1.1. Rappels sur les complexes inorganiques	24
2.1.2. Modèles de spéciation inorganique	25
2.2. COMPLEXATION AVEC LA MATIÈRE ORGANIQUE	25
2.2.1. Généralités sur la matière organique dissoute	25
2.2.2. Réactions de complexation avec les métaux	27
2.2.3. Analyse et méthodes de mesure	27
2.2.3.1. Mesure des concentrations en matière organique	27
2.2.3.2. Caractérisation qualitative de la matière organique dissoute par fractionnement	28
2.2.4. Modélisation de la complexation des métaux avec la matière organique	29
2.2.4.1. WHAM	30
2.2.4.2. Modèle NICA - Donnan	38
2.3. COMPLEXATION AVEC LE « LIGAND BIOTIQUE »	40
2.3.1. Généralités	40
2.3.2. Les ligands biotiques I : chez les poissons (les branchies)	41
2.3.3. Les ligands biotiques II : chez les invertébrés	42
2.3.4. Les ligands biotiques III : chez les algues	43

2.3.5.	<i>Modélisation de la complexation métal / ligand biotique</i>	43
2.3.5.1.	Le FIAM (Free Ion Activity Model)	44
2.3.5.2.	Le FIAM modifié	44
2.3.5.3.	GSIM	48
2.3.5.4.	Limites des modèles	49
<b>3.</b>	<b>LE BLM : UN MODÈLE INTÉGRÉ</b>	<b>51</b>
3.1.	UNE APPROCHE CONCEPTUELLE	51
3.2.	LES INTERACTIONS PRISES EN COMPTE	52
3.2.1.	<i>Influence des ions compétiteurs sur la toxicité des métaux</i>	52
3.2.1.1.	Dureté de l'eau (Ca <sup>2+</sup> , Mg <sup>2+</sup> )	52
3.2.1.2.	pH (ions H <sup>+</sup> , OH <sup>-</sup> )	55
3.2.1.3.	L'alcalinité (ions CO <sub>3</sub> <sup>2-</sup> )	56
3.2.1.4.	Autres ions compétiteurs (Na <sup>+</sup> , K <sup>+</sup> , S <sup>2-</sup> , Cl <sup>-</sup> )	56
3.2.2.	<i>Influence de la matière organique sur la toxicité des métaux</i>	56
3.2.3.	<i>Accumulation du métal au niveau du ligand biotique et toxicité</i>	57
3.3.	UN EXEMPLE : BLM-CUIVRE POUR LES DAPHNIES	60
3.3.1.	<i>Construction d'un BLM-cuivre pour les daphnies (invertébrés)</i>	60
3.3.2.	<i>Validation du modèle mis au point</i>	62
3.3.3.	<i>Test du BLM-cuivre pour les daphnies</i>	62
3.4.	ETUDE EXPÉRIMENTALE 1 : INFLUENCE DE LA MATIÈRE ORGANIQUE SUR L'ACCUMULATION DE CUIVRE AU LIGAND BIOTIQUE	65
3.4.1.	<i>Etudes préliminaires</i>	65
3.4.1.1.	Modélisation du devenir du cuivre en présence de matières organiques dissoutes	65
3.4.1.2.	Modélisation de la toxicité du cuivre vis-à-vis de Pimephales promelas	66
3.4.2.	<i>Matériels et méthodes</i>	68
3.4.3.	<i>Résultats et discussion</i>	69
3.5.	ETUDE EXPÉRIMENTALE 2 : TEST DE MODÈLES DE SPÉCIATION	71
3.6.	LIMITES DES BLM	73
	<b>CONCLUSION</b>	<b>75</b>
	<b>RÉFÉRENCES</b>	<b>76</b>

## TABLE DES ILLUSTRATIONS

### *Equations*

Équation 2-1 : Constantes de dissociation pour les différents sites protonés de la matière humique (d'après Tipping, 1994)	31
Équation 2-2 : Réaction d'échange proton / métal au niveau des sites de complexation avec la matière humique et constante d'équilibre associée	31
Équation 2-3 : Effet des interactions électrostatiques sur les constantes de dissociation des protons de la matière humique	32
Équation 2-4 : Expression du facteur d'interaction électrostatique	32
Équation 2-5 : Relation entre les constantes d'affinité des métaux pour les sites A ( $pK_{MHA}$ ) et B ( $pK_{MHB}$ )	33
Équation 2-6 : Constante de complexation métal / substances humiques	37
Équation 2-7 : Constantes d'équilibre pour les systèmes bidendate et tridendate	37
Équation 2-8 : Réaction de complexation entre le métal et le ligand biotique	43
Équation 2-9 : Réaction de complexation du métal au niveau du ligand biotique	44
Équation 2-10 : Expression de l'activité du complexe {ligand biotique / métal}	45
Équation 2-11 : Relation entre la réponse biologique et la concentration en métal	45
Équation 2-12 : Relation entre la réponse biologique et l'activité du complexe {ligand biotique / métal}	45
Équation 2-13 : Généralisation de la relation entre la réponse biologique et l'activité du complexe {ligand biotique / métal} à différentes allures de courbes dose / réponse	45
Équation 2-14 : Expression de la réponse biologique au niveau $\chi_1$	47
Équation 2-15 : Expression de l'activité du complexe {ligand biotique / métal}	47
Équation 2-16 : Linéarisation de la réponse biologique en fonction de la concentration en métal	47
Équation 2-17 : Extension de la linéarisation de la réponse biologique en fonction de la concentration en métal en fonction de l'allure de la courbe dose / réponse	47
Équation 2-18 : Expression de la réponse biologique au niveau $\chi_1$ en fonction de l'allure de la courbe dose / réponse	47

### *Figures*

Figure 1-1 : Devenir des particules sédimentaires dans le cours d'eau : graphique empirique de Hjulström (Hjulström, 1935)	8
Figure 1-2 : Classement biologique des éléments chimiques ( <i>Biological System of the Elements</i> , extrait de Markert, 1994)	20
Figure 1-3 : Evolution de l'activité biologique en fonction des concentrations en métaux essentiels (A) et non essentiels (B)	21
Figure 2-1 : Phénomènes de complexation des métaux dans l'eau	23
Figure 2-2 : Méthodologie de fractionnement de la matière organique dissoute issue d'eaux du milieu naturel (d'après Ma <i>et al.</i> , 2001)	26
Figure 2-3 : Classification de la matière organique dissoute (d'après Leenheer et Croué, 2003)	28
Figure 2-4 : Représentation du système des branchies	41
Figure 2-5 : Aspect de différentes courbes dose-réponse théoriques, avec différentes valeurs de pente (avec n la valeur de la pente de la courbe dose-réponse)	46
Figure 2-6 : Réaction de complexation métal / ligand biotique (membranes des branchies)	48

Figure 2-7 : Concentrations en Pb dans les cellules de l'algue <i>Chlorella kesslerii</i> , à pH 6, après 50 min, lors d'une exposition au plomb libre Pb <sup>2+</sup> constante (pour des concentrations croissantes en Pb total et en acides fulviques (SRFA)). D'après Slaveykova <i>et al.</i> , 2003.	49
Figure 3-1 : Schématisation du fonctionnement du BLM	52
Figure 3-2 : Influence de la dureté de l'eau sur la toxicité des métaux envers les organismes vivants	53
Figure 3-3 : Distribution de certaines espèces inorganiques du cuivre en fonction du pH	55
Figure 3-4 : Accumulation de cuivre dans les branchies de <i>Lepomis gibbosus</i> exposés à des concentrations proches des concentrations létales (d'après Anderson et Spear, 1980)	58
Figure 3-5 : Détoxification des branchies de poissons ayant subi une exposition au cuivre (d'après Anderson et Spear, 1980)	59
Figure 3-6 : Représentation de la mortalité en fonction de l'accumulation de cuivre sur les branchies	60
Figure 3-7 : Influence des paramètres du BLM sur la toxicité du cuivre vis-à-vis de <i>Daphnia magna</i> . Sur les graphiques sont indiqués, en abscisse, les paramètres testés et, en ordonnées, la LC <sub>50</sub> calculée et exprimée en cuivre dissous. Calculs effectués avec le Cu-BLM pour <i>Daphnia magna</i> (Hydroqual, 2002).	63
Figure 3-8 : Modélisation de la complexation du cuivre (cuivre libre) avec la matière organique dissoute (eau des mésocosmes, [Cu] <sub>init</sub> = 10 µM) – WinHumic V version 6	65
Figure 3-9 : Modélisation de la complexation du cuivre (cuivre libre) avec la matière organique dissoute (eau des mésocosmes, [Cu] <sub>init</sub> = 0.39 µM) – WinHumic V version 6	66
Figure 3-10 : Evolution de la toxicité du cuivre vis-à-vis de <i>Pimephales promelas</i> calculée au moyen du BLM (Hydroqual, 2002). Les caractéristiques physico-chimiques du milieu employé pour les tests conduits sur l'épinoche Svecovicus et Vosyliene, 1996 ont été utilisées.	67
Figure 3-11 : Distribution des concentrations en cuivre mesurées dans les branchies des épinoches en présence (1) ou non (2) de matières organiques dissoutes	70
Figure 3-12 : Comparaison entre des mesures de la concentration en cuivre libre par ISE ( <i>Ion Selective Electrode</i> ) et des données obtenues par modélisation	72

## Tableaux

Tableau 1-1 : Concentrations de référence pour la Mer du Nord pour les métaux dissous dans l'eau, sur les matières en suspension (MES) et dans les sédiments	12
Tableau 1-2 : Concentrations de référence pour la Manche pour les métaux dissous dans l'eau, sur les matières en suspension (MES) et dans les sédiments	12
Tableau 1-3 : Concentrations de référence pour l'Atlantique pour les métaux dissous dans l'eau, sur les matières en suspension (MES) et dans les sédiments	12
Tableau 1-4 : Concentrations de référence pour la Méditerranée pour les métaux dissous dans l'eau, sur les matières en suspension (MES) et dans les sédiments	13
Tableau 1-5 : Concentrations en métaux dans les matières en suspension (MES) et dissous dans l'eau: références données par la littérature pour des cours d'eau réputés non-pollués	13
Tableau 1-6 : Concentrations de référence en métaux dans les matières en suspension (MES) pour la Seine	15
Tableau 1-7 : Concentrations de référence en métaux dans les matières en suspension (MES) pour le bassin Artois-Picardie	15
Tableau 1-8 : Intervalles des concentrations mesurées dans les sédiments de ruisseaux et dans les sols en fond de vallons sur le bassin Loire-Bretagne	16
Tableau 1-9 : Concentrations mesurées dans les alluvions anciennes sur le bassin Adour-Garonne.	17
Tableau 1-10 : Concentrations de référence (néerlandaise) en métaux dans les matières en suspension (MES) pour le Rhin	17
Tableau 1-11 : Liste (non exhaustive) des éléments essentiels et non essentiels et exemples de propriétés des éléments connus pour leur essentialité	19

Tableau 2-1 : Dimension des jeux de données utilisés pour la calibration du Model V (partie complexation entre la MO et les cations métalliques)	33
Tableau 2-2 : Valeurs par défaut des paramètres décrivant les propriétés de la matière organique (WHAM 1.0 - Model V)	34
Tableau 2-3 : Principales caractéristiques des eaux étudiées pour tester le WHAM, Model V (d'après Dwane et Tipping, 1998)	36
Tableau 2-4 : Nouveaux paramètres utilisés dans le Model VI	38
Tableau 2-5 : Etapes de l'interaction métal / organisme et hypothèses nécessaires à la modélisation (d'après Campbell <i>et al.</i> , 2002)	40
Tableau 3-1 : Qualification des eaux en fonction de leur dureté	53
Tableau 3-2 : Mise en parallèle des constantes déterminées pour <i>Daphnia magna</i> et <i>Pimephales promelas</i>	61
Tableau 3-3 : Caractéristiques physico-chimiques de l'eau utilisée pour la modélisation	62
Tableau 3-4 : Récapitulatif des essais écotoxicologiques testant les effets du cuivre sur l'épinoche	67
Tableau 3-5 : Qualité de l'eau utilisée pour la modélisation	67
Tableau 3-6 : Caractéristiques des aquariums utilisés au-cours du test	68
Tableau 3-7 : Paramètres physico-chimiques de l'eau des différents aquariums	69
Tableau 3-8 : Suivi de la température, du pH et de l'oxygène dissous au cours du test	70
Tableau 3-9 : Concentrations en cuivre accumulé au niveau des branchies des épinoches	70



## INTRODUCTION

La directive européenne 2000/60/CE établit un cadre pour maintenir et améliorer la qualité des eaux d'ici 2015. Cette directive présente, en particulier, une stratégie pour le contrôle de la pollution par les substances les plus préoccupantes en imposant de définir des normes de qualité. Ces normes de qualité sont des concentrations seuils qui ne doivent pas être dépassées dans l'eau pour assurer la protection des écosystèmes et de la santé humaine. Quatre métaux font partie de la liste des substances prioritaires accompagnant cette directive : le cadmium, le plomb, le mercure et le nickel.

L'ensemble des particularités des métaux (présence naturelle - Cf. point 1.1, essentialité - Cf. point 1.2.1, biodisponibilité - Cf. point 2, etc.) fait que l'évaluation des risques liés à leur utilisation diffère de celle des autres substances chimiques. De nouvelles méthodes prenant en compte ce particularisme ont commencé à être appliquées dans les évaluations des risques pour les métaux au niveau européen<sup>2</sup>. C'est notamment le cas pour le cadmium, le nickel, le zinc, le chrome, le plomb et le cuivre, ces deux derniers faisant l'objet d'évaluations des risques proposées par l'Industrie. Des modèles permettant d'estimer la biodisponibilité des métaux pour les organismes aquatiques, en fonction des caractéristiques physico-chimiques des milieux (BLM : « *Biotic Ligand Models* »), ont fait leur apparition dans ce contexte, et notamment pour le zinc, le nickel et le cuivre.

Il est important de mieux appréhender des outils tels que les BLM afin de pouvoir porter des jugements critiques et étayés sur leur éventuelle utilisation pour l'application de la directive cadre sur l'eau (i.e., définition et application des normes de qualité environnementale). Cette meilleure appréhension passe :

- par une étude bibliographique sur la biodisponibilité des métaux comprenant des éléments sur leur comportement dans l'eau (complexation inorganique - Cf. point 2.1 - et organique - Cf. point 2.2, affinité pour les organismes vivants - Cf. point 2.3) ainsi que sur le développement des BLM (Cf. point 3),
- par des études expérimentales permettant, d'une part, de tester certaines hypothèses des modèles, dans des conditions de laboratoire (Cf. point 3.4) et, d'autre part, de tester les modèles eux-mêmes (Cf. point 3.5).

La majeure partie des exemples utilisés tout au long de ce rapport, aussi bien dans la partie analyse bibliographique que dans la section expérimentale, font référence au cuivre. En effet, à l'INERIS, une étude en mésocosmes, réalisée sur ce métal, a servi de support à la réalisation des expériences exposées en fin de rapport. En outre, l'évaluation des risques liés au cuivre, proposée par l'Industrie à la Commission Européenne, a conduit, entre autres, au développement de BLM pour ce métal.

Ce rapport a pour thème principal la biodisponibilité des métaux, et en particulier l'utilisation de modèles permettant de l'évaluer. La partie 2 traite ainsi du comportement des métaux et de leur biodisponibilité pour les organismes vivants dans les milieux aquatiques tandis que la partie 3 repose sur la description et l'utilisation de modèles dits « BLM ».

Il est également nécessaire d'introduire également les autres éléments qui font des métaux un groupe de substances chimiques particulier (partie 1), et notamment :

- leur présence ubiquitaire à la surface du globe. Les origines à la fois naturelle et anthropique des métaux nécessitent la différenciation des concentrations de fond (naturelle) de celles ajoutées par l'homme (point 1.1),
- le caractère essentiel de certains métaux pour les organismes vivants (point 1.2.1),
- les phénomènes d'acclimatation, de sélection et d'adaptation (point 1.2.2).

---

<sup>2</sup> Evaluation des risques des substances existantes (Règlement CE/793/93)

# 1. Généralités sur les métaux

## 1.1. Origine et devenir des métaux dans l'environnement

### 1.1.1. Apports telluriques naturels : érosion, transport, sédimentation

Les métaux sont naturellement présents dans la croûte terrestre. Les métaux sont des éléments lourds, concentrés dans le magma granitique. Depuis la formation de la Terre, ils suivent un cycle géochimique qui conduit à une distribution hétérogène de leurs concentrations à la surface du globe (Garret, 2000). Les métaux sont présents dans tous les compartiments de l'environnement, mais en général en quantités très faibles (en traces). Néanmoins, des concentrations importantes peuvent être mesurées dans certains sites, tout particulièrement autour des massifs granitiques.

L'érosion de l'écorce terrestre est susceptible d'enrichir les cours d'eau en éléments métalliques. En tête de bassin, les roches sont altérées et désagrégées par l'action mécanique de l'érosion (agents météoriques) et par l'attaque des acides formés dans l'atmosphère (acide carbonique) ou issus de la décomposition de la matière organique (acides humiques). Les métaux fixés dans les roches sous forme d'oxydes ou de silicates sont peu altérables chimiquement : les oxydes et silicates métalliques sont libérés de la roche par érosion et transportés sous forme de particules. Les métaux présents dans les roches sous forme de sulfures et de carbonates sont au contraire attaqués chimiquement et très facilement dissous dans l'eau.

L'eau transporte en aval les débris rocheux et les divers sels mis en solution.

En plaine, lorsque le courant de l'eau devient insuffisant pour assurer le transport des particules rocheuses, celles-ci s'accumulent dans le lit du cours d'eau : il y a sédimentation.

Erosion, transport et sédimentation sont fonction du débit de l'eau et de la taille des particules (Cf. Figure 1-1).

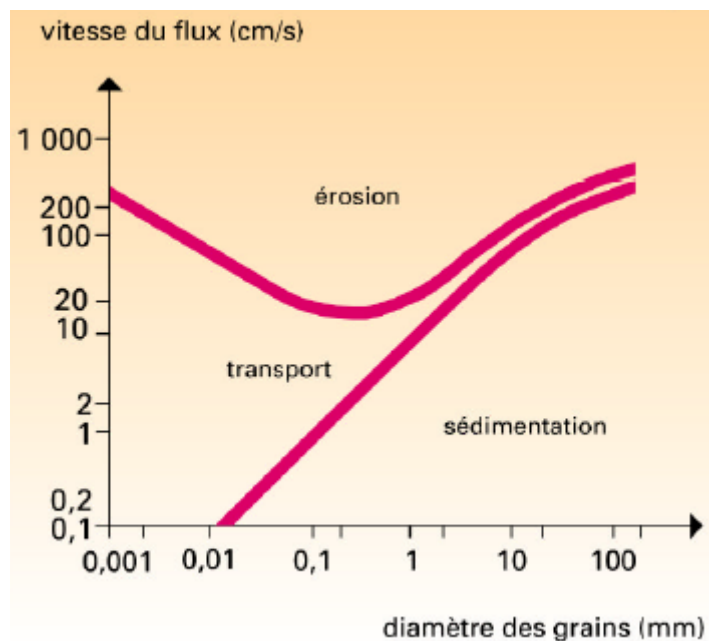


Figure 1-1 : Devenir des particules sédimentaires dans le cours d'eau : graphique empirique de Hjulström (Hjulström, 1935)

Dans les conditions environnementales, les métaux sont relativement peu solubles dans l'eau et restent majoritairement associés à la phase solide. Les concentrations en éléments métalliques dans la phase aqueuse sont comparativement bien moindres par rapport à celles dans la phase solide. Ainsi, le dépôt des particules au fond du lit des cours d'eau conduit potentiellement à une accumulation des éléments métalliques dans les sédiments.

Ces particules solides sont plus ou moins riches en éléments métalliques selon la nature géologique du terrain dont elles sont issues. Quatre fractions minéralogiques majeures peuvent être distinguées : carbonates (calcaires), quartz (silices), argiles (aluminosilicates), matière organique. Comparativement aux terrains siliceux, les terrains carbonatés sont pauvres en éléments métalliques. Les métaux (électropositifs) sont préférentiellement associés chimiquement aux aluminosilicates (chargés négativement). Les métaux inclus dans la matrice rocheuse des particules sédimentaires ne sont pas susceptibles de se dissoudre directement dans l'eau.

Les métaux dissous dans l'eau, notamment ceux apportés ultérieurement par l'activité humaine, ont tendance à s'adsorber à la surface des particules en suspension. Ces métaux adsorbés peuvent être remis en solution en cas de changements des conditions physico-chimiques du milieu (Windom, 1988). L'adsorption sur les particules dépend de la surface exposée et donc de la granulométrie du sédiment. Plus les particules sédimentaires sont petites et plus la surface de contact avec le milieu est importante. Les métaux s'adsorbent en particulier très facilement sur les argiles, très fines particules d'aluminosilicates. L'adsorption est également favorisée lorsque les concentrations en matière organique sont élevées (Cf. partie 2.2).

### 1.1.2. Autres apports d'origine naturelle

Des apports par la voie atmosphérique existent également : volcanisme, érosion et transport éoliens de poussières, transport d'aérosols d'origine océanique, feux de forêts, etc.

Certaines eaux souterraines, en particulier dans les régions volcaniques ou les nappes profondes, sont très riches en métaux.

Pour le cas particulier des eaux marines, l'activité tectonique et le volcanisme sous-marins sont également à l'origine d'un apport en éléments métalliques.

### 1.1.3. Apports anthropiques

Du fait de leurs propriétés physiques intéressantes (bons conducteurs de chaleur et d'électricité, caractéristiques de dureté, de malléabilité, possibilités d'alliages, propriétés catalytiques, etc.) les métaux sont très largement utilisés par l'homme. Cette utilisation n'a apporté aucun changement quant aux quantités de métaux présentes sur Terre : l'activité humaine ne crée ni ne détruit des éléments métalliques<sup>3</sup>. En revanche, elle modifie très significativement leur répartition et les formes chimiques sous lesquelles ils sont présents dans l'environnement (Miquel, 2001).

Les gisements et les filons métallifères sont exploités, parfois de très longue date. Mais l'activité minière peut être à l'origine d'une dispersion des métaux dans l'environnement. Le milieu aquatique, notamment, peut être contaminé *via* les eaux de ruissellement.

Suite à un durcissement des réglementations mais aussi aux efforts importants des industriels eux-mêmes, les émissions industrielles en métaux ont fortement diminué. Toutefois l'industrie est toujours responsable de la majorité des rejets directs dans l'eau. Par ailleurs, le traitement des minerais et l'industrie métallurgique restent à l'origine d'émissions atmosphériques importantes. Les métaux transportés par l'atmosphère peuvent tôt ou tard contaminer les milieux aquatiques

---

<sup>3</sup> La transmutation d'un élément vers un autre, nécessite d'intervenir directement sur le noyau atomique. Cela requiert des énergies considérables et n'est effectué que pour des applications nucléaires très spécifiques et très contrôlées.

La combustion du charbon et du fioul lourd, souvent chargés en métaux, est aussi responsable d'une dispersion atmosphérique significative de ces derniers. L'utilisation du plomb comme antidétonant dans l'essence a constitué un mode de contamination majeur de l'environnement par cet élément.

Les rejets associés à la mise en décharge ou à l'incinération des produits arrivés en fin de vie sont également notables : par exemple pour le plomb et le cadmium dans les piles, batteries et accumulateurs ; pour le mercure dans les instruments de mesure (e. g. thermomètres, baromètres).

Les activités agricoles sont également à l'origine d'une contamination de l'environnement. Le sulfate de cuivre (bouillie bordelaise) est utilisé pour traiter les vignes et les arbres fruitiers. L'arséniat de plomb ou des dérivés mercuriels ont été utilisés dans le passé comme pesticides. Certains engrais, fabriqués à partir de minerais riches en phosphates, peuvent aussi avoir de fortes concentrations en cadmium présent en impureté. Les boues des stations d'épuration, les composts d'ordures ménagères ou le lisier utilisés pour amender les surfaces agricoles sont également susceptibles d'être contaminés par les métaux.

Certaines utilisations posent encore des problèmes particuliers : par exemple, dispersion des plombs de chasse, usure des pneus (le zinc, accompagné du cadmium comme impureté, est utilisé comme durcisseur pour la fabrication des pneus).

#### 1.1.4. Devenir des métaux dans l'environnement aquatique

Les différentes formes chimiques sous lesquelles peuvent être retrouvés les métaux, dépendent de la physico-chimie du milieu (Cf. partie 2). Par exemple, les métaux dissous peuvent précipiter en cas de changements de pH ou de conditions redox, ce qui peut être le cas au niveau des zones de confluences de cours d'eau par exemple.

A mesure que le cours d'eau grandit, la concentration en carbone organique dissous augmente. Ceci permet la formation de complexes stables entre les métaux et la matière organique. Par ailleurs, par l'activité bactérienne, les conditions peuvent devenir anoxiques et réductrices ; les métaux tendent alors à précipiter sous forme de sulfures métalliques. C'est également dans ces conditions réductrices que le mercure est méthylé par les bactéries réductrices de sulfate. Le mercure méthylé est très fortement accumulé par les organismes vivants.

Le cas particulier du devenir des métaux dans les eaux saumâtres et salées des estuaires et du milieu marin, peut poser des problèmes particuliers qui ne seront pas traités dans ce rapport.

#### 1.1.5. Détermination des concentrations naturelles en métaux

Il est essentiel de distinguer la concentration naturelle en métaux de la concentration ambiante.

La concentration naturelle (ou concentration de fond) n'est imputable qu'aux phénomènes naturels de dispersion exposés dans les paragraphes 1.1.1 et 1.1.2.

La concentration ambiante inclut les concentrations naturelles auxquelles s'ajoute la pollution induite par les activités humaines telles celles exposées dans le paragraphe 1.1.3.

Les concentrations naturelles sont en général déterminées par des prélèvements en des sites de référence, préservés de la pollution, ou grâce à la modélisation à partir de données géologiques et hydrologiques.

### 1.1.5.1. Concentrations de référence

Il est en général problématique de trouver des sites préservés de toute pollution en Europe. Des pollutions par les métaux peuvent être mises en évidence par carottage dans des couches sédimentaires parfois très profondes, témoignages d'activités métallurgiques très anciennes (Elbaz-Poulichet *et al.*, 2001). Même pour les sites préservés de toute pollution directe, on ne peut pas exclure qu'intervienne la pollution diffuse, notamment la pollution atmosphérique. Plutôt que des concentrations véritablement naturelles, ce sont en pratique des concentrations ambiantes qui sont mesurées. Elles peuvent toutefois être utilisées comme concentrations de référence, utiles pour détecter une source ponctuelle de pollution. Il est par contre beaucoup plus problématique d'évaluer l'ampleur d'une pollution diffuse par les métaux.

#### 1.1.5.1.1 Concentrations de référence pour les eaux marines

Des concentrations *ambiantes* pour les 4 métaux listés dans la Directive Cadre, compilées par l'Ifremer, sont données à titre indicatif dans les tableaux suivants (Tableau 1-1 à Tableau 1-4). Elles ne représentent pas véritablement des concentrations *naturelles* : les apports dus à la pollution diffuse, notamment atmosphérique, ne peuvent en effet pas être exclus. Dans la mesure du possible, pour la détermination de concentrations de référence, il est ainsi préférable de privilégier les mesures effectuées au large, relativement préservé de la pollution.

Les concentrations en métal dissous sont variables selon les mers. Ces variations peuvent s'expliquer par les différences sur le temps de résidence des eaux (qui dépend notamment des courants et de l'enclavement des masses d'eau) et par les différences dans la production primaire (plus importante dans les eaux froides qui sont mieux oxygénées). En pratique, le degré d'industrialisation des pays avoisinants a également une influence<sup>4</sup>.

Les concentrations dans les sédiments et dans les matières en suspension dépendent de la physico-chimie et de la granulométrie des particules solides. L'eau marine est généralement peu chargée en matière en suspension ; en surface il s'agit surtout de phytoplancton. Lors de bloom algaux, l'adsorption des polluants sur le phytoplancton peut être importante et influencer en particulier la distribution des métaux : d'une part, la proportion de métal dissout dans la phase aqueuse sera ainsi respectivement moins importante par rapport au métal adsorbé ; d'autre part, le métal peut contaminer la chaîne alimentaire *via* l'ingestion du phytoplancton.

Les différences de production primaire peuvent être à l'origine de variations spatio-temporelles sur les concentrations mesurées :

- La densité du phytoplancton est maximale au printemps et en été. Ces variations saisonnières influenceront sur l'année la distribution des métaux entre les différentes phases: aqueuse, solide et biotique.
- En profondeur, l'absence de production primaire et la minéralisation des matières en suspension (phytoplancton qui meurt ou pelotes fécales émises par le zooplancton) se traduisent par une augmentation de la fraction dissoute dans l'eau.

En résumé, il existe des disparités géographiques sur les concentrations naturelles en métaux dans l'eau marine. Mais il n'est en pratique pas possible de faire abstraction de la contamination par les apports anthropiques. En outre les niveaux mesurés dans l'eau dépendent des variations saisonnières et de la profondeur du prélèvement. Les mesures dans les sédiments et les matières en suspension dépendent quant à elles de la nature des particules solides.

---

<sup>4</sup> C'est particulièrement le cas pour le mercure, dont les apports sont principalement d'origine atmosphérique, et dont la contamination est principalement conditionnée par les émissions et les vents dominants. Les océans du Nord sont ainsi plus contaminés au mercure que les océans du Sud.

**Tableau 1-1 : Concentrations de référence pour la Mer du Nord pour les métaux dissous dans l'eau, sur les matières en suspension (MES) et dans les sédiments**

	Eau (ng/L)	MES (µg/g)	Sédiments (µg/g)
<b>Cd</b>	5.6 - 19.1 (au large) Balls, 1985		0.10 - 0.30 (au large, tamisé à 63 µm) Laane <i>et al.</i> , 1999
<b>Hg</b>	< 0.05 - 0.80 (au large) Coquery et Cossa, 1995		
<b>Pb</b>	30 - 60 Brüggmann <i>et al.</i> , 1985, Haarich <i>et al.</i> , 1993	15 - 64 Tappin <i>et al.</i> , 1995, Haarich <i>et al.</i> , 1993	35 - 135 (mer des Wadden), Hagner, 2002
<b>Ni</b>	100 - 900 Mart et Nuernberg, 1986, Haarich <i>et al.</i> , 1993	40 - 72 Haarich <i>et al.</i> , 1993	20 Lichtfuss et Brümmer, 1981

**Tableau 1-2 : Concentrations de référence pour la Manche pour les métaux dissous dans l'eau, sur les matières en suspension (MES) et dans les sédiments**

	Eau (ng/L)	MES (µg/g)	Sédiments (µg/g)
<b>Cd</b>	5.6 - 22.48 Tappin <i>et al.</i> , 1993		1.01 (RNO sed 98)
<b>Hg</b>	0.1 - 1.3 (au large) Cossa <i>et al.</i> , 1994, Cossa et Fileman, 1991		
<b>Pb</b>	12 - 60 Brüggmann <i>et al.</i> , 1985, Statham <i>et al.</i> , 1999, JF Chiffolleau (comm pers)	21 - 33 JF Chiffolleau (comm pers)	3 - 35
<b>Ni</b>	100 - 400 Statham <i>et al.</i> , 1999, JF Chiffolleau (comm pers)	18 - 20 JF Chiffolleau (comm pers)	3 - 33 Ármansson <i>et al.</i> , 1985, RNO sed 2001

**Tableau 1-3 : Concentrations de référence pour l'Atlantique pour les métaux dissous dans l'eau, sur les matières en suspension (MES) et dans les sédiments**

	Eau (ng/L)	MES (µg/g)	Sédiments (µg/g)
<b>Cd</b>	2.25 - 13.49 (large, surf.) 30.35 (large, prof: 800 m) 39.34 (large, prof: 3300 m) (B. Boutier, comm pers)		0.10 - 0.66 (Golfe de Gascogne, plateau continental) (B. Boutier, comm pers)
<b>Hg</b>	0.1 - 2.0 (Golfe de Gascogne) Cossa <i>et al.</i> , 1992		< 0.05 - 0.52 (Golfe de Gascogne) (données RNO)
<b>Pb</b>	30 - 40 (prof: 0-200 m) Shaule et Patterson, 1983, Lambert <i>et al.</i> , 1991  5 (prof: 200-4000 m) Shaule et Patterson, 1983,  11 - 49 (Golfe de Gascogne, Sud Bretagne) Boutier <i>et al.</i> , 1993	6 - 32 (Golfe de Gascogne) (données PNOC Atlantique)	19 - 55 (Golfe de Gascogne) (RNO sed 99)
<b>Ni</b>	120 - 240 (prof: 0-200 m) Bruland et Franks, 1983, Kremling, 1985, Kremling et Pohl, 1989  180 - 400 (prof: 200-4000 m) Yeats et Campbell, 1983, Sclater <i>et al.</i> , 1976  170 - 270 (Golfe de Gascogne) Kraepiel <i>et al.</i> , 1997	29 (Golfe de Gascogne) (JF Chiffolleau, comm pers)	79 Turekian et Wedepohl, 1961  12 - 32 (Golfe de Gascogne) (RNO sed 99)

**Tableau 1-4 : Concentrations de référence pour la Méditerranée pour les métaux dissous dans l'eau, sur les matières en suspension (MES) et dans les sédiments**

	Eau (ng/L)	MES (µg/g)	Sédiments (µg/g)
<b>Cd</b>	5.62 - 12.37 (au large, en surface) Morley <i>et al.</i> , 1990		0.068 (au large) (B. Boutier, comm pers)
<b>Hg</b>	< 0.05 - 0.50 (au large, Golfe du Lion) (Données du programme UE, Eros-2000)		< 0.05 - 0.2 (au large, Golfe du Lion) (Données du programme UE, Eros-2000)
<b>Pb</b>	31 - 120 (prof: 0-200 m) Nicolas <i>et al.</i> , 1994, Laumond <i>et al.</i> , 1984  22 - 44 (prof: 200-4000 m) Nicolas <i>et al.</i> , 1994, Laumond <i>et al.</i> , 1984		6 - 30 (JF Chiffolleau, comm pers)  17 - 64 (Golfe du Lion) (RNO sédiment)
<b>Ni</b>	130 - 260 (prof: 0-200 m) (JF Chiffolleau, comm pers), Spivack <i>et al.</i> , 1983  240 - 300 (prof: 200-4000 m) Boyle <i>et al.</i> , 1985  240 - 480 (Golfe du Lion) Zhang et Wollast, 1990	29 - 130 (prof: 0-200 m) (JF Chiffolleau, comm pers)	9 - 44 (JF Chiffolleau, comm pers)  40 - 60 (Golfe du Lion) Nolting et Helder, 1990

#### 1.1.5.1.2 Concentrations de référence pour les eaux continentales

Des concentrations en métaux pour les fleuves réputés peu pollués peuvent être trouvées dans la littérature, aussi bien dans les matières en suspension (MES) que dissous dans l'eau. Ces concentrations sont présentées dans le Tableau 1-5.

**Tableau 1-5 : Concentrations en métaux dans les matières en suspension (MES) et dissous dans l'eau: références données par la littérature pour des cours d'eau réputés non-pollués**

	MES (µg/g)	Dissous (ng/L)
<b>Cd</b>	0.3 - 0.8 (Thomas et Meybeck, 1992)	1 - 3 (Thomas et Meybeck, 1992) 10 - 350 (Laane, 1992) 2 (van de Berg et Zwolsman, 2000) 20 (Mériani, 1991)
<b>Hg</b>		2 - 130 (Laane, 1992) 1 (van de Berg et Zwolsman, 2000)
<b>Pb</b>	20 - 40 (Thomas et Meybeck, 1992)	20 - 40 (Thomas et Meybeck, 1992) 50 - 8400 (Laane, 1992) 70 (van de Berg et Zwolsman, 2000) 200 (Förstner et Wittman, 1983)
<b>Ni</b>		500- 13300 (Laane, 1992) 1200 (van de Berg et Zwolsman, 2000) 7000 (Mériani, 1991) 300 (Förstner et Wittman, 1983)

Les valeurs rapportées dans Laane, 1992 sont extrêmement variables. Elles sont principalement issues de deux études celle de Zuurdeeg *et al.*, 1992 et celle de Bewers et Yeats, 1989. Dans l'étude de Zuurdeeg *et al.*, 1992, commandée par le ministère de l'environnement néerlandais, 11740 données ont été compilées pour les eaux naturelles (i.e., *a priori* peu polluées) situées dans des régions géologiquement comparables au Pays Bas (régions sédimentaires allant du Nord de la France à la Biélorussie). Ces données proviennent majoritairement de « littérature grise » (non publiée). Pour la sélection de ces données, il a été vérifié que les échantillons prélevés étaient issus de zones épargnées de toute pollution directe (situées à plus de 50 km d'industries ou d'activités agricoles intensives), et répondaient au critère d'oligotrophie (concentration en oxygène > 8 mg/L, faible concentration en azote et en matière organique: DBO5 < 1 mg/L). Compte tenu de

l'évolution des exigences qualitatives pour l'analyse, les données antérieures à 1978 ont été exclues<sup>5</sup>. Pour cette même raison, des données de la littérature ont été sélectionnées par rapport à la réputation des laboratoires, dans l'étude de Bowers et Yeats, 1989. Il est difficile de savoir si la variabilité des concentrations observées reflète une réelle variabilité des concentrations naturelles, ou de protocoles de prélèvement et d'analyse perfectibles.

Les valeurs provenant de van de Berg et Zwolsman, 2000 ont été finalement retenues par les autorités néerlandaises (Struijs *et al.*, 2000).

Thomas et Meybeck, 1992 ont calculé la moyenne des concentrations en métaux dans les fleuves considérés comme peu pollués (Amazone, Orenoque, Parana, Mackenzie, Huang He, Purari) à partir de publications précisant l'utilisation de méthodes ultra-propres.

Les valeurs de Mérian, 1991 et de Förstner et Wittman, 1983 sont citées dans Baqué *et al.*, .

Les valeurs fondées sur des moyennes sont relativement basses. Des concentrations plus importantes peuvent être attendues localement, pour les petits cours d'eau drainant des terrains fortement minéralisés. Pour les fleuves plus importants les concentrations en métaux diminuent rapidement vers l'aval par effet de dilution (dans l'eau, et dans les sédiments par apport de matériaux faiblement minéralisés).

La distribution du métal entre la phase aqueuse et la phase solide peut varier dans le temps et l'espace. Elle dépend des facteurs physico-chimiques. Pour la France, Meybeck, 1986 a étudié la chimie de l'eau de 232 bassins versants monolithologiques pour 25 différents types de roches. Par exemple, les eaux drainées par un socle cristallin ou basaltique sont caractérisées par un faible pH et une faible charge anionique ce qui favorise la dissolution des métaux dans l'eau. Les épisodes à forte pluviométrie conduisent au transport de grandes quantités de matières en suspension sur lesquelles les métaux vont avoir tendance à s'adsorber. Les variations saisonnières de la population en phytoplancton, sur lequel les métaux sont également susceptibles de s'adsorber, influent également sur la distribution des métaux.

#### 1.1.5.1.2.1 Seine - Normandie

Pour le programme PIREN Seine<sup>6</sup>, la concentration naturelle en métaux a été évaluée à partir de prélèvements (particules en suspension et sédiments principalement) sur des ruisseaux forestiers épargnés par la pollution<sup>7</sup>. Le lit lithologique du bassin de la Seine est très homogène : il est constitué à 97% de roches sédimentaires et, en particulier, à 78% de carbonates. Seule la source de l'Yonne, située dans le Morvan, est en terrain siliceux. Du fait de cette homogénéité géologique, la géochimie pour les sites de référence peut être considérée comme représentative de celle pour l'ensemble du bassin. Les carbonates étant très pauvres en éléments métalliques, les apports naturels en métaux *via* l'érosion tellurique sont donc faibles pour la Seine. En outre le site archéologique (dépôts vieux de 5000 ans) près de Bercy permet d'avoir une idée des concentrations préhistoriques. Les concentrations de fond déterminées à partir des ruisseaux forestiers sont similaires à celles relevées sur le site de Bercy et également aux concentrations de fond déterminées sur des terrains calcaires d'Amérique du Nord (Horowitz *et al.*, 1999).

---

<sup>5</sup> Les mesures dans l'eau (fraction dissoute) sont particulièrement délicates et nécessitent des protocoles de prélèvement et d'analyse ultra-propres (Cf Monbet et Coquery, 2003). C'est rarement le cas pour les études antérieures à 1980.

<sup>6</sup> Programme Interdisciplinaire de Recherche Environnementales sur la Seine : <http://www.sisyph.jussieu.fr/internet/piren/>

<sup>7</sup> Il faut toutefois noter que les couverts forestiers, compte tenu de la plus grande surface de contact offerte par le feuillage aux dépôts aériens, ne sont pas nécessairement préservés des pollutions diffuses d'origine atmosphérique (Biger, E., 1996). S'ajoutent à cela les biais introduits par l'activité forestière (déjections d'oiseaux, nids, ruches, etc.) et l'apport important en carbone organique (Azimi, S., 2000).



Meybeck *et al.*, 2003 ont estimé les concentrations naturelles dans la Seine à partir de prélèvements dans des cours d'eau situés en tête de bassin (50 lithologies homogènes). Ces prélèvements sont considérés comme relativement préservés de la pollution anthropogénique directe.

Ce sont les particules sédimentaires en suspension qui ont été analysées. L'analyse se fait après une digestion totale triacide (HF/HClO<sub>4</sub>/HNO<sub>3</sub>) à 200°C: la totalité des particules sédimentaires est donc dissoute, ce qui n'est pas représentatif de la fraction biodisponible. Les valeurs données dans le Tableau 1-6 sont ajustées pour une concentration en aluminium moyenne de 3.3 ± 0.2 % (normalisation selon la taille des particules).

Les valeurs de référence retenues antérieurement par l'agence de l'eau Seine-Normandie (AESN), également présentées dans le Tableau 1-6, sont sensiblement différentes. Elles ont été calculées pour l'ensemble du bassin Seine-Normandie par une méthode statistique utilisant la distribution des résultats par classes de concentrations. Il s'agit donc de concentrations ambiantes (pouvant intégrer des apports anthropiques) plutôt que de concentrations véritablement naturelles (Pereira-Ramos, 1989).

**Tableau 1-6 : Concentrations de référence en métaux dans les matières en suspension (MES) pour la Seine**

	MES (µg/g), Meybeck <i>et al.</i> , 2003	MES (µg/g), référence AESN, Pereira-Ramos, 1989
<b>Cd</b>	0.22 ± 0.05	0 - 1
<b>Hg</b>	0.03 ± 0.015	0 - 0.1
<b>Pb</b>	20 ± 3	37.5
<b>Ni</b>	16 ± 2	12.5

#### 1.1.5.1.2.2 Artois Picardie

Le bassin Artois-Picardie draine également majoritairement des terrains carbonatés.

Les concentrations de référence retenues par l'agence de l'eau Artois-Picardie (AEAP) sont présentées dans le Tableau 1-7. Elles sont déterminées à partir des valeurs les plus basses obtenues parmi les stations de mesures du bassin (asymptote basse de la distribution statistique des concentrations mesurées). Il s'agit là encore de concentrations ambiantes plutôt que de concentrations naturelles.

**Tableau 1-7 : Concentrations de référence en métaux dans les matières en suspension (MES) pour le bassin Artois-Picardie**

	MES (µg/g), référence AEAP
<b>Cd</b>	1.0
<b>Hg</b>	0.2
<b>Pb</b>	40
<b>Ni</b>	-

#### 1.1.5.1.2.3 Loire Bretagne

D'autres bassins ont des géochimies naturelles plus complexes. En effet, en cas de présence d'un gisement ou d'un filon métallifère, la concentration d'un métal peut être localement importante. Parce que ces sites peuvent présenter un intérêt pour l'exploitation minière, le BRGM<sup>8</sup> et la SNEA (P)<sup>9</sup> ont procédé, entre 1975 et 1993, à un inventaire des formations géochimiques en France. Des données géochimiques sont ainsi disponibles pour les principaux métaux d'intérêt métallurgique (17 éléments ; le mercure et l'uranium n'en font néanmoins pas partie). Ces données ont été recueillies dans les sédiments de ruisseaux et dans les sols en fond de vallons (voir Tableau 1-8).

<sup>8</sup> Bureau de Recherches Géologiques et Minières

<sup>9</sup> Société Nationale Elf Aquitaine (Pétroles)

Les résultats de cet inventaire minier ont été utilisés pour établir un atlas géochimique du bassin Loire-Bretagne (Leduc *et al.*, 1996). Près du tiers (235000 points de prélèvements) de la superficie du bassin Loire-Bretagne (en priorité dans les massifs cristallins, à fort potentiel métallique, et au détriment des bassins sédimentaires, qui sont *a priori* faiblement minéralisés) a été couvert dans le cadre de cette prospection.

**Tableau 1-8 : Intervalles des concentrations mesurées dans les sédiments de ruisseaux et dans les sols en fond de vallons sur le bassin Loire-Bretagne**

	Sédiments de ruisseaux, sols en fond de vallons (µg/g), données BRGM & SNEA (P)
Cd	1 - 776
Pb	6 - 953
Ni	1 - 213

Cet inventaire met en évidence une très grande hétérogénéité géochimique du bassin de la Loire et des concentrations en métaux qui peuvent être localement très importantes. 300 à 400 sites présentant des anomalies géochimiques naturelles ont été recensés, notamment lors de la présence de filons métalliques, ou encore, là où les roches d'origine éruptive prédominent.

Globalement, le plomb et le cadmium (souvent associés sous forme de sulfures dans les minerais) se rencontrent surtout aux bordures du Massif central (nord du département de la Haute Loire, aux bordures nord et nord-est du Massif central) mais aussi dans le Morvan, et dans le Massif armoricain (près de la limite nord du département de Loire-Atlantique, sur la presqu'île de Plougastel, au nord-est de Saint-Brieuc).

Le nickel se retrouve surtout dans le Massif central (coulées basaltiques du Velay, Cantal, Chaîne des Puys), dans les roches volcaniques du Tertiaire et du Quaternaire (hauts bassins de la Loire et de l'Allier), à la bordure est du Morvan, sur la rive droite du Maine, au sud-est de la zone Bretagne-Vendée.

Mais il est difficile de synthétiser les résultats de cette étude et de donner des tendances globales. Les concentrations mesurées peuvent varier fortement, et ce, à l'échelle du kilomètre. Ainsi, par exemple, des concentrations en plomb jusqu'à 953 µg/g ont été mesurées dans des roches non métamorphiques du Paléozoïque inférieur du Massif Armoricain. Pourtant la concentration médiane parmi les 22 475 prélèvements effectués dans ce type de roche n'est que de 28 µg/g. *A contrario*, la concentration médiane parmi les 1835 prélèvements effectués dans les roches du Mézoïque (Trias, Jurassique et Crétacé) est de 78 µg/g, mais la concentration maximale mesurée dans ce type de roche n'excède pas 395 µg/g.

#### 1.1.5.1.2.4 Garonne

Pour le bassin de la Garonne, des enrichissements métalliques spécifiques à certaines formations géologiques ont également été observés localement. Une étude géochimique de ce bassin a été réalisée par l'université Paul Sabatier de Toulouse (Baqué *et al.*, ). Le mercure n'y a pas été considéré.

L'étude a révélé que les concentrations en métaux mesurées dans les rivières étaient principalement induites par la pollution diffuse.

Compte tenu de la géologie du bassin, certains sites sont aussi naturellement plus riches en éléments métalliques. Des alluvions anciennes (sur différentes strates géologiques anciennes) ont été prélevées à proximité des rivières. Le Tableau 1-9 donne une idée de la variabilité des concentrations naturelles entre les différents sites. Le site de Salat se singularise ainsi par une forte concentration en cadmium et en plomb.

**Tableau 1-9 : Concentrations mesurées dans les alluvions anciennes sur le bassin Adour-Garonne.**

Concentrations dans les alluvions anciennes (µg/g)							
	Agout	Gers	Garonne à Brax	Garonne à Muret	Ariège (amont)	Salat	Garonne aval St Gaudens
<b>Cd</b>	0.7 ; 0.5	0.4	0.6 ; 0.7	0.7 ; 0.5	0.2 ; 0.2	2.1 ; 3.0	0.6 ; 0.6
<b>Pb</b>	43.6 ; 15.7	20.6	18.6 ; 30.1	30.1 ; 24.6	9.4 ; 16.2	222.2 ; 324.3	29.3 ; 25.4
<b>Ni</b>	44.9 ; 25	27.7	34.3 ; 45.9	59.3 ; 49.7	32.9 ; 44.5	52.5 ; 52.0	59.9 ; 52.4

Pour certains sites, les prélèvements ont été effectués sur deux strates géologiques (deux valeurs)

*1.1.5.1.2.5 Rhin*

Le Rhin est majoritairement alimenté par la fonte des glaciers alpins en été, alors qu'en hiver ce sont le lessivage des plaines par la pluie et les eaux de ruissellement qui apportent la plus grosse contribution aux eaux du fleuve. Une variation saisonnière de la géochimie du Rhin est ainsi observée (van der Weijden et Middelburg, 1989). Pour ces derniers cas, il est beaucoup plus difficile de choisir des sites de référence représentatifs de l'ensemble du bassin et sur l'ensemble de l'année.

Le Tableau 1-10 présente des valeurs extraites de l'étude de Zuurdeeg *et al.*, 1992. Elles ont été calculées sur la base de MES comprenant 20% de matière organique, et à partir de prélèvements réalisés dans des sédiments datant de l'époque médiévale, à proximité d'Utrecht (Pays Bas). Ces valeurs issues de mesures sur sédiments anciens intègrent les concentrations sur une longue période, ce qui permet de lisser les variations saisonnières. Elles peuvent donner une idée des concentrations naturelles attendues près de l'embouchure du Rhin, là où les particules sédimentaires sont diluées par des matières faiblement minéralisées. Mais, il faut probablement s'attendre à des concentrations naturelles plus fortes et variables en tête de bassin.

**Tableau 1-10 : Concentrations de référence (néerlandaise) en métaux dans les matières en suspension (MES) pour le Rhin**

	MES (µg/g), Zuurdeeg <i>et al.</i> , 1992
<b>Cd</b>	0.23
<b>Hg</b>	0.15
<b>Pb</b>	21
<b>Ni</b>	41

*1.1.5.1.2.6 Rhône - Méditerranée*

Il n'y a pas, à notre connaissance, d'études publiées permettant de définir des concentrations de fond pour le bassin versant du Rhône.

Signalons tout de même le programme ORME (Observatoire Régional Méditerranéen sur l'Environnement), en cours, pour lequel des études sur la géochimie du bassin versant du Golfe du Lion devraient être réalisées.

### 1.1.5.2. Modélisation géochimique

#### 1.1.5.2.1 Apports telluriques

La géochimie d'un cours d'eau, et en particulier les concentrations naturelles en métaux, s'expliquent, nous l'avons vu (Cf. point 1.1.1), en grande partie par l'érosion des roches en tête de bassin. La composition naturelle d'un fleuve est donc conditionnée par la lithologie de son bassin versant, c'est à dire par la nature géologique des terrains drainés par le fleuve. En Grande Bretagne, pour plusieurs bassins versants aboutissant à la Mer d'Irlande, Ridgway *et al.*, 2003 ont mis en évidence une très bonne corrélation entre les concentrations prédites à partir de la lithologie et les concentrations mesurées dans des cours d'eau de référence, épargnés de toute pollution.

Les proportions relatives des différents éléments traces constituent une signature géochimique caractéristique d'une lithologie. Par des analyses multifactorielles on peut étudier les relations existant entre ces signatures géochimiques et les données géologiques, géographiques, etc. et identifier des traceurs caractéristiques (Selinus et Esbensen, 1995 ; Rantisch, 2000).

Il est ainsi possible de prédire les apports naturels d'origine tellurique (Ridgway *et al.*, 2003) :

- d'une part en déterminant les signatures géochimiques pour chaque lithologie d'un bassin,
- et d'autre part en tenant compte des proportions des différents types de lithologies rencontrées sur un bassin (pour pondérer leur contribution à la géochimie générale du cours d'eau).

Les signatures géochimiques peuvent être suivies et comparées en différents points du bassin et au cours du temps. Les excès éventuellement observés entre les concentrations prédites et les concentrations effectivement mesurées peuvent être attribués à une influence anthropique.

En pratique, il est difficile de recenser toutes les lithologies susceptibles d'être rencontrées sur un bassin. De larges variations spatiales sont en effet couramment observées.

#### 1.1.5.2.2 Autres apports

Les traceurs chimiques ou isotopiques permettent d'identifier plus particulièrement la contribution de certaines sources. Certains éléments ou isotopes sont en effet caractéristiques d'une région géologique (Négreil *et al.*, 2003).

Il est également possible de prendre en compte les apports atmosphériques en analysant les eaux de pluies en différents points du bassin versant. La proportion d'éléments provenant des aérosols marins peut être évaluée en utilisant les chlorures comme traceur (en faisant l'hypothèse que les chlorures sont exclusivement d'origine marine). On considère que les éléments qui ne concordent pas avec les concentrations dans l'eau de mer sont d'origine anthropique (Markich et Brown, 1998). Par ailleurs, le  $^7\text{Be}$  peut être utilisé comme traceur de la fraction d'eau apportée par ruissellement direct. Le  $^7\text{Be}$  est en effet un élément radioactif naturel produit dans l'atmosphère et entraîné par les eaux de pluies. Les apports de  $^7\text{Be}$  dans les eaux de surface sont donc fonction de l'intensité et de la fréquence des pluies (Tessier *et al.*, 2002).

## 1.2. Evolution des organismes en présence des métaux

### 1.2.1. Le caractère essentiel de certains métaux

Les organismes vivants ont évolué en présence des éléments métalliques. Certains métaux sont même essentiels aux processus biologiques. Les éléments métalliques ont la propriété de se fixer sur des protéines et ainsi de modifier la structure moléculaire et le mode d'action de ces dernières. Ces modifications de structure peuvent être essentielles à la bonne fonctionnalité de certaines protéines (enzymes, pigments respiratoires), ou au contraire induire un effet toxique en les inactivant. Les organismes sont capables, dans une certaine mesure, d'utiliser et de réguler les concentrations en métaux qui leur sont essentiels (Cf. partie 1.2.2). Des effets toxiques apparaissent lorsque cette régulation ne peut plus avoir lieu.

Il est important de différencier les métaux qui sont essentiels à la vie de ceux qui ne le sont pas ou dont on ne connaît pas de propriété vitale pour au moins une catégorie d'organismes. En effet, le caractère essentiel d'un métal dépend aussi des organismes : un métal donné pouvant être essentiel à un organisme tout en ne l'étant pas pour d'autres. Le Tableau 1-11 propose une liste des métaux présentant un intérêt pour les organismes vivants.

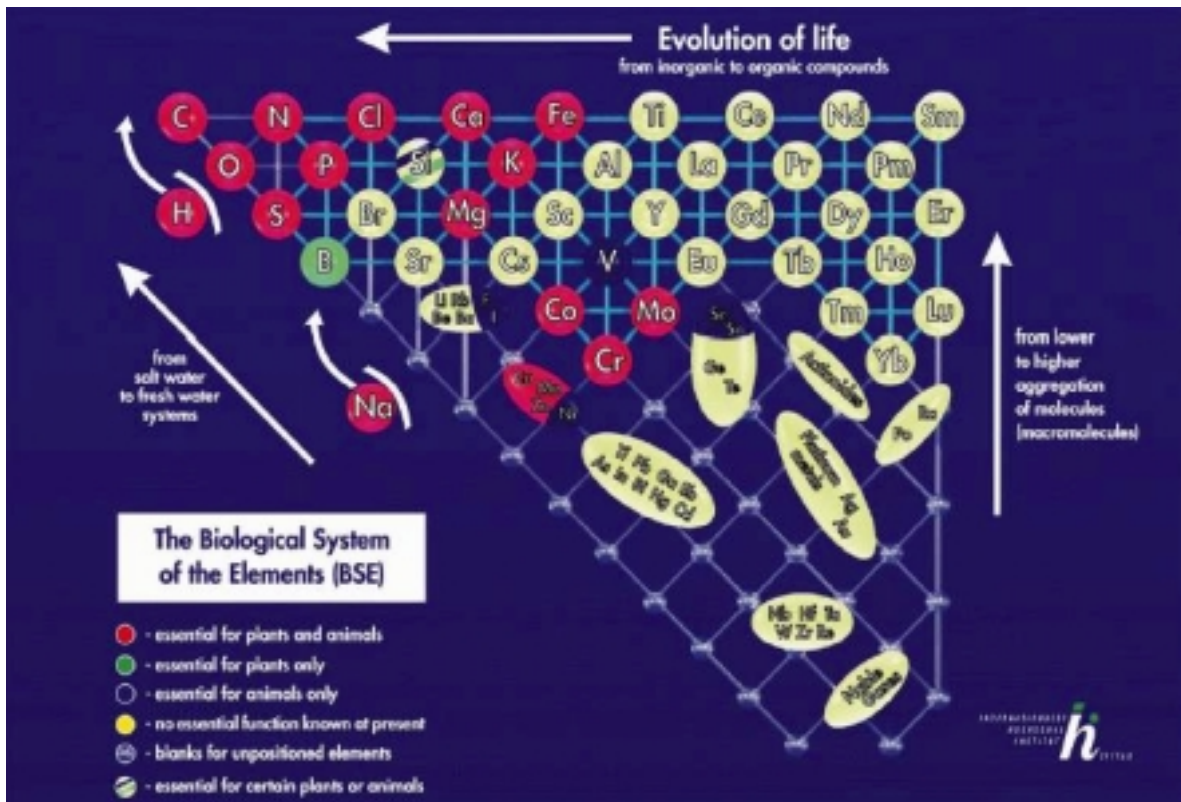
**Tableau 1-11 : Liste (non exhaustive) des éléments essentiels et non essentiels et exemples de propriétés des éléments connus pour leur essentialité**

Métal	Propriétés connues
Chrome (Cr)	Impliqué dans le métabolisme du glucose (insuline)
Cobalt (Co)	Présent dans la vitamine B12 intervenant dans la formation de l'hémoglobine
Cuivre (Cu)	Présent dans les cytochromes et l'hémocyanine, des molécules impliquées dans la respiration cellulaire
Fer (Fe)	Présent dans l'hémoglobine pour le transport de l'oxygène
Iode (I)	Présent dans la thyroxine et lié aux composants assurant le bon fonctionnement du système thyroïdien
Manganèse (Mn)	Rôle dans le métabolisme des sucres (pyruvate carboxylase) Impliqué dans la synthèse des acides gras et des glycoprotéines
Molybdène (Mo)	Impliqué dans les transferts d'électrons La fixation de l'azote est aussi couplée à une réaction au molybdène
Nickel (Ni)	Composant de l'uréase et fait donc partie du cycle du CO <sub>2</sub>
Sélénium (Se)	Active la glutathion peroxydase pour l'élimination des radicaux libres
Vanadium (V)	Régulation des messages intracellulaires Cofacteur d'enzymes impliquées dans le métabolisme énergétique Agent thérapeutique possible pour les diabètes
Zinc (Zn)	Nécessaire au fonctionnement des déshydrogénases, aldolases, isomérases, transphosphorylases, ARN et ADN polymérase, anhydrase carbonique, Cu-Zn superoxyde dismutase (et autres)

**Métaux non essentiels** : Antimoine (Sb) ; Argent (Ag) ; Arsenic (As) ; Cadmium (Cd) ; Etain (Sn) ; Mercure (Hg) ; Plomb (Pb) ; Thallium (Tl)

Les éléments présentés dans le Tableau 1-11 ont été ajoutés à la liste des éléments essentiels au fur et à mesure de la découverte de leur implication au cœur de processus biologique, c'est à dire de manière expérimentale. Une approche empirique a également été mise au point pour prédire le caractère d'essentialité d'un élément. Ce système a été réalisé suivant une démarche similaire à celle adoptée en son temps par les chimistes Mendeleev et Meyer (1869) lors de l'invention de leur classement périodique des éléments, basé sur un certain ordre dans l'évolution de leurs propriétés caractéristiques. Les propriétés d'un métal sont conditionnées en particulier par sa charge ionique, son électronégativité (qui influe sur l'association avec d'autres éléments), son rayon atomique (encombrement stérique). Les mêmes variations que l'on observe pour ces caractéristiques physiques et chimiques influent aussi sur les propriétés biologiques, la forme chimique et les fonctions possibles des éléments. Après plusieurs essais de classification biologique des éléments

pour les ions métalliques (Nieober et Richardson, 1980) un système biologique des éléments a été mis au point : *Biological System of the Elements* ou BSE (Markert, 1994). De cette première vraie tentative de systématisation des éléments selon leurs fonctions biologiques résulte le diagramme suivant (Figure 1-2).



**Figure 1-2 : Classement biologique des éléments chimiques (*Biological System of the Elements*, extrait de Markert, 1994)**

Les données ayant servies à la réalisation de cette première version du BSE sont variées. Elles proviennent pour la plupart de l'observation :

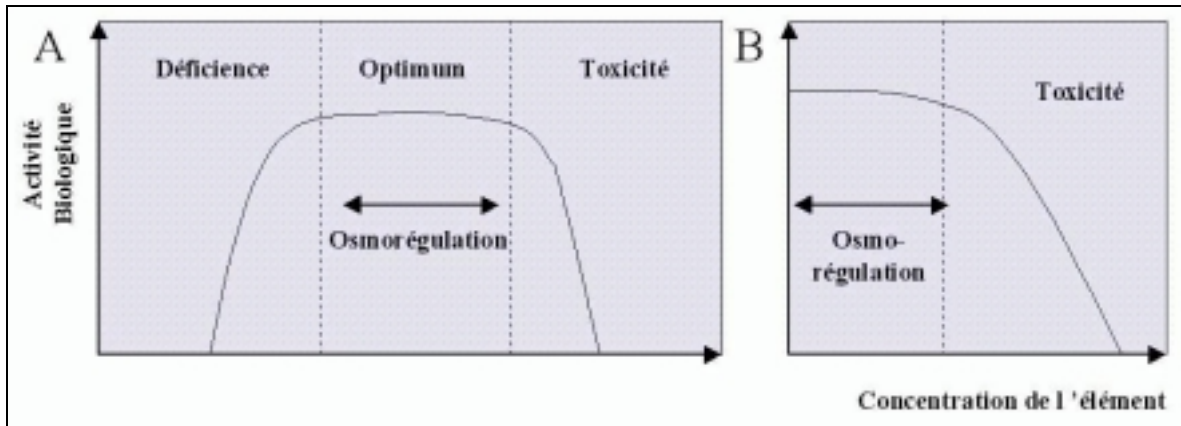
- des caractéristiques chimiques des éléments,
- des fonctions physiologiques de certains éléments
- de la manière dont les éléments et leurs composés sont incorporés aux matrices vivantes.

Les différentes configurations dans le BSE permettent de supposer, *a priori*, l'essentialité de certains éléments tels que le brome (Br), le strontium (Sr), le césium (Cs), le germanium (Ge) ou le tellure (Te). Ceux-ci seront sans doute reconnus comme essentiels dans le futur, au moins pour certains groupes d'organismes. De la même manière, la non essentialité d'autres éléments peut également être soupçonnée. C'est le cas du thallium (Tl), du plomb (Pb), du mercure (Hg) et du cadmium (Cd), qui n'ont révélé que des effets toxiques sur les espèces vivantes.

Les métaux essentiels peuvent aussi être désignés sous l'appellation d'oligo-éléments. Les oligo-éléments répondent aux critères fixés par Cotzias, 1967 :

- Etre présents dans les tissus vivants à une concentration relativement constante,
- Provoquer, par leur absence de l'organisme, des anomalies structurales et physiologiques voisines chez plusieurs espèces,
- Prévenir ou guérir ces troubles par l'apport de ce seul élément.

Comme tout composé chimique, l'effet de l'apport d'un métal dépend de la dose. Mais lorsque le métal est essentiel, aussi bien sa carence que son excès sont dommageables.



**Figure 1-3 : Evolution de l'activité biologique en fonction des concentrations en métaux essentiels (A) et non essentiels (B)**

La Figure 1-3 illustre la régulation homéostatique qui entre en jeu chez les organismes vivants à la fois pour les métaux essentiels (A) et non essentiels (B). Pour ces deux groupes, des effets néfastes sur l'activité biologique apparaissent lorsque ce processus de régulation sature. Pour les métaux essentiels, ces effets néfastes interviennent à la fois en présence de trop faibles ou de trop fortes concentrations dans l'environnement alors que, dans le cas des métaux non-essentiels, seules des concentrations environnementales excessives conduisent à l'apparition d'effets.

## 1.2.2. Acclimatation, adaptation, sélection

### 1.2.2.1. Acclimatation

Les organismes sont, dans une certaine mesure, capables de développer une acclimatation physiologique pour faire face à une exposition continue aux métaux.

Des protéines appelées métallothionéines ont la propriété de chélater et de complexer les métaux. La synthèse de ces protéines est induite par une augmentation de l'exposition aux métaux. Ces protéines assurent ainsi la régulation des concentrations intracellulaires de différents éléments métalliques essentiels ou non (Hamilton et Mehrle, 1986). Les métallothionéines sont d'ailleurs utilisées comme biomarqueurs, indices précoces d'une pollution aux métaux lourds.

Les métaux peuvent aussi être séquestrés au sein de granules ou vésicules (Depledge et Rainbow, 1990).

Il faut noter que, si les métaux ainsi séquestrés n'induisent plus d'effet toxique pour l'organisme (ne sont plus biodisponibles), ils ne sont pas pour autant nécessairement excrétés, et peuvent s'accumuler dans les tissus (McGeer *et al.*, 2003). Ils peuvent ainsi représenter un danger pour les prédateurs.

### 1.2.2.2. Sélection et adaptation.

Les mécanismes physiologiques de détoxification décrits précédemment sont néanmoins saturables. Lorsque l'exposition aux métaux est excessive, des effets délétères apparaissent.

Les espèces sont plus ou moins tolérantes aux variations de leur environnement. Certaines espèces, dites sténoèces, sont sensibles à de faibles variations des conditions environnementales. Au contraire, les espèces dites euryèces tolèrent des variations importantes. Les espèces sténoèces sont le plus souvent des espèces très bien adaptées à leur environnement, « optimisées » pour vivre dans une niche écologique particulière. Au contraire les espèces euryèces sont le plus souvent des espèces opportunistes et invasives avec une stratégie de colonisation rapide. Toutes modifications (augmentation ou diminution) des concentrations en métaux dans le milieu sont ainsi susceptibles

de porter atteinte à la biodiversité des milieux. C'est sur ce principe que sont fondés les bioindicateurs écologiques : l'inventaire et les mesures d'abondance des organismes aquatiques indicateurs de pollution présents dans le milieu permet de diagnostiquer le niveau de contamination de ce milieu (Vindimian et Garric, 1993).

Pour une même espèce, des différences interindividuelles sont également observées. Les individus les plus sensibles sont d'abord affectés alors que les plus résistants (c'est à dire ceux qui sont capables de survivre et de se reproduire) sont sélectionnés. En accord avec le paradigme darwinien, cette différence de sensibilité n'est pas induite pas le stress toxique (à l'exception possible des composés mutagènes) mais est préexistante. Elle est héréditaire et s'explique par les différences de génotype des individus (Cf. expérience classique de Luria et Delbrück, 1943). Les génotypes résistants sont favorisés et finissent par devenir majoritaires au sein de la population. Sur le long terme, la population peut ainsi s'adapter progressivement en réaction à la pression sélective. Toutefois, la diversité génétique de la population soumise à une pression sélective trop forte est appauvrie. Les populations avec une faible diversité génétique sont vulnérables et moins souples face à un nouveau stress : tous les individus de la population réagiront d'une façon similaire.

### 1.2.2.3. Implications

Il semble que les organismes vivant dans des régions avec une concentration de fond élevée en un métal y sont généralement comparativement moins sensibles que les organismes qui vivent au sein de milieux pauvres en éléments métalliques (pour une revue bibliographique voir Klerks et Weis, 1987 ; voir aussi articles récents tels que McLaughlin et Smolders, 2001 ; Barata *et al.*, 2002). Toutefois, ce n'est pas systématiquement le cas. Par ailleurs il est possible que les résultats publiés ne soient pas représentatifs de la situation réelle : les résultats négatifs sont jugés moins intéressants sur le plan scientifique et ne sont pas nécessairement publiés (Klerks et Weis, 1987).

Il faut aussi rappeler que la pression induite par la pollution anthropogénique s'opère sur une échelle de temps beaucoup plus courte que celle nécessaire aux populations pour s'adapter (au moins en ce qui concerne les macro-organismes). D'autre part, nous avons vu que les populations spécifiquement adaptées à une contrainte donnée sont souvent plus vulnérables face aux variations de leur environnement, par exemple lors de pollutions multiples (Klerks et Moreau, 2001).

Il convient donc de ne pas surestimer les capacités d'adaptation des espèces.

#### ∇ Quelques éléments à retenir

- Les éléments métalliques sont des constituants naturels de l'écorce terrestre qui peuvent se disséminer naturellement dans le milieu aquatique. Certains écosystèmes peuvent donc être naturellement très riches en éléments métalliques et abriter des communautés d'espèces qui y sont adaptées. Sous l'effet de la pression des activités anthropiques (activités industrielles, agricoles), la contamination métallique des milieux aquatiques peut augmenter significativement. Au-delà d'une certaine concentration (parfois très faible) dans le milieu, les métaux ont des effets néfastes.
- Les concentrations naturelles varient en fonction de la nature géologique du milieu. Il est ainsi difficile, pour les écosystèmes affectés par la présence de métaux, d'estimer la part de métal d'origine naturelle.
- Certains métaux présentent la particularité d'être, pour les organismes vivants, à la fois essentiels mais aussi toxiques au-dessus d'une certaine concentration. Les seuils d'essentialité et de toxicité peuvent être très variables suivant les espèces.
- Les organismes vivants sont adaptés aux concentrations naturelles en métaux présentes dans leur environnement. La sensibilité des différentes espèces peut ainsi être très variable entre les régions. De même, les organismes sauvages peuvent avoir des sensibilités très différentes de ceux testés en laboratoire.



## 2. Comportement des métaux et biodisponibilité

Dans les milieux aqueux, les métaux sont présents sous différentes formes chimiques. Les éléments et composés chimiques inorganiques (anions majeurs tels que les carbonates, chlorures et hydroxydes) et organiques (e. g. composés formant la matière organique dissoute) présents dans ces milieux constituent des ligands capables de complexer les ions métalliques. C'est ce que l'on appelle **complexation inorganique** dans le premier cas (voir point 2.1) et **complexation organique** dans le second (voir point 2.2). La Figure 2-1 illustre les interactions entre un ion métallique libre ( $M^{2+}$ ) et les ligands avec lesquels des complexes peuvent se former.

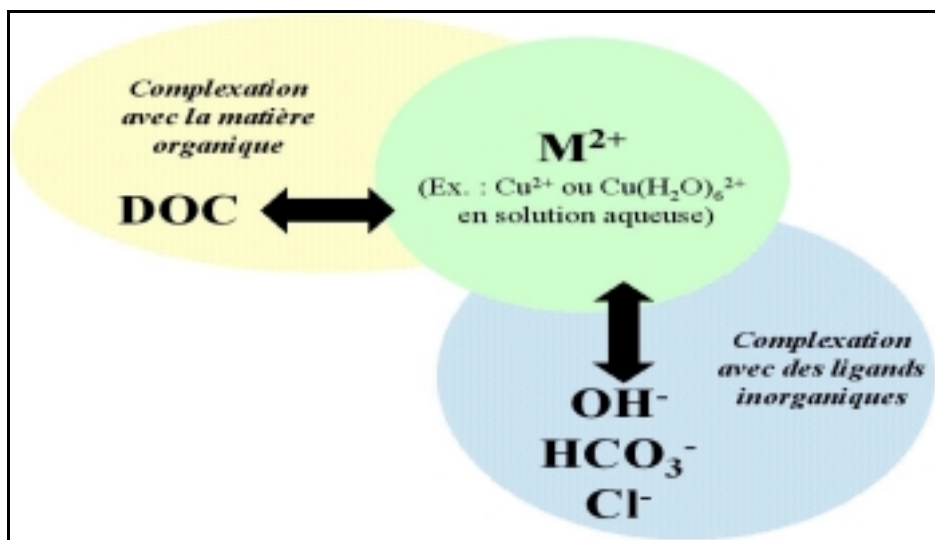


Figure 2-1 : Phénomènes de complexation des métaux dans l'eau

L'interaction entre les organismes vivants et le métal dépend entre autres de la forme sous laquelle ce dernier se trouve dans le milieu. Par analogie, on appelle également **complexation avec le ligand biotique** la fixation du métal par les organismes (voir point 2.3).

Les phénomènes de complexation faisant intervenir les métaux sont gouvernés par un ensemble de paramètres physico-chimiques. Ceux-ci modifient la spéciation des métaux, c'est à dire qu'ils influent sur la répartition des différentes formes chimiques métalliques, mais agissent également sur l'assimilation par les organismes vivants. Parmi ces paramètres, on peut citer le pH, le potentiel d'oxydoréduction et bien sûr la quantité de ligands disponible (aussi appelée capacité complexante).

C'est ainsi que, dans la plupart des cas, les concentrations métalliques totales (voir définitions dans l'encadré ci-dessous) sont connues pour être de mauvais indicateurs d'effets sur les organismes du compartiment aquatique (Meyer, 2002). Pour quelques métaux (e. g. Ag, Cd, Cu, Ni, Pb, Zn), les concentrations en ions métalliques libres ainsi que celles de certains complexes sont, semble-t-il, principalement responsables de la toxicité (Campbell, 1995).

∇ **Quelques définitions** : termes fréquemment utilisés pour qualifier la fraction des métaux mesurée dans l'eau

- Métal total : quantité totale de métal, sous toutes ses formes. Le métal total englobe à la fois les quantités fixées sur les particules (métal particulaire) et celles dissoutes dans le milieu (métal dissous).
- Métal particulaire : quantité de métal fixée sur des particules retenues par un filtre de 0,45 µm.
- Métal dissous : quantité de métal en solution qui n'est pas retenue par un filtre de 0,45 µm.
- Métal « libre » : espèce métallique la plus simple, sous sa forme ionisée (ex :  $Cu^{2+}$ ), accompagnée, en solution aqueuse, de sa sphère d'hydratation (ex :  $Cu(H_2O)_6^{2+}$ ). Les espèces « libres » appartiennent à la fraction métallique dissoute.

Pour que les métaux présents dans les différents compartiments de l'environnement aquatique exercent un effet sur les organismes, ils doivent être sous une forme chimique ayant la capacité d'atteindre les cibles biologiques. En d'autres termes, il est nécessaire qu'ils soient **biodisponibles**. Certains auteurs considèrent qu'un métal est biodisponible s'il est assimilable par les organismes, pour d'autres il faut en plus qu'il soit susceptible d'induire un effet :

- Selon Newman et Jagoe, 1994, la biodisponibilité est définie comme la possibilité qu'un contaminant soit assimilé et/ou adsorbé sur un organisme vivant.
- Selon Campbell, 1995, un métal est considéré comme biodisponible quand il est assimilé par un organisme et peut entraîner un effet sur celui-ci.

Les effets biologiques associés aux métaux (M) ont souvent été reliés à la concentration de l'ion métallique libre ( $M^{n+}$ ) mais aussi à celles de certaines formes complexées à des ligands inorganiques (Campbell, 1995) et organiques. Les modèles mis au point pour évaluer la toxicité des métaux dans des conditions physico-chimiques spécifiques (*Biotic Ligand Models*) sont d'ailleurs basés sur ce type de relations. Des méthodes d'analyse de ces différentes formes chimiques<sup>10</sup>, c'est à dire d'évaluation des concentrations en ions libres et en complexes inorganiques et organiques, sont donc nécessaires à une bonne interprétation des effets des métaux sur les organismes vivants.

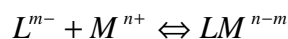
## 2.1. Formation de complexes inorganiques

### 2.1.1. Rappels sur les complexes inorganiques

Les métaux, en solution aqueuse, subissent un phénomène de solvatation. Ils fixent autour de leurs atomes, plus ou moins fortement, des molécules d'eau. Certains de ces composés ainsi formés peuvent être stables : les liens entre l'ion et les molécules d'eau sont alors de véritables liaisons chimiques. C'est par exemple le cas de l'hydrate de cuivre  $[Cu(H_2O)_4]^{2+}$ . Ces hydrates sont des exemples d'ions complexes : l'association d'un cation métallique, au centre, et d'un certain nombre d'espèces moléculaires ou ioniques (les ligands). Les métaux de transition (e. g. Cu, Zn, Ni, Cr, Au, Ag, Cd, Hg) sont particulièrement susceptibles de former des complexes avec des ligands variés (Arnaud, 1997).

Un bref rappel sur la formation d'un complexe inorganique à partir des métaux est présenté dans l'encadré ci-dessous.

▼ La formation d'un complexe entre un ligand (L) et un cation  $M^{n+}$  peut être décrite par l'équation suivante :



La constante de stabilité correspondante est définie selon l'équation :

$$K = \frac{[LM^{n+}]}{[L^{m-}][M^{n-m}]}$$

Parmi les ligands possibles pour les métaux, on trouve les anions suivants : chlorure ( $Cl^-$ ), bromure ( $Br^-$ ), cyanure ( $CN^-$ ), nitrite ( $NO_2^-$ ), carbonate ( $CO_3^{2-}$ ), hydroxyde ( $OH^-$ ) etc.

<sup>10</sup> A ce sujet, se reporter au rapport technique établissant une revue des méthodes analytiques de spéciation chimique (Monbet and Coquery, 2003).

### 2.1.2. Modèles de spéciation inorganique

Les modèles de spéciation permettent de calculer les parts relatives des différentes formes chimiques présentes dans différentes phases (dissoute, adsorbée, solide ou gazeuse). Les calculs sont réalisés pour des systèmes aqueux naturels ou reconstitués en laboratoire, sous l'hypothèse qu'ils soient à l'équilibre. Les données indispensables à la modélisation se composent en général des concentrations totales dissoutes des différentes espèces (métaux étudiés, ions majeurs) ainsi que d'autres données caractérisant le milieu d'étude comme le pH, le pe (potentiel rédox) ou encore la présence de composés solides pouvant se solubiliser avant qu'un équilibre ne soit atteint.

De nombreux exemples de ces modèles sont disponibles dans la littérature et plusieurs programmes informatiques sont mis à la disposition des utilisateurs. Parmi les modèles les plus couramment utilisés, on peut citer MINEQL+ (Schecher et McAvoy, 1998), MINTEQA2 (Allison *et al.*, 1991 ; HydroGeoLogic, 1998) ou encore PHREEQC version 2.8 (Parkhurst et Appelo, 1999).

∇ Ce type de programmes de calcul fait partie du « package informatique<sup>11</sup> » des « *Biotic Ligand Model* ». Ils sont chargés de calculer la répartition des différentes formes chimiques d'un métal, dans un système donné. Cette répartition est ensuite reprise pour servir de donnée d'entrée aux autres modules de calcul.

## 2.2. Complexation avec la matière organique

La place importante accordée, dans ce rapport, aux phénomènes de complexation des métaux avec la matière organique est proportionnelle à l'influence que ces phénomènes ont sur la biodisponibilité des métaux. Il est donc important de définir la matière organique, de présenter les moyens de la quantifier et de la qualifier avant de s'intéresser à la manière dont elle est prise en compte dans le développement de modèles type « BLM ».

### ∇ Quelques sigles

- **COD** : carbone organique dissous. La mesure du COD permet de quantifier la matière organique dissoute.
- **COP** : carbone organique particulaire. La mesure du COP permet de quantifier la matière organique en suspension.
- **COT** : carbone organique total, somme des fractions particulaire et dissoute. Cette mesure permet de quantifier la totalité de la matière organique.
- **MO** : matière organique, terme générique.
- **MOD** : matière organique dissoute.

### 2.2.1. Généralités sur la matière organique dissoute

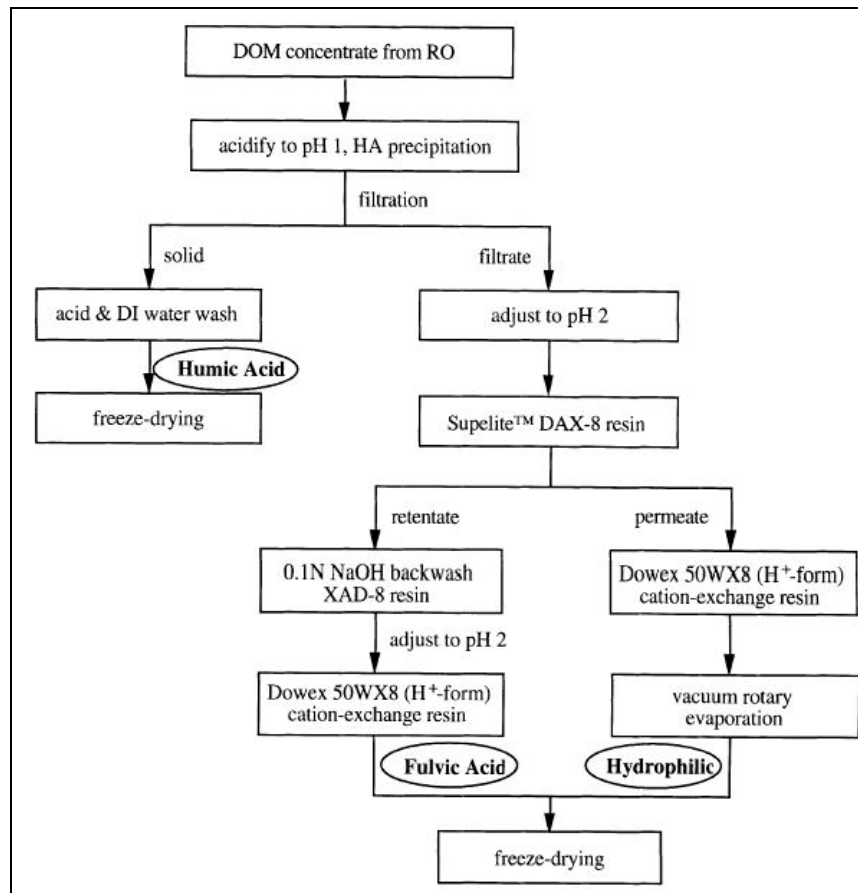
Les matières organiques dissoutes (MOD) sont souvent responsables de la couleur, du goût ou de l'odeur de l'eau. Mais elles interviennent aussi au sein de différents processus biogéochimiques en tant que source de carbone et d'énergie pour les organismes vivants. Elles agissent également sur les niveaux d'oxygène dissous, d'azote, de phosphore, de sulfures, de métaux traces ou encore d'acidité.

La matière organique dissoute possède souvent des caractéristiques similaires à l'humus du sol. De ce fait on estime, pour simplifier, qu'environ 50% de la MOD d'une rivière type est constituée de substances humiques. Ce sont des composés macromoléculaires complexes produits par la dégradation biologique et chimique des résidus de plantes et d'animaux. En fonction du milieu aquatique étudié, ces substances se composent de polysaccharides, d'acides organiques hydrophiles, d'acides gras aliphatiques, de protéines et de lignine en différentes proportions. Les substances humiques représentent entre un tiers et la moitié du carbone organique dissous (COD) dans les eaux, en milieu naturel (Ma *et al.*, 2001).

---

<sup>11</sup> Comprenant également les programmes de complexation avec la matière organique et ceux spécifiquement dédiés aux interactions entre le métal et les organismes vivants (voir points 2.2 et 2.3).

Les substances humiques peuvent être fractionnées en plusieurs sous ensembles : les acides humiques (AH), les acides fulviques (AF) et les composés hydrophiles (Hy) (voir Figure 2-2).



**Figure 2-2 : Méthodologie de fractionnement de la matière organique dissoute issue d'eaux du milieu naturel (d'après Ma *et al.*, 2001)**

Les concentrations en matières organiques dissoutes, leurs compositions ainsi que leurs caractéristiques chimiques sont extrêmement variables et dépendent principalement des sources de matières organiques (source allogène - d'origine pédologique - ou autogène - produits par les macrophytes, les algues ou les bactéries, etc.), de la température, de la force ionique, du pH, de la composition de l'eau en cations majeurs, de la qualité des couches superficielles des sédiments ou encore de l'activité photolytique et microbiologique.

La MOD, dont les différents composants présentent une masse molaire comprise entre quelques centaines et 100 000 Da<sup>12</sup>, est un mélange complexe de composés organiques aromatiques et aliphatiques accueillant des groupements amide, carboxylique, hydroxyle, cétone, etc.

<sup>12</sup> Le dalton est une unité de masse définie de la façon suivante : le dalton est la douzième partie de la masse d'un atome de <sup>12</sup>C. De cette définition découle que la masse molaire du <sup>12</sup>C est 12 uma (unité de masse atomique) ou 12 g.mol<sup>-1</sup>. Soit 1 Da = 1 g.mol<sup>-1</sup>.

## 2.2.2. Réactions de complexation avec les métaux

La matière organique (MO) est connue pour jouer un rôle important dans la chimie des polluants puisqu'elle a la capacité de former des complexes avec les métaux. Les métaux peuvent être complexés par les substances composant la MO et plus particulièrement par les sites carboxyliques (groupements contribuant à la majorité des sites de complexation), azotés et sulfurés qui s'y trouvent. La capacité totale de fixation des ions métalliques par la MO dans les eaux a été estimée entre 200 et 600  $\mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}$ .

Même si certains métaux sont connus pour se fixer préférentiellement sur certains sites (cas du cuivre avec les groupes carboxyles ou bien le mercure pour les groupements sulfurés), la plupart des éléments entrent en compétition pour l'accès aux sites de complexation de la MO. Une séquence de stabilité des complexes a été établie, pour les sols, par Irving-Williams (1948), cité dans Förstner et Wittman, 1983. L'ordre de stabilité décroissant est le suivant :  $\text{Pb} > \text{Cu} > \text{Ni} > \text{Co} > \text{Zn} > \text{Cd} > \text{Fe} > \text{Mn} > \text{Mg}$ . Certaines études ont par ailleurs montré que les fortes concentrations en certains métaux (Al et Fe) empêchaient en partie des métaux moins présents de se fixer à la matière organique (Takacs *et al.*, 1999).

▼ Pour mieux appréhender les mécanismes de la complexation des métaux par la matière organique, il est nécessaire, d'une part, de pouvoir la caractériser et la quantifier et, d'autre part, de connaître précisément la nature des ligands (sites carboxyliques, protéines, etc.) impliqués dans ce type de réactions.

Des outils analytiques ont été développés de manière à définir qualitativement et quantitativement la MO. La partie 2.2.3 en donne un aperçu.

## 2.2.3. Analyse et méthodes de mesure

Il existe deux principales techniques de caractérisation de la MOD selon que l'on s'intéresse aux concentrations présentes dans l'eau (caractérisation globale - séparation dissous / particulaire) ou bien aux différentes fractions qui la compose (caractérisation qualitative).

### 2.2.3.1. *Mesure des concentrations en matière organique*

La mesure du carbone organique total (COT) permet de prendre en compte et de quantifier la totalité de la MO d'un système aquatique analysé, la MO étant constituée en grande partie d'atomes de carbone. Il est admis que cette mesure reflète la concentration en matières organiques (MO), pour les milieux naturels. En effet, les contaminants organiques dans les systèmes naturels représentent normalement une faible fraction du COT.

Cette mesure du COT peut ensuite être subdivisée en différentes fractions selon les objectifs des études. Les mesures du carbone organique dissous (COD) et de sa fraction associée, le carbone organique particulaire (COP), permettent d'accéder à des informations plus opérationnelles dans certains cas, i.e. l'utilisation de la concentration en COD pour évaluer les phénomènes de complexation des métaux avec la MOD. La fraction de COP représente en général moins de 10% du COT mais cette proportion augmente avec la taille et le débit d'une rivière par exemple (et donc avec la concentration en matières en suspension dans l'eau). Les concentrations en COD varient entre 0,1 mg/L dans les eaux souterraines et 50 mg/L dans les marais. Ces concentrations ne dépendent pas uniquement de la nature des bassins versants mais sont également sujettes aux variations saisonnières et aux apports de MO lors de blooms algaux<sup>13</sup> par exemple.

---

<sup>13</sup> Prolifération d'algues, par exemple lors d'une eutrophisation (processus naturel d'enrichissement en éléments minéraux nutritifs des eaux d'un écosystème).

2.2.3.2. *Caractérisation qualitative de la matière organique dissoute par fractionnement*

La MOD est constituée d'un ensemble varié de composés chimiques. Ceux-ci présentent des affinités différentes pour les métaux avec lesquels ils peuvent former des complexes. C'est pourquoi il est également important de procéder à une analyse qualitative de la MOD. Les différentes méthodes et techniques employées pour y parvenir sont présentées dans cette partie.

**Fractionnement par résines adsorbantes :** la MOD est couramment caractérisée par son fractionnement en différents sous-ensembles au moyen de résines adsorbantes. L'utilisation de résines XAD-8 par exemple, est fréquente pour l'isolement des substances humiques (acides fulviques et humiques). Cette étape est la base de la détermination d'un rapport caractéristique de la MO : la distribution des fractions humique / non-humique. Une autre technique de fractionnement à base de résines est aussi utilisée. Celle-ci met en œuvre deux colonnes contenant des résines, disposées en série. Ce système permet de séparer la MOD en différentes catégories : hydrophobe, hydrophile, acide, basique et neutre. Un fractionnement supplémentaire de la partie hydrophile, à l'aide d'une troisième résine, permet de différencier la fraction chargée de la fraction neutre.

Le schéma suivant (Figure 2-3) présente les différents niveaux de caractérisation de la MOD.

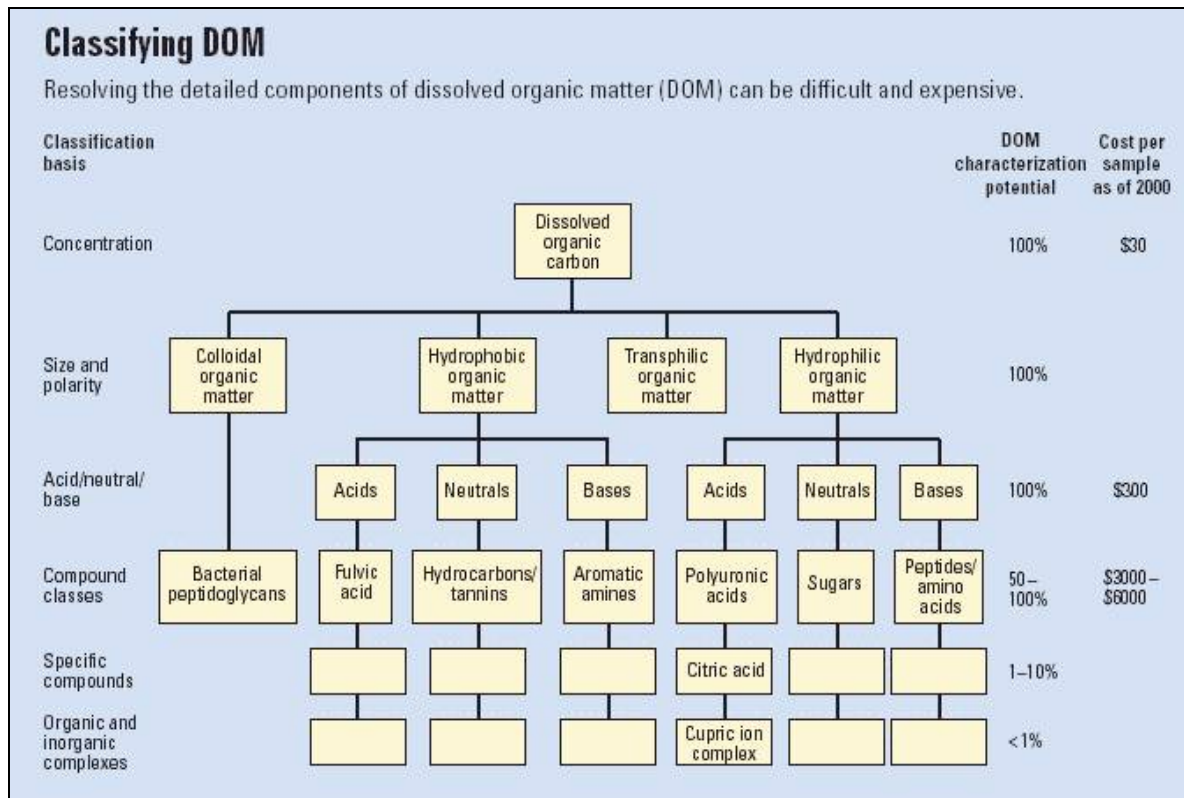


Figure 2-3 : Classification de la matière organique dissoute (d'après Leenheer et Croué, 2003)

**Analyses spectrophotométriques :** des mesures spectrophotométriques, telles que l'absorbance ultraviolet (UV) ou encore la fluorescence, viennent compléter la caractérisation de la MOD. L'absorption dans les domaines du visible et de l'ultraviolet des eaux de surface est principalement imputable aux groupements aromatiques chromophores présents sur les molécules (acides humiques pour la plupart) composant la matière organique dissoute. Les molécules d'acides humiques sont aussi connues pour être responsables de la fluorescence des eaux naturelles. Du fait d'un grand nombre de groupes chromophores et de l'impossibilité de détecter des réponses spécifiques permettant de les caractériser, la plupart des recherches menées en milieu aquatique se sont limitées à des mesures de l'absorbance à 254 nm ; cette mesure servant d'indicateur de la concentration en MO. Un autre indicateur, l'absorbance UV spécifique (SUVA ou SUVA<sub>254</sub> : *Specific UV Absorbance*) se définit comme le rapport de l'absorbance de l'échantillon à 254 nm et de la concentration en COD. Des eaux ayant un fort SUVA sont généralement riches en substances

hydrophobes telles que les acides humiques (composés aromatiques). Il faut cependant noter que de faibles concentrations en COD associées à de fortes concentrations en nitrates peuvent fausser ce type de mesure. Enfin, même si seulement moins de 1% des groupes aromatiques inclus dans la MO sont fluorophores, les techniques d'analyse spectroscopique de la fluorescence en trois dimensions constituent un outil intéressant dans la mesure où elles sont environ un ordre de grandeur plus sensibles que les techniques d'absorption UV.

Néanmoins, l'utilisation de la méthode par absorption UV à 254 nm n'est pas recommandée pour l'estimation de la distribution des masses molaires des différents constituants de la MO. En effet, cette technique ne permet la détection que d'un nombre limité de composés (chromophores) comme on l'a vu ci-dessus ; de plus l'absorbance n'est pas homogène d'un composé détecté à l'autre ce qui conduit en fin de compte à la surestimation des substances humiques par rapport aux autres composants de la MO. C'est pourquoi ce type de méthode ne convient pas à des analyses quantitatives des masses molaires et ne devrait être utilisé que pour certaines mesures qualitatives (Her *et al.*, 2002). La mesure de la concentration en COD associée à une technique de séparation donne de meilleurs résultats quantitatifs.

**Fractionnement de la MO par taille :** les méthodes de caractérisation de la MO par taille dépendent fortement de son état d'agrégation et de ses interactions avec les milieux utilisés pour la séparation. L'ultrafiltration séquentielle est utilisée pour des séparations basse résolution alors que la chromatographie d'exclusion (par taille) est employée pour des caractérisations haute résolution. Une multitude de techniques d'ultrafiltration sur membranes ont été utilisées pour la caractérisation de la MOD en tenant compte du fait que les distributions de poids moléculaires apparentes étaient influencées par un grand nombre de paramètres tels que le pH, la force ionique, le type de membrane, la pression ou encore les standards de calibration. Une étude récente (Schäfer *et al.*, 2002) a montré qu'aucune des deux techniques précédentes ne donnaient des mesures absolues des masses molaires de la MO.

D'autres techniques telles que la pyrolyse suivie d'une séparation par chromatographie phase gazeuse (GC) couplée à un spectromètre de masse (MS) permettent de descendre à des niveaux encore plus précis dans la caractérisation de la MOD. Cette technique est dédiée à la détection des biopolymères présents dans la MO : polysaccharides, acides aminés, protéines, polyphénols, lignine, etc.

▼ Il existe différentes approches pour déterminer la composition de la MOD. Ces approches sont de plus en plus complexes et coûteuses à mettre en œuvre au fur et à mesure que l'analyse se fait précise. De plus, les fractions de MO identifiées dépendent de la méthode analytique employée.

#### 2.2.4. Modélisation de la complexation des métaux avec la matière organique

Différents problèmes se posent lorsqu'il s'agit d'appliquer les connaissances dont on dispose sur la complexation des métaux avec la matière organique au milieu naturel. D'une part les substances humiques étudiées sont très diverses et peuvent présenter des affinités différentes pour les métaux selon leur composition ou leur origine. D'autre part, les phénomènes entrant en jeu lors de l'adsorption des espèces métalliques sur la matière organique dissoute sont multiples et complexes. Des modèles ont donc été élaborés qui prennent en compte, entre autres, les effets de la compétition entre les cations (y compris les protons) ou encore l'influence de la force ionique. Parmi ces modèles, le WHAM sera présenté en détail dans ce rapport, pour deux raisons principales. Tout d'abord il s'agit d'un modèle ayant bénéficié d'un certain nombre de phases de calibrations, de validations et d'améliorations. Ensuite, c'est également le modèle qui a été retenu pour effectuer les calculs de complexation des métaux avec la matière organique dissoute au sein des « *Biotic Ligand Models* », modèles pour lesquels une étude plus détaillée est réalisée en partie 3.

### 2.2.4.1. WHAM

Le Windermere Humic Aqueous Model (WHAM, Tipping, 1994) est un logiciel de spéciation incluant un programme de calcul de spéciation chimique inorganique ainsi qu'un modèle de complexation avec la matière organique : le Model V (Tipping et Hurley, 1992) ou le Model VI (Tipping, 1998) incorporé à la version la plus récente du logiciel.

#### 2.2.4.1.1 Description du Model V

Le Model V est un développement du Model IV décrit par Tipping et Woof, 1991 et dédié à la description chimique des eaux et sols acides. L'hypothèse est faite que la fixation des métaux a lieu sur un nombre discret de sites chimiques distincts de la matière organique. Cette fixation du métal sur le site récepteur ne pouvant se faire qu'après déprotonation<sup>14</sup> de ce dernier. Les attractions ou répulsions électrostatiques non-spécifiques sont également prises en compte.

Le Model V ne tient compte que de deux groupes de sites constitués des groupes donneurs de protons les plus réactifs (**COOH - groupements carboxyles notés A** et **OH - groupes phénoliques notés B**). La présence d'un petit nombre de sites de fixation qualifiés de « forts » tels que ceux contenant des atomes d'azote ou de soufre n'est pas prise en compte.

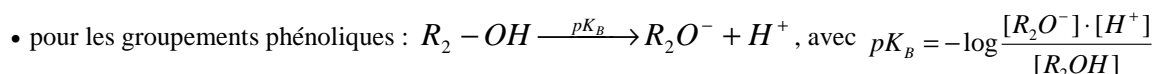
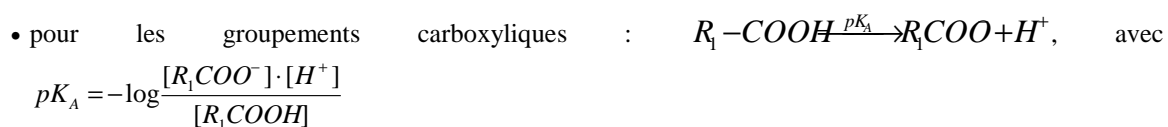
Les substances humiques portent des groupements carboxyles (**A**) présentant des pK<sup>15</sup> généralement inférieurs à 7 ainsi que des groupements phénoliques (**B**), plus faiblement acides, ayant des pK plus forts<sup>16</sup>. A l'intérieur de chaque type de groupements, il existe donc une certaine variabilité des pK. C'est pourquoi, de manière à décrire ces deux types de groupements, des valeurs caractéristiques sont retenues :

- la valeur médiane des pK est retenue pour chaque groupe : pK<sub>A</sub> et pK<sub>B</sub>,
- les intervalles des valeurs des pK sont également pris en compte : ΔpK<sub>A</sub> et ΔpK<sub>B</sub>.

<sup>14</sup> La perte d'un atome d'hydrogène (proton H<sup>+</sup>) par le groupement chimique situé sur la MO permet l'apparition d'une charge négative à sa surface. Le cation métallique, chargé positivement, peut ainsi se lier à la MO.

<sup>15</sup> Grandeur caractérisant leur réactivité potentielle avec les métaux.

<sup>16</sup> Les groupements carboxyliques sont plus acides. Ils sont donc plus susceptibles de libérer un proton (H<sup>+</sup>) que les composés phénoliques. La réaction correspondante est la suivante :





Le Model V prend en compte huit sites de dissociation de protons définis par les paramètres présentés ci-après (Équation 2-1).

**Équation 2-1 : Constantes de dissociation pour les différents sites protonés de la matière humique (d'après Tipping, 1994)**

$$pK_i = pK_{AouB} - \frac{(2i-5)}{6} \Delta pK_{AouB}$$

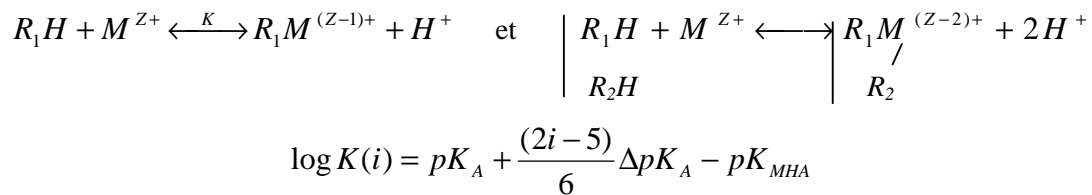
$$pK_1 = pK_A - \frac{\Delta pK_A}{2} ; pK_2 = pK_A - \frac{\Delta pK_A}{6} ; pK_3 = pK_A + \frac{\Delta pK_A}{6} ; pK_4 = pK_A + \frac{\Delta pK_A}{2}$$

$$pK_5 = pK_B - \frac{\Delta pK_B}{2} ; pK_6 = pK_B - \frac{\Delta pK_B}{6} ; pK_7 = pK_B + \frac{\Delta pK_B}{6} ; pK_8 = pK_B + \frac{\Delta pK_B}{2}$$

On présume qu'il y a un nombre identique de sites 1 à 4 et de sites 5 à 8. La concentration totale en sites de type A est égale à  $n_A$  (en  $\text{eq.g}^{-1}$ ). Sur la base d'autres travaux, la concentration en sites de type B est estimée à  $n_A/2$ .

La fixation du métal intervient donc sur un seul site (monodendate) ou bien, lorsque les sites sont suffisamment proches, sur deux sites simultanément (bidendate). Les équilibres peuvent s'écrire sous la forme suivante :

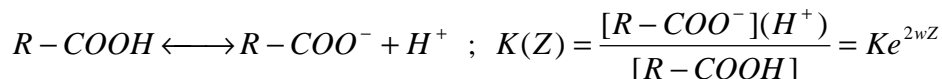
**Équation 2-2 : Réaction d'échange proton / métal au niveau des sites de complexation avec la matière humique et constante d'équilibre associée**



Pour réduire les temps de calcul, les combinaisons de sites doubles sont restreintes aux couples de sites protonés suivants : 1-2, 1-4, 1-6, 1-8, 2-3, 2-5, 2-7, 3-4, 3-6, 3-8, 4-5, 4-7. L'échange entre un proton et un ion métallique est décrit par une constante d'équilibre (K). Lorsque deux sites interviennent dans la fixation de l'ion, les constantes correspondant à chaque site sont simplement multipliées entre elles. Ces constantes sont différentes suivant le type de site. On note donc  $K_{MHA}$  et  $K_{MHB}$  les constantes d'équilibre pour les sites de types A et B, respectivement. Un autre paramètre,  $f_{pr}$ , le facteur de proximité, définit la proportion de sites monodendates capables d'intervenir dans des liaisons bidendates. Ce facteur, initialement fixé à l'unité dans le Model IV, entraînant une trop forte proportion de sites « forts », est donc réévalué à 0.4 dans le Model V.

L'effet des interactions électrostatiques sur la fixation des ions à des sites spécifiques est relié à la charge nette (Z) de la substance humique. Les constantes d'équilibre sont ainsi modifiées par un terme de la forme  $\exp(2w.z.Z)$  où z est la charge du cation et w le facteur d'interaction électrostatique. Par exemple, la dissociation d'un proton d'un groupe carboxyle est définie par les équations suivantes :

**Équation 2-3 : Effet des interactions électrostatiques sur les constantes de dissociation des protons de la matière humique**



[ ] indique les concentrations et ( ) les activités<sup>17</sup>. K est une constante intrinsèque, la valeur de K(Z) lorsque Z est nulle, et K(Z) est appelé quotient d'équilibre et varie avec la charge nette de la substance (Z). Dans le Model V, ces constantes sont indépendantes de la force ionique. Les valeurs de w peuvent être dérivées des potentiels de surface et des dimensions des molécules en appliquant les théories électrostatiques de Debye-Hückel et de Gouy-Chapman. Cependant ici, w est déterminé expérimentalement à partir de données de la littérature faisant intervenir des phénomènes de dépendance de la force ionique. Pour certaines substances humiques, w varie avec Z ; cela permet de relier w à la force ionique (I) et à Z dans cette expression :

**Équation 2-4 : Expression du facteur d'interaction électrostatique**

$$w = P \log_{10} I \times e^{Q|Z|}$$

Z représente le module de la charge nette sur la substance humique. Des études ont montré également que, pour les plus petites molécules de type « acide fulvique », Q pouvait être fixé à 0. Ainsi, seul P (variable représentant les interactions électrostatiques) demeure comme paramètre ajustable pour les optimisations des calculs. Les interactions électrostatiques créent, d'une part des modifications dans les fixations au niveau des sites discrets, mais l'attraction électrostatique engendre aussi une accumulation de contre-ions dans la partie diffuse de la double couche électrique des substances humiques. Ainsi, dans le Model V, un volume est créé dans lequel suffisamment de contre ions sont disposés de manière à assurer l'électroneutralité. La concentration de contre ions dans cette couche diffuse est estimée à partir d'expressions de type Donnan. Le volume de cette couche diffuse est également estimé.

De manière à le caler aux données expérimentales sur la dissociation des protons, le Model V dispose de sept paramètres ajustables :  $n_A$ ,  $pK_A$ ,  $pK_B$ ,  $\Delta pK_A$ ,  $\Delta pK_B$ , P et Q (même si pour les acides fulviques Q est égal à 0). De plus, pour chaque cation susceptible de se fixer aux sites déprotonés, il existe deux autres paramètres :  $pK_{MHA}$  et  $pK_{MHB}$  (logarithmes négatifs des constantes d'affinité intrinsèques d'un composé pour la matière organique : plus sa valeur sera faible et plus le métal aura d'affinité pour la matière organique).

Le Model V prend également en considération la complexation des premiers produits de l'hydrolyse des espèces (e. g.  $CuOH^+$  dans le cas de  $Cu^{2+}$ ). La constante d'affinité de ce composé pour la MO est prise arbitrairement comme étant égale à celle utilisée pour l'espèce parente.

---

<sup>17</sup> l'activité est définie selon l'équation suivante :  $a_i = \gamma_i \cdot X_i$ , où  $a_i$ ,  $\gamma_i$  et  $X_i$  sont respectivement, dans le cas des solutions aqueuses, l'activité du constituant i, le coefficient d'activité et la concentration molaire du constituant i. Le coefficient d'activité  $\gamma$  est égal à 1 si la solution à laquelle appartient le constituant i est idéale, c'est à dire s'il n'existe aucune interaction entre les particules (molécules, ions) qui la constituent. La valeur de  $\gamma_i$  est d'autant plus voisine de 1 que la concentration des solutions est faible (cette condition minimise les interactions).

Le logiciel WHAM prend aussi en compte la formation de deux espèces solides : les hydroxydes de fer et d'aluminium (III). Ces espèces ne sont pas capables, d'après le modèle, de servir de ligands pour les ions. Leur surface active est considérée comme nulle. Ceci permet de refléter les conditions retrouvées dans les systèmes environnementaux correspondant aux eaux acides et aux sols pour lesquels le modèle a été développé. D'autres applications pourraient par contre nécessiter la prise en compte de la formation et de la dissolution d'autres phases comme les carbonates et les sulfures.

#### 2.2.4.1.2 Calibration du Model V

Un ensemble de données expérimentales a servi de base à la calibration du modèle, les mesures d'ions métalliques libres et de protons permettant de calculer les quantités complexées à la matière organique.

L'ajustement du modèle aux jeux de données disponibles a été conduit pour Z, la charge nette des substances humiques, en utilisant la méthode des moindres carrés. Les meilleures valeurs obtenues (celles qui rendaient le mieux compte de la majorité des observations) pour les différents paramètres ajustables ont ensuite été conservées pour l'analyse des données concernant la complexation avec les cations métalliques. Les deux paramètres ajustables pour ce phénomène,  $pK_{MHA}$  et  $pK_{MHB}$ , ont été optimisés à partir des jeux de données les plus importants (voir Tableau 2-1).

**Tableau 2-1 : Dimension des jeux de données utilisés pour la calibration du Model V (partie complexation entre la MO et les cations métalliques)**

Cations métalliques	Nombre de données (substances humiques du sol)	Nombre de données (substances humiques aquatiques)	Type d'acide humique d'origine aquatique
Mg <sup>2+</sup>	1 jeu de données (2 données)	-	-
Ca <sup>2+</sup>	2 jeux de données (19 et 2 données)	3 jeux de données (30, 60 et 18 données)	Suwannee River humic acid 4 fractions d'acides fulviques (proportion de C estimée, 50%)
Mn <sup>2+</sup>	1 jeu de données (2 données)	-	-
Fe <sup>2+</sup>	1 jeu de données (2 données)	-	-
Co <sup>2+</sup>	1 jeu de données (2 données)	-	-
Ni <sup>2+</sup>	1 jeu de données (2 données)	-	-
Cu <sup>2+</sup>	3 jeux de données (60, 2 et 27 données)	3 jeux de données (39, 22 et 24 données)	Suwannee River fulvic acid (proportion de C estimée, 53.5%) Acides fulviques aquatiques
Zn <sup>2+</sup>	1 jeu de données (2 données)	1 jeu de données (7 données)	Substances humiques aquatiques
Cd <sup>2+</sup>	1 jeu de données (27 données)	1 jeu de données (33 données)	Acides fulviques aquatiques
Pb <sup>2+</sup>	3 jeux de données (2, 29 et 46 données)	2 jeux de données (41 et 20 données)	Acides fulviques aquatiques

Les différentes estimations de ces paramètres réalisées pour un même métal à partir de jeux de données différents correspondent relativement bien. Cependant, il faut noter que les sources de matières organiques utilisées semblent très proches (Cf. Tableau 2-1). Cette recherche des paramètres caractérisant la fixation des ions métalliques sur les sites A et B a permis de découvrir une relation entre eux (Équation 2-5). L'analyse par régression permet ainsi d'exprimer  $pK_{MHB}$  en fonction de  $pK_{MHA}$ . Cette relation explique 60% de la variance de  $pK_{MHB}$  (mais avec un coefficient de corrélation ~ 0.53) :

**Équation 2-5 : Relation entre les constantes d'affinité des métaux pour les sites A ( $pK_{MHA}$ ) et B ( $pK_{MHB}$ )**

$$pK_{MHB} = 1.38pK_{MHA} + 2.57$$

Cette nouvelle relation est donc implémentée au modèle de complexation avec la matière organique et la capacité d'une substance à se lier à la MO n'est donc plus fonction que d'une seule constante :  $pK_{MHA}$ . De là, Tipping et Hurley, 1992 ont comparé les valeurs des constantes de complexation entre les métaux et les substances humiques obtenues grâce au modèle, à une base de données regroupant également des constantes de complexation des métaux mais avec différents ligands simples. Il ressort de cette comparaison que l'acide lactique semble présenter une capacité complexante similaire à celle offerte par la MO. Cette découverte ouvre donc la possibilité d'estimer les valeurs des  $pK_{MHA}$  dans le cas où la complexation entre les substances humiques et un métal n'aurait pas été évaluée.

Le Tableau 2-2 donne un récapitulatif des valeurs attribuées par défaut aux paramètres décrivant les propriétés des acides fulviques (AF) et humiques (AH) dans la version 1.0 du WHAM.

**Tableau 2-2 : Valeurs par défaut des paramètres décrivant les propriétés de la matière organique (WHAM 1.0 - Model V)**

Paramètre	Description	AF	AH
$n_A$	Concentration en groupements carboxyliques (mol.g <sup>-1</sup> )	4.73.10 <sup>-3</sup>	3.29.10 <sup>-3</sup>
$n_B$	Concentration en groupements phénoliques (mol.g <sup>-1</sup> ) = $n_A/2$	2.37.10 <sup>-3</sup>	1.65.10 <sup>-3</sup>
$pK_A$	pK médian pour les sites de type A	3.26	4.02
$pK_B$	pK médian pour les sites de type B	9.64	8.55
$\Delta pK_A$	Gamme des pK des sites de type A	3.34	1.78
$\Delta pK_B$	Gamme des pK des sites de type B	5.52	3.43
P	Paramètre définissant l'interaction électrostatique	-103	-374
$f_{pr}$	Facteur de proximité pour la formation de sites bidentates	0.4	0.5
	Masse molaire (g.mol <sup>-1</sup> )	1500	15000
	Rayon moléculaire (nm)	0.8	1.72
$pK_{MHA}$	Paramètre caractéristique de l'affinité entre un métal et les groupements carboxyliques	Fonction du métal considéré	Fonction du métal considéré
$pK_{MHB}$	En fonction de $pK_{MHA}$	3.96. $pK_{MHA}$	3. $pK_{MHA}$ - 3
$K_Z$	Facteur de charge pour le volume de la couche diffuse (d'après des expériences sur des substances humiques du sol ; ce facteur n'a pas été optimisé)	10 <sup>3</sup> (par défaut)	10 <sup>3</sup> (par défaut)
$f_{DL}$	Facteur pour le volume maximal de la couche diffuse (ce facteur n'a pas été optimisé)	0.25 (par défaut)	0.25 (par défaut)
$\gamma$	Paramètre de distribution	1	-
$\beta$	Paramètre d'adsorption	10 <sup>4</sup>	-
$K_0$	Paramètre d'adsorption	1	-

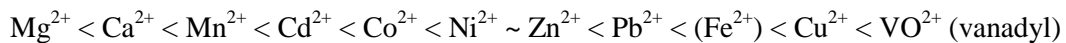
En conclusion, le Model V prend en compte les propriétés moyennes des substances humiques. En principe, il pourrait également être développé en prenant en compte une distribution de composés de masses molaires différentes ayant des capacités de déprotonation différentes mais cette approche suppose la mise en œuvre, trop complexe, d'outils analytiques.

- |   |  |
|---|--|
| ▼ | <ul style="list-style-type: none"> <li>Le principal défaut de la calibration de ce modèle réside dans la pauvreté, quantitative et qualitative, des données utilisées. En effet, la calibration grâce à des études réalisées avec des substances humiques aquatiques ne s'est faite que pour cinq métaux (Ca<sup>2+</sup>, Cu<sup>2+</sup>, Zn<sup>2+</sup>, Cd<sup>2+</sup>, Pb<sup>2+</sup>). Les types de substances humiques utilisées ne sont pas suffisamment variés et, parfois, leur origine n'est pas précisée.</li> <li>La relation mise en évidence entre les constantes d'affinité des métaux pour les sites A et B permet de simplifier le modèle. Néanmoins, l'incertitude attachée à cette relation augmente d'autant les incertitudes liées modèle.</li> </ul> |
|---|--|

### 2.2.4.1.3 Validation du Model V

Tous les modèles doivent subir des étapes de validation permettant de confronter les données calculées à des mesures issues d'expérimentations. C'est le cas pour le WHAM dont les modules de complexation avec la matière organique (Model V) et de spéciation inorganique ont été testés, entre autres, sur des échantillons naturels.

Peu de temps après sa mise au point, le Model V a été testé, en guise de validation, par un jeu de données réunissant les mesures de neuf métaux réalisées à deux niveaux de pH, dans le sol (Schnitzer et Skinner, 1966; Schnitzer et Skinner, 1967). Ces données furent assez correctement modélisées même si les valeurs calculées avaient tendance à montrer une sous-estimation de la complexation aux pH les plus bas et une surestimation aux plus hauts. Les constantes de complexation calculées à partir des études précédentes donnent l'ordre croissant de complexation avec la matière organique suivant :



On peut noter que l'ion ferreux possède généralement une capacité de complexation avec la MO de l'ordre de celle du cobalt. Lors de cette étude, les ions ferreux ont pu se transformer en ions ferriques qui eux se lient plus fortement avec les substances humiques.

Dwane et Tipping, 1998 ont réalisé un test du WHAM (version incluant le Model V) grâce à des échantillons d'eau naturelle enrichis en cuivre. Lors de la modélisation, les éléments suivants ont été pris en compte : pH, DOC, Na, Mg, Al, K, Ca, Cl, NO<sub>3</sub>, SO<sub>4</sub>, alcalinité tandis que les concentrations en ions Cu<sup>2+</sup> étaient suivies à l'aide d'une électrode spécifique. La base de constantes d'affinité par défaut a été utilisée et le modèle n'a été optimisé, par la méthode des moindres carrés, que par l'ajustement des concentrations en acides fulviques actifs (AF) dans les solutions. Une concentration en acides fulviques optimale ([FA]<sub>opt</sub>) a donc été déterminée en comparant les résultats des mesures aux données modélisées. Des eaux naturelles prélevées dans le Nord de l'Angleterre et présentant des caractéristiques différentes ont été testées. Les caractéristiques de ces eaux ainsi que les valeurs de [FA]<sub>opt</sub> déterminées sont détaillées dans le Tableau 2-3.

**Tableau 2-3 : Principales caractéristiques des eaux étudiées pour tester le WHAM, Model V (d'après Dwane et Tipping, 1998)**

Désignation	Caractéristiques principales	Facteur optimisé
Mares de la région de Pennine (RU)	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 5 m<sup>2</sup> ; 0.2 m de profondeur, région de tourbières.</li> <li>• COD = 7-13.4 mg/L</li> <li>• pH = 4.2-6.5</li> </ul>	[FA] <sub>opt</sub> = 9.2-26.9mg/L
Lac Windermere (RU)	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 14.76 km<sup>2</sup> ; profondeur moyenne 21.3 m, région de landes et de forêts.</li> <li>• COD = 1.8 mg/L</li> <li>• pH = 7.2</li> </ul>	[FA] <sub>opt</sub> = 3.1-4.2 mg/L
Lac Levers (RU)	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 0.15 km<sup>2</sup> ; profondeur moyenne 9.4 m, lac acide oligotrophique, région de landes et de roches affleurantes.</li> <li>• COD = &lt;0.5 mg/L</li> <li>• pH = 5</li> </ul>	[FA] <sub>opt</sub> = 1.2-1.7 mg/L
Rivière Aire (RU)	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Reçoit des effluents industriels et municipaux.</li> <li>• Forte alcalinité et forts taux de calcium.</li> <li>• COD = 14 mg/L</li> <li>• pH = 7.9</li> </ul>	[FA] <sub>opt</sub> = 9.8-10.6 mg/L
Rivière Calder (RU)	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Reçoit des effluents industriels et municipaux.</li> <li>• Forte alcalinité et forts taux de calcium.</li> <li>• COD = 13.9-22.5 mg/L</li> <li>• pH = 7.6</li> </ul>	[FA] <sub>opt</sub> = 11.8-20.9 mg/L
Rivière Derwent (RU)	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Traverse des terres agricoles et reçoit quelques effluents d'égouts.</li> <li>• Forte alcalinité et forts taux de calcium.</li> <li>• COD = 1.4 mg/L</li> <li>• pH = 8.2</li> </ul>	[FA] <sub>opt</sub> = 1.7-2.3 mg/L
Rivière Ouse (RU)	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Traverse des terres agricoles et reçoit quelques effluents d'égouts.</li> <li>• Forte alcalinité et forts taux de calcium.</li> <li>• COD = 3.6 mg/L</li> <li>• pH = 8.2</li> </ul>	[FA] <sub>opt</sub> = 2.5-3.2 mg/L

D'après les résultats obtenus pour la détermination des concentrations en acides fulviques optimales ([FA]<sub>opt</sub>), deux catégories ressortent. La première regroupe les lacs et les mares et est caractérisée par un fort rapport [FA]<sub>opt</sub>/ COD (environ 1.6) alors que la deuxième catégorie englobe les rivières de plaine et se caractérise par des rapports d'environ 0.8. Comme on fait l'hypothèse que la matière organique d'origine naturelle est constituée pour moitié de carbone, alors la simple interprétation de ces rapports permet de conclure que 80% de la MO pour les lacs et les mares et 40% de la MO pour les rivières de plaine peuvent être assimilés à des acides fulviques « actifs » tandis que le restant est qualifié d'inerte. D'une manière générale, en l'absence d'informations complémentaires, Dwane et Tipping, 1998 proposent d'assimiler 50% de la MO, exprimée en COD, à des substances humiques (acides fulviques) actives.

Même si les données calculées sont très proches des mesures, après optimisation de la concentration en acides fulviques, les auteurs de ces travaux soulèvent néanmoins quelques questions concernant les résultats obtenus. En effet, plusieurs cas de figure sont envisageables. Premièrement, il est possible que, concernant la MO, une partie soit réellement assimilable à des acides fulviques actifs et que l'autre soit inerte aux phénomènes d'adsorption. Cependant, les procédures d'isolation des acides fulviques qui supposent une exposition à de fortes concentrations d'acides et de bases, peuvent entraîner une altération chimique de ces substances en augmentant le nombre de groupes ionisables. Dans ce cas, le modèle surestimerait la proportion de métal fixé à la MO. Il se peut également que les phénomènes de compétition soient plus importants dans les eaux naturelles. Cette étude aura en outre montré que les concentrations en oxyde de fer (III) par exemple n'avaient, dans des concentrations raisonnables, que peu d'influence sur la complexation du cuivre avec la matière organique. Enfin, les paramètres fixés par défaut et déterminés à partir de mesures sur des acides fulviques isolés peuvent ne pas être représentatifs des échantillons naturels étudiés.

- ▽
- Même si l'étape de validation, sur un nombre limité de données, a fourni des résultats satisfaisants, il est toutefois nécessaire de noter qu'un paramètre du modèle a subi un ajustement ( $[FA]_{opt}$ ). Dans des conditions d'utilisation opérationnelle de ce modèle, de tels ajustements ne seraient pas permis.
  - Les résultats sans ajustement du paramètre  $[FA]_{opt}$  (dans des conditions d'utilisation opérationnelle du modèle) ne sont pas disponibles. Il est donc difficile de porter un jugement sur la pertinence de ce modèle.

#### 2.2.4.1.4 Particularités du Model VI

Dans une autre étude plus récente (Tipping, 1998), les limites du Model V sont discutées et un nouveau modèle (Model VI) est proposé. D'une part ce modèle est basé sur une approche tenant compte, d'une meilleure manière, d'une distribution de sites de fixation des métaux. D'autre part, il est recalibré non seulement à partir des jeux de données utilisés auparavant pour le Model V mais également à partir de nouvelles données.

La définition des constantes de dissociation des protons aux sites A (sites carboxyliques) et B (sites phénoliques) reste inchangée sauf en ce qui concerne l'abondance de ces sites au niveau des matières humiques qui est redéfinie de la façon suivante :  $n_A/4 \text{ mol.g}^{-1}$  de substances humiques pour les sites de type A et  $n_A/8 \text{ mol.g}^{-1}$  pour ceux de type B. L'équilibre entre les sites de la matière humique et les métaux précédemment défini par l'Équation 2-2 est maintenant décrit par l'Équation 2-6. Cette notation est ainsi calquée sur celle de l'équilibre de dissociation des protons.

#### Équation 2-6 : Constante de complexation métal / substances humiques

$$K(i) = \log K_{MA} + \frac{(2i-5)}{6} \Delta LK_1 \quad \text{et} \quad K(i) = \log K_{MB} + \frac{(2i-13)}{6} \Delta LK_1$$

La constante  $\Delta LK_1$  est estimée à partir de différents calibrages du modèle au moyen de jeux de données. Si le jeu de données est assez fourni, une constante peut être obtenue pour chaque type de sites. Le Model V prenait déjà en compte des liaisons faisant intervenir deux sites simultanément, la constante d'équilibre correspondante étant alors définie par le produit des constantes d'équilibre associées à chacun des sites. Le Model VI propose un système plus abouti pour les complexations mettant en jeu deux et même trois sites. Les constantes d'équilibre associées à ces phénomènes sont alors définies selon l'Équation 2-7.

#### Équation 2-7 : Constantes d'équilibre pour les systèmes bidendate et tridendate

$$\text{Sites bidendates : } \log K(i, j) = \log K(i) + \log K(j) + x \cdot \Delta LK_2$$

$$\text{Sites tridendates : } \log K(i, j, k) = \log K(i) + \log K(j) + \log K(k) + y \cdot \Delta LK_2$$

Les valeurs prises par x et y permettent la prise en compte d'une gamme de forces complexantes : pour les sites bidendates, x est fixé à 0 pour 90.1% des sites, 1 pour 9% et 2 pour 0.9%. Pour les sites tridendates, y vaut 0, 1.5 et 3 pour 90.1%, 9% et 0.9% des sites respectivement. En général, chaque métal possède un  $\Delta LK_2$ . La fraction de sites bidendates est notée  $f_{prB}$  (0.42 pour les acides fulviques et 0.50 pour les acides humiques) et celle des sites tridendates  $f_{prT}$  (0.03 pour les AF et 0.065 pour les AH).

Ces dernières évolutions entraînent une augmentation des combinaisons prises en compte (ici encore, pour des contraintes liées aux temps de calcul, toutes les combinaisons de sites possibles ne sont pas autorisées). Les sites bidendates et tridendates sont représentés par 72 possibilités auxquelles viennent s'ajouter les huit sites monodendates.

La partie faisant intervenir les effets électrostatiques sur la complexation des métaux avec les substances humiques reste quant à elle inchangée.

Au final, six paramètres nécessitent d'être ajustés pour décrire les phénomènes de dissociation des protons ( $n_A$ ,  $pK_A$ ,  $pK_B$ ,  $\Delta pK_A$ ,  $\Delta pK_B$ ,  $P$ ), comme pour le Model V et quatre paramètres au maximum décrivent la complexation des métaux ( $\log K_{MA}$ ,  $\log K_{MB}$ ,  $\Delta LK_1$ ,  $\Delta LK_2$ ).

**Tableau 2-4 : Nouveaux paramètres utilisés dans le Model VI**

Paramètre	Description	Source
$\log K_{MA}$	Constante d'équilibre intrinsèque pour la complexation des métaux aux sites de type A	Calibré à partir de données expérimentales
$\log K_{MB}$	Constante d'équilibre intrinsèque pour la complexation des métaux aux sites de type B	Calibré à partir de données expérimentales ou corrélé au $\log K_{MA}$
$\Delta LK_1$	Terme de distribution modifiant $\log K_{MA}$	Calibré à partir de données expérimentales ou fixé de manière universelle
$\Delta LK_2$	Terme de distribution modifiant la force des sites bidendate et tridendate	Calibré à partir de données expérimentales ou corrélé au $\log K_{NH_3}$
$f_{prB}$	Fraction des sites protonés pouvant former des sites bidendates	Calculé par géométrie
$f_{prT}$	Fraction des sites protonés pouvant former des sites tridendates	Calculé par géométrie

#### 2.2.4.1.5 Calibration du Model VI

La calibration du Model VI diffère de celle du Model V du fait que les jeux de données utilisés ont été, cette fois-ci, triés en fonction des substances humiques testées : acides fulviques ou acides humiques. Les données utilisées auparavant pour la calibration du Model V (Tipping et Hurley, 1992) ont été réemployées. Avec les nouveaux jeux de données utilisés, les limites du Model V et de ses deux paramètres ajustables ont été dévoilées. La possibilité d'influer sur quatre paramètres grâce au Model VI permet une meilleure correspondance entre les résultats calculés et les mesures. De plus, des interprétations plus fines des résultats obtenus sont désormais permises grâce à ce nouveau modèle. Il apparaît ainsi que Ca et Cd sont plus influencés par  $\Delta LK_1$  ce qui traduit une forte dépendance de la complexation au pH alors que la fixation de Cu sur les matières humiques est plus contrôlée par  $\Delta LK_2$ , traduisant une plus grande importance d'un petit nombre de sites fortement complexants.

La limite de la calibration des différents paramètres du Model VI vient, encore une fois, de la faible quantité de données expérimentales disponibles. De ce fait, des paramètres universels, obtenus soit à partir de moyennes soit à partir de corrélations, sont recherchés.

▼	<p>Le Model VI utilise, comparativement au Model V, un plus grand nombre de paramètres. Deux inconvénients majeurs sont associés à de telles modifications :</p> <ul style="list-style-type: none"> <li>- la nécessité de disposer de données expérimentales en plus grand nombre et la difficulté d'emploi de tels modèles, plus complexes, de façon opérationnelle.</li> <li>- sans phase de validation, il n'est pas possible de s'assurer de la meilleure pertinence d'un modèle plus complexe. L'augmentation du nombre de paramètres améliore l'ajustement aux données expérimentales ayant servies à la construction du modèle mais n'implique pas nécessairement une amélioration du pouvoir prédictif du modèle pour de nouvelles données.</li> </ul>
---	--

#### 2.2.4.2. Modèle NICA - Donnan

Le modèle NICA-Donnan (Benedetti *et al.*, 1995) est un programme de calcul permettant de décrire la complexation des métaux avec la matière organique, de la même façon que les Model V et VI. Il considère aussi bien un nombre défini de sites de la MO ayant des affinités différentes pour les métaux que des phénomènes de complexation non-spécifiques comme l'interaction électrostatique. Ce modèle est composé de deux parties distinctes : la complexation « spécifique », c'est à dire la formation d'une liaison covalente entre le métal et un site de la MO, est décrite par le modèle NICA tandis que la complexation non spécifique, c'est à dire les interactions électrostatiques, est prise en charge par le modèle de Donnan.



**Le modèle NICA** (Non-Ideal Competitive Adsorption Model) fait l'hypothèse que la fixation monodendate du métal sur la MO se fait grâce à des sites capables de libérer des protons. Ces sites de complexation présentent une distribution continue d'affinités pour le métal considéré définie par deux paramètres : le premier rendant compte de l'hétérogénéité présentée par les substances humiques, le deuxième étant spécifique à l'ion métallique en question. Deux distributions de ce type sont nécessaires : l'une pour caractériser les groupes carboxyliques (acides forts), l'autre pour les groupements phénoliques (acides plus faibles).

**L'approche de Donnan** : les substances humiques présentent une structure tridimensionnelle dont les propriétés pourraient être rapprochées des gels poly-électrolytes. L'hypothèse est émise que des groupes carboxyliques et phénoliques sont présents au sein de la MO. La dissociation des protons à partir de ces groupes crée donc un potentiel. Le modèle simple de Donnan fait l'estimation que l'électroneutralité globale du système doit être conservée à tout moment par l'action de sels, c'est à dire grâce à la présence de contre-ions, de charge positive, tels que les cations métalliques.

Le modèle NICA-Donnan nécessite sept ou huit paramètres qui permettent de décrire l'affinité des protons pour les sites de complexation à différentes forces ioniques : deux paramètres décrivant la densité des sites, deux constantes d'équilibre médianes, deux paramètres de distribution et un paramètre électrostatique. La charge initiale des substances humiques est, si nécessaire, traitée comme un paramètre ajustable. Quatre paramètres sont enfin nécessaires par métal. Ces paramètres ont été déterminés pour Ca, Cu, Cd et Pb (Benedetti *et al.*, 1995 ; Kinniburgh *et al.*, 1996) ce qui ne permet pas la modélisation de la complexation simultanée d'une certaine variété de métaux.

### 2.3. Complexation avec le « ligand biotique »

Par définition, le « ligand biotique » est la cible biologique préférentielle d'un contaminant. Dans la sémantique de la spéciation chimique, les espèces métalliques peuvent former, avec d'autres espèces chimiques appelées ligands, des entités nommées complexes. Par assimilation, les sites de fixation des métaux sur les organismes vivants sont également désignés par le terme ligand (biotique) et on appelle complexe la formation de liens métal / organisme.

A l'origine, la plupart des tests écotoxicologiques mis en œuvre dans le contexte de l'étude de la biodisponibilité ont porté sur des poissons. C'est pourquoi, la plupart du temps, le terme de ligand biotique est à rapprocher des branchies, site reconnu comme site d'expression de la toxicité aiguë des métaux. Ce rapport s'attachera donc à détailler la partie concernant les ligands biotiques des poissons. En cela il sera fidèle à la part qu'occupe ce genre d'études dans la littérature même si, plus récemment, des travaux sur les invertébrés (Cf. point 2.3.3) et les algues (Cf. point 2.3.4) ont été menés.

#### 2.3.1. Généralités

De manière à s'accumuler et/ou provoquer un effet, le métal doit avant tout interagir avec une membrane biologique. La paroi cellulaire est constituée d'une grande variété de groupes fonctionnels à base d'oxygène (e. g. COH, COOH, P(O)(OH)<sub>2</sub> - phospholipides). A des pH proches du pH neutre, de nombreux sites seront ionisés, offrant aux complexes métalliques biodisponibles une matrice hydrophile chargée négativement au travers de laquelle ils pourront migrer et, éventuellement, atteindre le plasma membranaire. Il existe cependant d'autres voies d'entrée possibles comme des protéines capables de traverser la double couche lipidique des cellules, des transporteurs de protéines ou encore des canaux à ions. Les différentes étapes conduisant à l'adsorption / absorption du métal au niveau des organismes vivants sont récapitulées dans le Tableau 2-5.

**Tableau 2-5 : Etapes de l'interaction métal / organisme et hypothèses nécessaires à la modélisation (d'après Campbell *et al.*, 2002)**

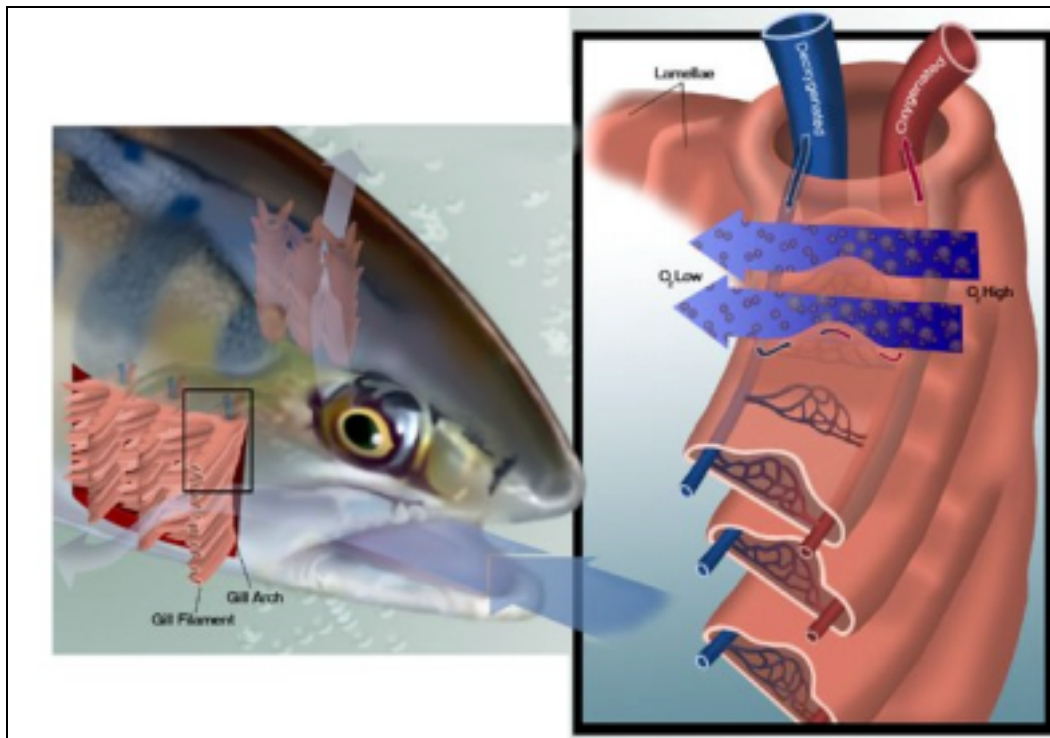
Etapes de l'interaction métal / organisme	Hypothèses simplificatrices
Diffusion du métal à partir de l'eau vers la surface biologique.	① Le transport (diffusion) du métal en solution et la complexation avec le ligand biotique interviennent rapidement (d'une manière plus rapide que l'assimilation du métal et que l'expression d'une réponse biologique). On prend ainsi en compte un équilibre entre les espèces métalliques présentes dans la phase dissoute de l'eau et celles complexées à la surface des membranes cellulaires.
Adsorption (complexation) du métal à la surface de la membrane cellulaire ou à la surface de la membrane plasmatique.	② La membrane plasmatique est le site principal de l'interaction d'un métal avec un organisme vivant. Cette interaction se traduit par un échange de ligand pour former le complexe métal / ligand biotique {M-X-cell}.
Assimilation du métal (transfert à travers la membrane plasmatique).	③ La réponse biologique est fonction de la concentration en {M-X-cell}.  ④ Les variations de {M-X-cell} peuvent s'exprimer selon [M <sup>z+</sup> ] en solution grâce à une loi classique d'adsorption de type Langmuir. Si la concentration en sites membranaires reste constante dans l'intervalle de concentrations environnementales en métal, alors les variations de {M-X-cell} suivront celles de [M <sup>z+</sup> ] en solution.  ⑤ Tout au long de l'exposition au métal considéré, la nature de la surface biologique demeure constante (i. e. le métal n'induit pas de changement dans la nature de la membrane plasmatique ni des transporteurs d'ions).

Les critères d'effets biologiques (réponse biologique) pris en compte dans le cas de l'évaluation de la toxicité d'un métal vis-à-vis des organismes, par exemple, sont généralement : l'accumulation (comprenant à la fois l'adsorption et l'assimilation) et la modification de l'activité photosynthétique, de la mobilité ou de la croissance.

- ▼ L'interaction des métaux traces avec les organismes aquatiques peut être décrite en trois étapes principales :
- ⇒ l'advection ou la diffusion du métal vers la surface de la membrane cellulaire,
  - ⇒ la complexation du métal au niveau de sites à la surface des membranes,
  - ⇒ le transport du métal de la surface de la cellule à l'intérieur de l'organisme.

### 2.3.2. Les ligands biotiques I : chez les poissons (les branchies)

Les branchies des poissons sont constituées de membranes respiratoires et ionorégulatrices sensibles et représentent le premier point de contact entre le poisson et les métaux présents dans l'eau environnante. En effet, elles constituent la plus grande partie de la surface de contact totale des poissons et sont, ainsi, le lieu principal d'échange d'eau et d'ions entre le sang et l'environnement (Randall *et al.*, 2000). Les branchies forment une structure comparable à un tamis formé par les arcs branchiaux, les filaments et les lamelles (voir Figure 2-4).



**Figure 2-4 : Représentation du système des branchies**

Les cellules épithéliales des branchies sont souvent recouvertes d'une matrice extracellulaire, le mucus, contenant différentes glycoprotéines. Cette matrice poly anionique peut fonctionner comme un système « échangeur d'ions » avec des affinités différentes suivant les métaux. Même si, d'une manière simple, on peut voir l'adsorption des métaux sur des sites des parois et membranes cellulaires, ce processus devient plus compliqué si l'on inclut le rôle du mucus sécrété par les branchies. Les ions métalliques sont donc « déplacés » du milieu environnant vers le mucus puis du mucus vers les sites des branchies. Ce mucus sert ainsi de stockage intermédiaire pour les métaux (Tao *et al.*, 2000).

A des concentrations inférieures ou égales à la  $LC_{50}$  (96h)<sup>18</sup>, la fixation d'ions métalliques à des sites spécifiques perturbe à la fois l'absorption et l'excrétion des autres ions. Le schéma est le suivant :

- ⇒ Les métaux monovalents ( $Ag^+$ ,  $Cu^+$ ) affectent le transport des  $Na^+$ .
- ⇒ Les métaux divalents ( $Cd^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$ ) affectent l'action de  $Ca^{2+}$  dans le métabolisme des organismes.
- ⇒ Les métaux peuvent également traverser les branchies et agir au sein même de l'organisme.

Dans le cas du cuivre, dont la forme prédominante dans les milieux aqueux est divalente ( $Cu^{2+}$ ), il y a probablement une réduction préalable en  $Cu^+$  avant le transport à travers les membranes biologiques. L'hypothèse est alors faite que le cation se débarrasse de son ligand (anionique) avant le transport via les membranes épithéliales. Mais la littérature révèle aussi que certains complexes du cadmium, du cuivre et du zinc peuvent être captés par les globules rouges (Campbell *et al.*, 2002).

Dans le cas du cuivre et de l'argent, l'absorption de  $Na^+$  se trouve bloquée. Les processus de régulation qui s'ensuivent conduisent à une baisse du sodium, du chlorure et des autres ions dans le plasma, puis à des accidents cardiovasculaires et enfin à la mort (e. g. une baisse de 30% de sodium dans le plasma suffit à causer la mort).

En ce qui concerne le système de transfert d'ions sans contre-ion, le processus doit s'accompagner de la libération d'un ion de même charge pour respecter l'électroneutralité :  $Na^+$  contre  $NH_4^+$  ou  $H^+$  et  $Cl^-$  contre  $HCO_3^-$ . Les paramètres principaux influant sur ce système de régulation ionique sont : le pH, les concentrations en ions  $Na^+$ ,  $Cl^-$ ,  $HCO_3^-$  et  $Ca^{2+}$  ainsi que les concentrations en ions métalliques.

L'argent et le cuivre entrent en compétition avec  $Na^+$ . L'effet modérateur des ions  $Ca^{2+}$  n'est alors pas seulement dû à une compétition entre ions mais aussi au fait qu'avec l'augmentation de  $Ca^{2+}$  les pertes de  $Na^+$  diminuent.  $Ca^{2+}$  joue le rôle de stabilisateur des jonctions étroites des membranes épithéliales ce qui réduit les pertes de  $Na^+$  et  $Cl^-$ . La mesure dans laquelle  $Ca^{2+}$  est protecteur de la toxicité exercée par les métaux dépend peut être aussi des espèces ; la physiologie entrera donc en jeu pour étendre le *Biotic Ligand Model* (BLM) aux autres espèces de poissons par exemple (Grosell *et al.*, 2002b ; Paquin *et al.*, 2002).

Il est aussi important de noter que, dans le cas des organismes marins, la situation est différente car les fortes concentrations en ions sodium inversent les directions des flux ioniques.

### 2.3.3. Les ligands biotiques II : chez les invertébrés

La plupart des connaissances sur les effets physiologiques des métaux sur les organismes aquatiques sont basées sur des tests écotoxicologiques aigus effectués sur des poissons. Ces effets physiologiques chez les poissons ont été reliés à l'inhibition de la régulation ionique du calcium (voir point 3.2.3). En ce qui concerne les invertébrés, et en particulier les daphnies (*Daphnia sp.*), des travaux complémentaires sur les mécanismes de toxicité physiologique aiguë seraient à mener. Actuellement, dans la plupart des travaux visant à la mise au point de modèles pour les invertébrés, des extrapolations sont réalisées à partir des connaissances disponibles sur les poissons (De Schampelaere et Janssen, 2002a). Un cas de développement de BLM pour les daphnies sera reporté plus en détail au point 3.3.1.

---

<sup>18</sup> concentration létale pour 50% des organismes testés, après 96 heures.

### 2.3.4. Les ligands biotiques III : chez les algues

Chez les algues, comme chez les autres organismes, on distingue deux types d'accumulation : l'adsorption et l'internalisation. Le premier phénomène s'exprime par la fixation du métal sur les parois des membranes cellulaires (polysaccharides, peptidoglycanes, etc.) alors que le second fait intervenir des protéines facilitant le transport membranaire (Slaveykova et Wilkinson, 2002).

L'adsorption des métaux sur les parois cellulaires des algues peut intervenir par attraction électrostatique. Avec une augmentation du pH, les parois cellulaires des algues, constituées de groupements donneurs de protons (acide polygalacturonique ou pectine, polyacétylglucosamine - chitine, cellulose, polysaccharides, etc.) peuvent se charger négativement (formation de groupes anioniques) et ainsi fixer les ions métalliques ainsi que les complexes métalliques chargés positivement (cations). Crist *et al.*, 1990 ont ainsi identifié deux processus de protonation des parois cellulaires des algues lors d'une diminution de pH : l'un rapide correspondant à la neutralisation des sites anioniques (carboxylates) et l'autre, plus lent, correspondant au relargage du métal et son remplacement par les ions hydronium (H<sup>+</sup>).

Crist *et al.*, 1988 ont montré que les membranes cellulaires des algues présentent une série continue de différents sites de fixation pour les métaux (ou les protons). De plus, Campbell, 1995 a fait l'hypothèse que les métaux se complexent rapidement avec ces cellules et qu'ils sont ensuite transportés, plus lentement, à l'intérieur de celles-ci où ils provoquent un effet toxique. La première réaction ayant, par hypothèse, la cinétique la plus courte, un équilibre avec le milieu est alors atteint. Les membranes constituant les parois cellulaires sont donc considérées comme étant les ligands biotiques des algues.

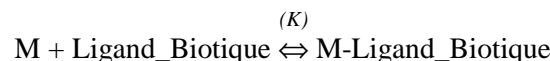
▼ Certains sites d'accumulation et/ou d'expression de la toxicité aiguë des métaux sur les organismes vivants sont considérés comme des ligands biotiques. L'analogie entre la fixation des métaux au niveau des membranes biologiques et les phénomènes de complexation permet le développement de modèles de la même manière que pour la spéciation chimique (inorganique et organique).

### 2.3.5. Modélisation de la complexation métal / ligand biotique

Les membranes branchiales peuvent être considérées comme des ligands (« ligand biotique ») et, à ce titre, une constante conditionnelle<sup>19</sup> de stabilité, à l'équilibre, peut être calculée (K<sub>métal-branchies</sub>). Celle-ci est fonction de l'affinité du métal considéré pour se fixer à ces cellules. Une fois calculée, cette constante peut servir à alimenter des programmes existants de spéciation chimique en milieu aqueux.

De la même manière que pour les phénomènes de complexation avec des ligands inorganiques, la réaction de fixation des ions métalliques au niveau du ligand biotique peut être définie grâce à une constante de complexation. Celle-ci peut s'exprimer sous la forme suivante :

**Équation 2-8 : Réaction de complexation entre le métal et le ligand biotique**



$$\log(K) = \frac{[M - \text{Ligand\_Biotique}]}{[M] \cdot [\text{Ligand\_Biotique}]}$$

Les modèles présentés ci-après ont servi de base au développement des « *Biotic Ligand Models* ».

---

<sup>19</sup> Les techniques de détermination de ces constantes de stabilité, qui régissent les réactions de complexation, sont mises en œuvre dans les conditions spécifiques propres à tout test. Elles sont donc qualifiées de conditionnelles puisqu'elles sont soumises aux propriétés physico-chimiques de l'eau (et en particulier au pH).

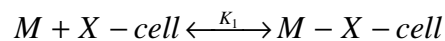
### 2.3.5.1. Le FIAM (*Free Ion Activity Model*)

Ce modèle pose, comme hypothèse principale, que la toxicité d'un métal est mieux prédite grâce à la concentration en ions libres que grâce à la concentration totale (Morel, 1983), hypothèse que viennent appuyer plusieurs résultats d'études. Il ne faut pas pour autant en déduire que seul l'ion métallique hydraté ( $M^{n+}$ ,  $nH_2O$ ) est responsable d'un effet toxique observé chez l'organisme. Ainsi, quelques exceptions « apparentes » au FIAM ont été décelées. Il suffit qu'un complexe métallique ML (L étant un ligand présent dans la phase aqueuse) réagisse avec la surface des cellules d'un organisme pour engendrer une réponse biologique non plus directement reliée à l'activité (Cf. note 17, page 32) de l'ion libre ( $M^{n+}$ ) mais fonction des activités de  $M^{n+}$  et ML.

Les hypothèses du FIAM (selon Campbell, 1995) sont les suivantes :

1. La membrane cellulaire est le premier site d'interaction entre le métal et l'organisme.
2. L'interaction entre un site libre à la surface de la membrane cellulaire {X-cell} et le métal ( $M^{n+}$ ) peut être décrite de la même façon qu'une réaction de complexation (voir Équation 2-9).

#### Équation 2-9 : Réaction de complexation du métal au niveau du ligand biotique



L'activité du complexe formé {M-X-cell} peut alors s'écrire :  $\{M-X-cell\} = K_1 \{X-cell\} [M]$  avec  $K_1$  la constante de la réaction de complexation, { } et [ ] les activités des espèces adsorbées et dissoutes respectivement.

3. Un équilibre s'établit rapidement entre les espèces métalliques en solution et à la surface des cellules de l'organisme.
4. La réponse biologique (BR : *Biological Response*), exprimée soit en fonction de l'accumulation / absorption de la substance, soit en fonction de sa toxicité, est directement proportionnelle à l'activité du complexe à la surface de la membrane cellulaire. On a alors  $BR = k K_1 \{X-cell\} [M]$  avec k une constante de proportionnalité.
5. Dans l'intervalle d'activités métalliques induisant une réponse biologique, l'activité des sites membranaires libres {X-cell} est directement proportionnelle à l'activité de l'ion libre en solution [ $M^{n+}$ ].
6. Pendant la durée de l'exposition à un métal, la nature de la surface de la membrane cellulaire reste inchangée.

▼ Le modèle FIAM (*Free Ion Activity Model*) a été développé pour expliquer la corrélation entre l'activité (Cf. note 17, page 32) de l'ion métallique libre en solution et les effets biologiques observés. En cela, il est un précurseur des *Biotic Ligand Models*.

### 2.3.5.2. Le FIAM modifié

Le FIAM modifié (Brown et Markich, 2000) prend pour base le FIAM auquel vient se greffer la théorie du récepteur biologique (*Biological Receptor Theory* : BRT) utilisé en pharmacodynamique.

Les hypothèses du BRT (reprises par Brown et Markich, 2000) sont reprises ci-dessous :

1. Un récepteur d'une surface cellulaire et une espèce métallique peuvent former, de façon réversible, un complexe (similaire à l'hypothèse 2 du FIAM).
2. Une réponse biologique (BR) résulte de l'occupation des sites récepteurs à la surface de la cellule {X-cell} à l'équilibre ou lorsqu'un pseudo-équilibre est réalisé (Cf. hypothèse 3 du FIAM).

3. La réponse biologique est directement proportionnelle à la fraction du nombre total de sites ( $\{X-cell\}_T$ ) occupée par l'espèce métallique ( $\{M-X-cell\}$ ) (Cf. hypothèse 4 du FIAM).
4. La réponse biologique maximale ( $BR_{max}$ ) est atteinte quand le nombre total de récepteurs  $\{X-cell\}_T$  est occupé par l'espèce métallique.
5. L'activité de l'espèce métallique fixée aux sites récepteurs  $\{M-X-cell\}$  est faible comparée à l'activité du métal en solution  $[M]$ .

La principale modification réside donc dans le fait que dans un cas (FIAM) on suppose que l'activité des sites libres à la surface des cellules  $\{X-cell\}$  reste constante dans l'intervalle de la réponse biologique, c'est à dire que l'on fait l'hypothèse (hypothèse 5 du FIAM) que  $\{X-cell\}$  est indépendante de BR et que dans l'autre cas (BRT)  $\{X-cell\}$  doit nécessairement diminuer lorsque que la réponse biologique augmente et l'on atteint le niveau maximal de la BR ( $BR_{max}$ ) lorsque  $\{X-cell\}=0$  c'est à dire lorsque tous les sites sont associés à une espèce métallique. Néanmoins, et malgré cette contradiction, le FIAM s'est révélé apparemment correct dans un certain nombre d'études.

La suite d'hypothèses initialement posées dans le cas du FIAM modifié permet d'aboutir à diverses relations exposées ci-après :

- La loi d'action de masse permet d'écrire la relation suivante :  $\{X-cell\}_T = \{M-X-cell\} + \{X-cell\}$
- On obtient ainsi l'expression de l'activité du complexe formé entre les sites actifs de l'organisme (le « ligand biotique ») et l'espèce métallique considérée (Cf. Équation 2-10).

**Équation 2-10 : Expression de l'activité du complexe {ligand biotique / métal}**

$$\{M - X - cell\} = \frac{K_1 \{X - cell\}_T [M]}{1 + K_1 [M]} = \frac{\{X - cell\}_T [M]}{K_{-1} + [M]}$$

Avec  $K_{-1}$  la constante de dissociation du complexe {ligand biotique / espèce métallique}.

- si BR est directement proportionnelle à  $\{M-X-cell\}$  (hypothèse 3 du BRT) alors :

**Équation 2-11 : Relation entre la réponse biologique et la concentration en métal**

$$BR = \frac{BR_{max} [M]}{K_{-1} + [M]}$$

Diverses études ont montré que la réponse biologique maximale ( $BR_{max}$ ) était mesurée alors que la totalité des sites récepteurs n'était pas encore occupée. De plus, la fraction de sites occupés à la  $BR_{max}$  semble dépendre du métal considéré. C'est pourquoi, de la même façon que  $\{M-X-cell\}$  est relié à  $[M]$ , on relie la réponse biologique (BR) à  $\{M-X-cell\}$ . On obtient alors la relation :

**Équation 2-12 : Relation entre la réponse biologique et l'activité du complexe {ligand biotique / métal}**

$$BR = \frac{BR_{max} \{M - X - cell\}}{K_E + \{M - X - cell\}} = \frac{BR_{max} \{X - cell\}_T [M]}{K_E K_{-1} + (\{X - cell\}_T + K_E) [M]}$$

Avec  $K_E$  la concentration en complexes (métal) / (ligand biotique) qui entraîne 50% de la réponse biologique maximale. De manière à mieux affiner l'allure des courbes dose / réponse générées par cette équation, l'équation précédente est transformée de la façon suivante :

**Équation 2-13 : Généralisation de la relation entre la réponse biologique et l'activité du complexe {ligand biotique / métal} à différentes allures de courbes dose / réponse**

$$BR = \frac{BR_{max} \{M - X - cell\}^n}{K_E^n + \{M - X - cell\}^n} = \frac{BR_{max} \{X - cell\}_T^n [M]^n}{K_E^n (K_{-1} + [M])^n + \{X - cell\}_T^n [M]^n}$$

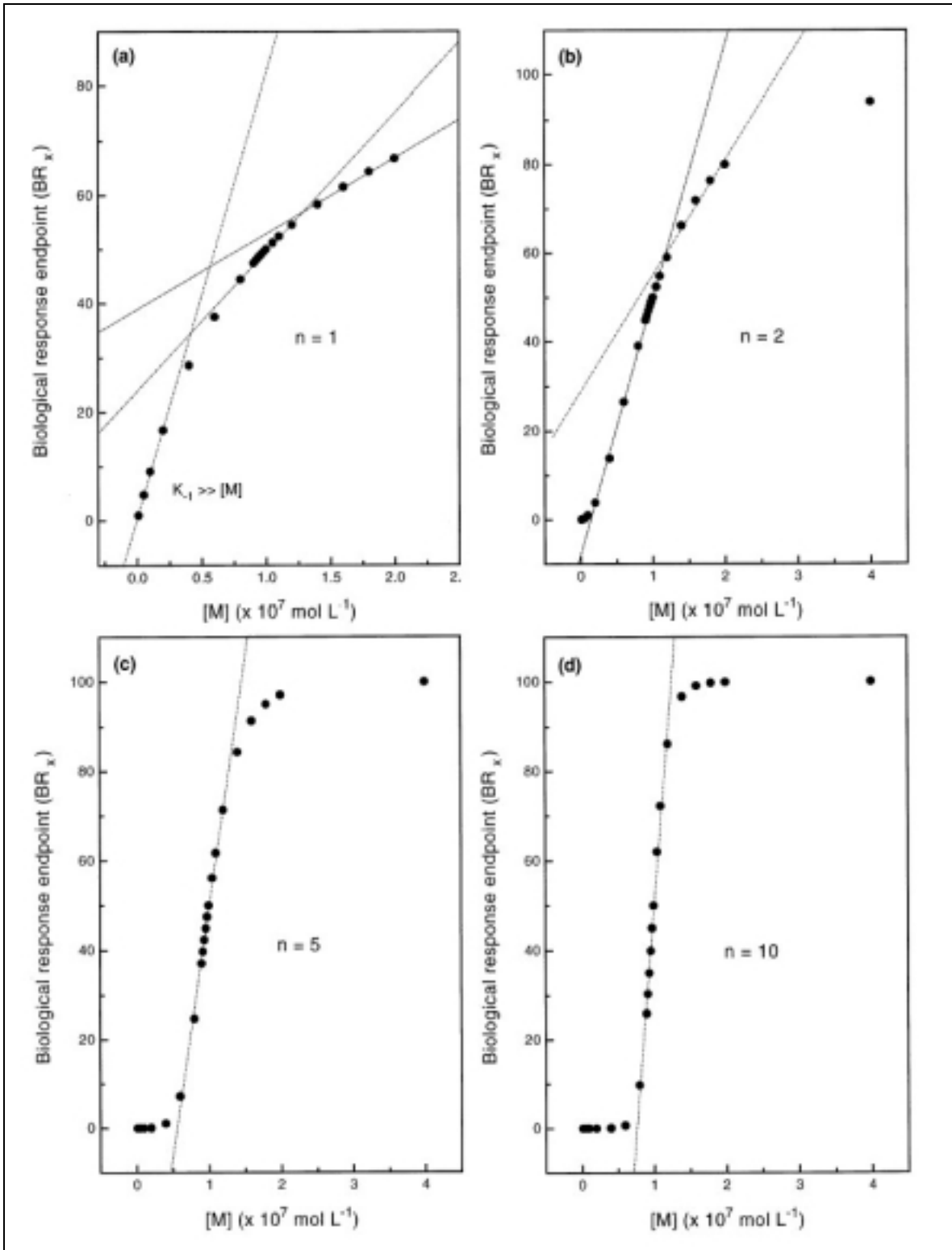


Figure 2-5 : Aspect de différentes courbes dose-réponse théoriques, avec différentes valeurs de pente (avec  $n$  la valeur de la pente de la courbe dose-réponse)

La Figure 2-5 nous indique, outre l'allure des courbes dose-réponse théoriques, l'existence de zones linéaires pouvant servir à leur approximation. Ces zones linéaires peuvent être décrites, moyennant certaines transformations, par les équations suivantes.



- On pose les égalités suivantes :

$$\{M - X - cell\} = \frac{\chi_1}{1 - \chi_1} K_E \text{ et } [M] = \frac{\chi_2}{1 - \chi_2} K_{-1}$$

Où  $\chi_1$  et  $\chi_2$  sont, respectivement, la fraction de la réponse biologique maximale ( $BR_{max}$ ) induite par  $\{M-X-cell\}$ , c'est à dire  $BR_{100\chi_1}$ , et la fraction du nombre de sites récepteurs en surface du ligand biotique devant être complexée pour induire une réponse biologique égale à  $BR_{100\chi_1}$ .

- On en déduit les deux relations suivantes :

**Équation 2-14 : Expression de la réponse biologique au niveau  $\chi_1$**

$$BR_{100\chi_1} = (BR_{max} / K_E)(1 - \chi_1)\{M - X - cell\}$$

**Équation 2-15 : Expression de l'activité du complexe {ligand biotique / métal}**

$$\{M - X - cell\} = (1 - \chi_2)K_1\{X - cell\}_T[M]$$

- Enfin, il en ressort que chaque portion de la courbe dose / réponse (de pente  $n=1$ ) pouvant être approximée de façon linéaire est définie par une équation du type :

**Équation 2-16 : Linéarisation de la réponse biologique en fonction de la concentration en métal**

$$BR = a + bK_1\{X - cell\}_T[M]$$

Avec  $a$  et  $bK_1\{X-cell\}_T$ , l'ordonnée à l'origine et la pente de la droite, respectivement.

Dans le cas d'une pente plus forte pour la courbe dose / réponse, on a :

**Équation 2-17 : Extension de la linéarisation de la réponse biologique en fonction de la concentration en métal en fonction de l'allure de la courbe dose / réponse**

$$\{M - X - cell\} = \left(\frac{\chi_1}{1 - \chi_1}\right)^{1/n} K_E$$

**Équation 2-18 : Expression de la réponse biologique au niveau  $\chi_1$  en fonction de l'allure de la courbe dose / réponse**

$$BR_{100\chi_1} = (BR_{max} / K_E)\chi_1^{(n-1)/n}[(1 - \chi_1)^{1/n}]\{M - X - cell\}$$

Dans ce cas, la valeur de la pente de la droite est dépendante de  $n$  (valeur de la pente définissant la courbe dose / réponse). L'Équation 2-16, issue du modèle FIAM modifié par la BRT, montre bien que, pour une région linéaire de la courbe dose / réponse, la réponse biologique est directement proportionnelle à l'activité de l'espèce métallique  $[M]$ . Nous avons ainsi vu précédemment que si l'ion métallique libre se fixe aux récepteurs des cellules, la réponse biologique sera proportionnelle à sa concentration. Mais si un complexe métallique se lie également à la surface des cellules, alors la réponse biologique sera non seulement fonction de la concentration en ion libre mais aussi de celle du complexe métallique.

▼ Le FIAM, dans cette version modifiée, permet donc de lier une réponse biologique, non plus à l'activité de l'ion métallique libre mais à l'activité (Cf. note 17, page 32) des complexes formés entre le métal et les récepteurs de l'organisme (ou ligands biotiques). Cette méthode se rapproche donc de celle des *Biotic Ligand Models*.

2.3.5.3. GSIM

Le modèle GSIM (*Gill Surface Interaction Model*) a été développé par Pagenkopf, 1983 de manière à expliquer les variations de la toxicité des métaux traces observées chez les poissons pour différentes valeurs d'alcalinité, de dureté et de pH. Ce modèle prend en compte non seulement la spéciation chimique des métaux mais aussi les interactions à la surface des branchies et les phénomènes de compétition entre ligands. Des données sur le cuivre, le cadmium, le plomb et le zinc ont été utilisées pour l'élaboration de ce modèle. Les hypothèses servant de base au modèle sont les suivantes :

1. L'action toxique aiguë des métaux traces chez les poissons a lieu au niveau des branchies. Les métaux provoquent, à certaines concentrations, la mort des poissons par atteinte de leur système de respiration.
2. Certaines formes chimiques des métaux traces sont plus toxiques que d'autres<sup>20</sup>.
3. La surface des branchies a la capacité de former des complexes avec les espèces métalliques et les protons présents dans le milieu.
4. Les cinétiques d'échange entre le métal et la surface des branchies sont rapides et l'on atteint l'équilibre chimique lors de tests écotoxicologiques.
5. La surface des branchies possède un nombre donné de sites de complexation par unité de masse.
6. Des phénomènes de compétition interviennent entre les ions responsables de la dureté de l'eau, les métaux traces et les protons.

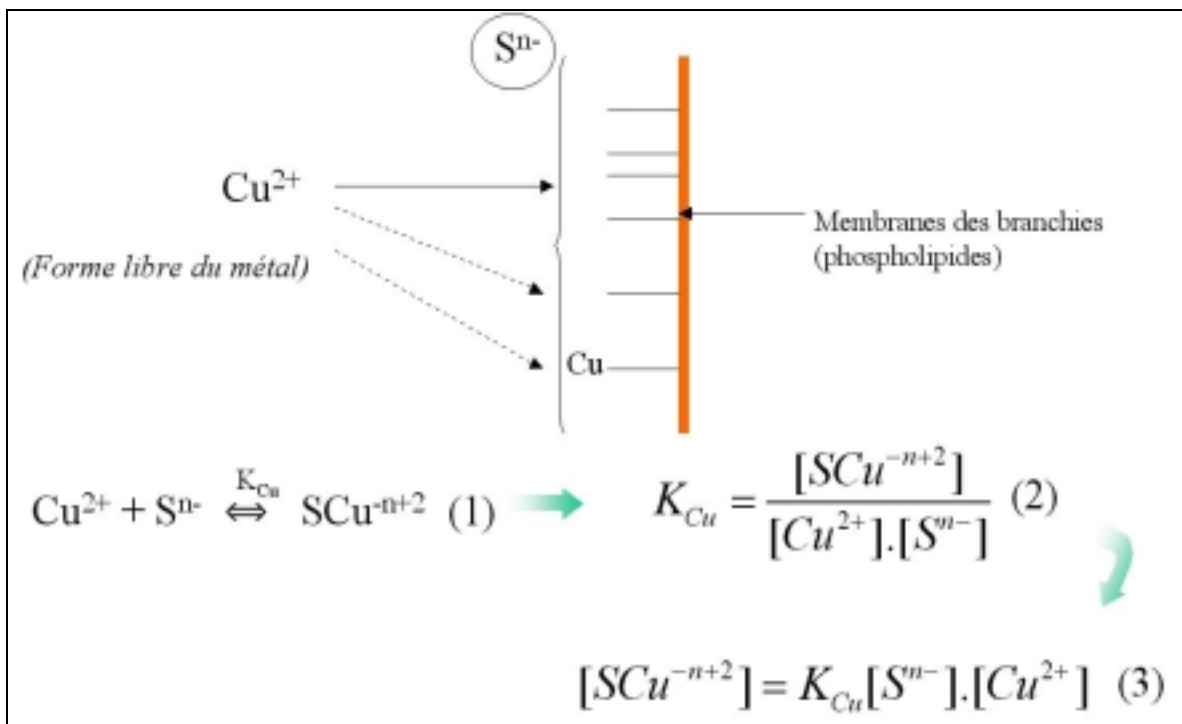


Figure 2-6 : Réaction de complexation métal / ligand biotique (membranes des branchies)

<sup>20</sup> Les espèces métalliques adsorbées par les matières en suspension sont considérées comme non toxiques.

La Figure 2-6 nous présente la réaction prise en compte pour expliquer l'interaction entre les métaux traces en solution<sup>21</sup> et la surface des branchies. Cette surface correspond à une couche de phospholipides chargée négativement ( $S^{n-}$ ). La surface des branchies offre ainsi des sites de fixation pour les espèces cationiques présentes dans le milieu.

La plupart des études écotoxicologiques montre une action protectrice des cations responsables de la dureté de l'eau (voir point 3.2.1.1). Le modèle GSIM prend en compte cette inhibition de la toxicité des métaux comme une compétition entre les espèces ioniques et les espèces toxiques.

Ce type de modèles, développé à partir de résultats de tests de toxicité aiguë n'est applicable que dans des conditions où les concentrations en métal dans le milieu laissent présager l'occurrence de tels effets. Les données requises pour le fonctionnement du modèle sont le pH, l'alcalinité, la dureté ainsi que la concentration en métal présente.

#### 2.3.5.4. Limites des modèles

Dans la grande majorité des expériences conduites en laboratoire, la validité des prédictions réalisées par des modèles de type « FIAM » a été montrée. Cependant, certaines expériences mettant en œuvre des conditions souvent plus proches de la réalité environnementale ont révélé les limites de ce type de modèles. Quelques expériences pour lesquelles le modèle FIAM n'a pas donné de résultat satisfaisant sont développées ci-après :

**Test 1 :** Slaveykova *et al.*, 2003 ont testé le rôle des acides fulviques (de type « Rivière Suwannee ») sur la bioaccumulation du plomb par une algue d'eau douce, *Chlorella kesslerii*. Le principal objectif était de vérifier l'applicabilité des modèles de type FIAM (Cf. point 2.3.5.1) et BLM (Cf. point 3) au cas étudié. Autrement dit, il s'agit de vérifier la relation entre les différentes formes de plomb dans l'eau ( $\{Pb^{2+}\}$  en ce qui concerne le FIAM) et les quantités intégrées par des phénomènes biologiques d'accumulation. Dans un premier temps, en présence de « petits » ligands synthétiques, il a été montré, en accord avec le FIAM, que l'accumulation de Pb par l'algue verte unicellulaire était directement proportionnelle à la concentration en ions  $Pb^{2+}$  libres. Cependant, en présence d'acides fulviques (SRFA<sup>22</sup>), d'importantes différences entre la bioaccumulation du Pb mesurée et celle prédite par l'activité de l'ion libre ont été observées.

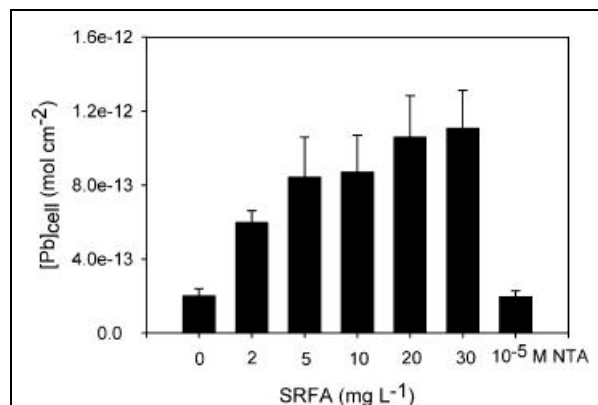


Figure 2-7 : Concentrations en Pb dans les cellules de l'algue *Chlorella kesslerii*, à pH 6, après 50 min, lors d'une exposition au plomb libre  $Pb^{2+}$  constante (pour des concentrations croissantes en Pb total et en acides fulviques (SRFA)). D'après Slaveykova *et al.*, 2003.

<sup>21</sup> Ici  $Cu^{2+}$  mais le GSIM tient aussi compte des autres formes chimiques des métaux traces dont l'action toxique pour les organismes vivants a été montrée. Pour le cuivre cela inclus  $CuOH^+$ ,  $Cu(OH)_2$ ,<sub>aq</sub> et  $Cu_2OH_2^{2+}$ .

<sup>22</sup> *Suwannee River Fulvic Acid*

Les concentrations en plomb total et en acides fulviques ont été augmentées en parallèle de manière à conserver une concentration en  $Pb^{2+}$  libre constante. Dans ces conditions, le modèle FIAM prédit une concentration cellulaire en Pb constante. Contrairement à cette prévision, la Figure 2-7 montre une augmentation de la concentration en Pb à l'intérieur des cellules.

**Test 2 :** Dans l'étude menée par Errecalde *et al.*, 1998, la toxicité de deux métaux (zinc et cadmium) vis-à-vis de l'algue verte *Selenastrum capricornutum* a été testée en l'absence et en présence de différents ligands dont le citrate, ligand de faible poids moléculaire. Il a été montré que la toxicité du cadmium et du zinc était renforcée en présence de citrate, tout autre paramètre (pH, dureté, ligands inorganiques) maintenus constants par ailleurs. Des mesures ont également montré que l'accumulation du cadmium et du zinc était augmentée en présence de ce ligand. De plus, une accumulation du citrate a été mesurée. La membrane des algues semble donc reconnaître le citrate comme un métabolite de faible masse molaire. Il est connu que les membranes cellulaires des algues sont perméables à des métabolites de faible poids moléculaire comme les acides aminés et que le transport à travers la membrane plasmique se fait grâce à des acides aminés (transporteurs). Différents systèmes de transport membranaire spécifiques ont par exemple été mis en évidence, pour le citrate, chez des procaryotes. Dans au moins un cas, l'internalisation du citrate était dépendante de la présence de cations divalents et le complexe formé entre le métal et le citrate a été identifié comme étant le composé dissous transporté à travers la membrane des cellules.

Ce dernier exemple montre donc que la toxicité d'un métal vis-à-vis d'un organisme n'est pas seulement fonction de la concentration de l'ion métallique libre ( $M^{n+}$ ). D'autres formes chimiques peuvent ainsi être à l'origine d'une réponse biologique. Il avait déjà été montré que certains complexes formés entre le métal et des ligands lipophiles pouvaient traverser des membranes biologiques sans qu'une dissociation préalable n'intervienne. Dans l'exemple du test 2, il a été montré qu'un complexe entre un métal et un ligand hydrophile biogène présentait des capacités similaires.

**Test 3 :** Borgmann et Ralph, 1983 se sont intéressés à la toxicité du cuivre envers *Daphnia magna* et *Poecilia reticulata* (guppy). Les tests d'écotoxicité ont été conduits avec et sans ajout de ligands organiques ( $\beta$ -alanine, glycine, acide glutamique, Tris). Une grande variation des concentrations en cuivre libre ( $Cu^{2+}$ ) a été observée dans des milieux d'essai induisant pourtant une même toxicité sur les daphnies. Ce résultat est donc en contradiction avec la théorie du FIAM. Une certaine toxicité des complexes entre les acides aminés et le cuivre a donc été observée même si elle était moins importante que celle engendrée par le cuivre libre. De plus, il a été observé que les complexes acides aminés / cuivre engendraient une plus faible toxicité pour les guppy que pour les daphnies. Cela indique donc une différence de sensibilité aux complexes du cuivre selon les espèces.

▼	D'importantes questions se posent au sujet des capacités de prédiction et du réalisme environnemental de modèles simplifiés tels que le FIAM pour la détermination de la biodisponibilité des métaux dans des conditions naturelles. Des études supplémentaires sont donc souhaitables avant l'utilisation de tels modèles dans un cadre réglementaire.
---	---

### 3. Le BLM : un modèle intégré

#### 3.1. Une approche conceptuelle

Les BLM représentent la synthèse d'un grand nombre de concepts issus de disciplines scientifiques variées (chimie, physiologie, écotoxicologie) et explorés depuis un certain nombre d'années pour certains.

Le BLM est un modèle permettant d'estimer la toxicité aiguë<sup>23</sup> des métaux vis-à-vis des organismes aquatiques. L'hypothèse principale sur laquelle il repose est qu'une mortalité est observée quand le complexe formé entre le métal et le ligand biotique (les branchies par exemple) atteint une concentration critique, c'est-à-dire qu'une certaine accumulation de métal sur une zone précise d'un organisme est létale. Le ligand biotique se définit ainsi comme le site d'action de la toxicité pour un organisme (voir point 2.3). Le BLM prend en compte la liaison du métal au ligand biotique (accumulation) et la relation entre l'accumulation et la réponse toxicologique.

L'un des principes fondamentaux du BLM est que le milieu est à l'équilibre. Cela permet ainsi l'utilisation de constantes thermodynamiques. En effet, pour l'instant, seule la thermodynamique est prise en compte. L'effet de la cinétique pourrait avoir son importance lors de faibles expositions aux métaux. La diffusion du métal à partir de l'eau pourrait être alors l'étape limitante (Campbell *et al.*, 2002). Ainsi, certains métaux atteignent l'équilibre thermodynamique lentement ( $\text{Ni}^{2+}$ ,  $\text{Al}^{3+}$ ,  $\text{Co}^{3+}$ ,  $\text{Cr}^{3+}$ ) – Ma *et al.*, 1999. Il conviendrait alors d'utiliser la modélisation de situations hors équilibre.

Le BLM permet, outre l'évaluation de la toxicité de l'ion libre (espèce la plus toxique), l'évaluation de celle des autres espèces métalliques en équilibre (hydroxydes, chlorures), de la même manière que le FIAM (Morel, 1983). Le calcul de la complexation des ions métalliques par des ligands inorganiques se fait au moyen de modèles de spéciation géochimique (e. g. CHESS (Santore et Driscoll, 1995) ou MINEQL+ (Schecher et McAvoy, 1998)) avec des constantes de stabilité provenant de différentes bases de données. En ce qui concerne la complexation avec la matière organique, la difficulté est plus grande du fait de la variabilité rencontrée dans la nature. Di Toro *et al.*, 2001 se basent sur les équilibres chimiques de CHESS mais des modèles proches tels que les modèles V et VI du WHAM Tipping, 1994 sont de plus en plus employés. On peut aussi, comme McGeer *et al.*, 2000 intégrer, à un logiciel de spéciation chimique inorganique (e. g. MINEQL+) un module permettant de prendre en charge la partie organique de la complexation.

Le BLM est donc un assemblage de divers éléments de modélisation développés, entre autres, à partir de tests écotoxicologiques (Cf. lien entre la complexation du métal au ligand biotique et la réponse biologique).

---

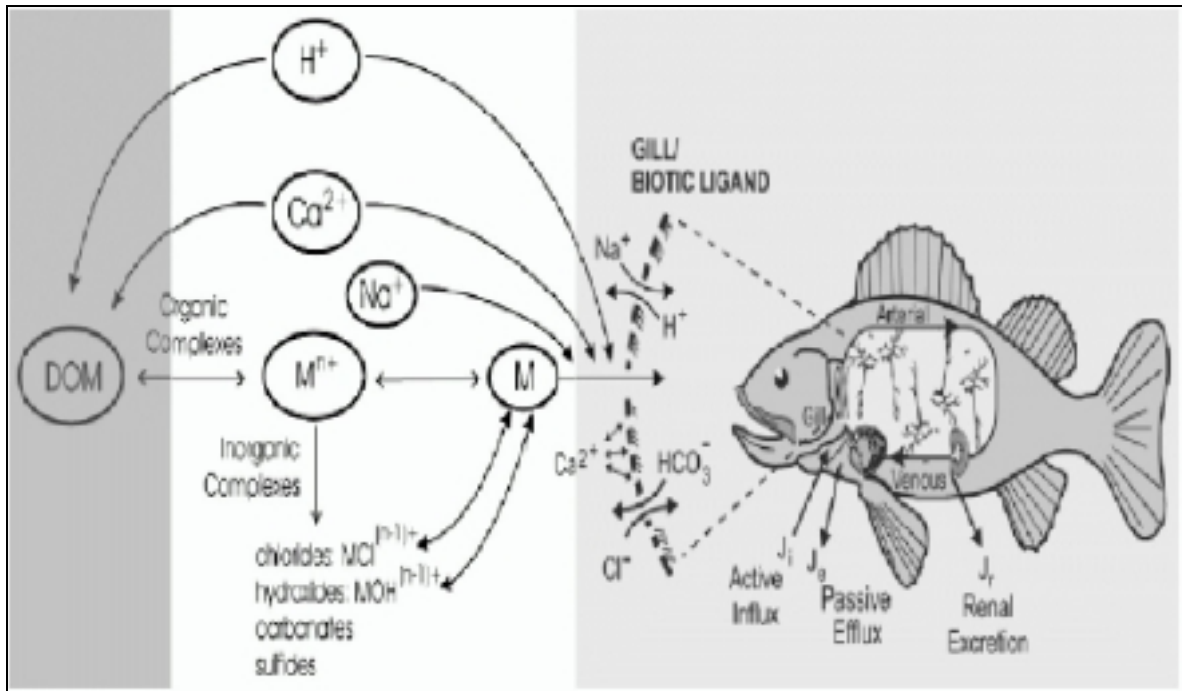
<sup>23</sup> Les résultats de différents travaux visant à mettre au point des BLM-chroniques (essais long terme, critères d'effets autres que la mortalité) sont actuellement en cours de publication.

### 3.2. Les interactions prises en compte

Les modèles de type BLM permettent de décrire et de quantifier la biodisponibilité des métaux. Ils permettent d'estimer la toxicité du métal en prenant en compte :

- la complexation avec les ligands inorganiques,
- la complexation avec les ligands organiques,
- la complexation avec le ligand biotique.

Ces interactions peuvent être schématisées (voir Figure 3-1).



**Figure 3-1 : Schématisation du fonctionnement du BLM**

Les bases techniques décrites respectivement au cours des points 2.1, 2.2 et 2.3 viendront en appui à la compréhension des paragraphes suivants où l'influence, sur la toxicité pour les organismes vivants, des différentes interactions faisant intervenir les métaux sera détaillée.

#### 3.2.1. Influence des ions compétiteurs sur la toxicité des métaux

##### 3.2.1.1. Dureté de l'eau ( $Ca^{2+}$ , $Mg^{2+}$ )

###### 3.2.1.1.1 Généralités

La dureté de l'eau dépend principalement de la présence en ions calcium et magnésium. La présence d'autres constituants, comme le fer, le manganèse ou l'aluminium peuvent apporter une contribution à la dureté totale mais leur concentration n'est généralement pas très importante. La dureté s'exprime normalement en équivalent de carbonate de calcium ( $CaCO_3$ ), mais aussi en degrés hydrotimétriques français ( $^{\circ}H$  ou  $^{\circ}f$ ). Un degré français équivaut à 10 mg/l de  $CaCO_3$ . Il existe aussi des degrés allemands ( $1^{\circ}f = 0.56^{\circ}$  allemand) et des degrés anglais ( $1^{\circ}f = 0.70^{\circ}$  anglais).

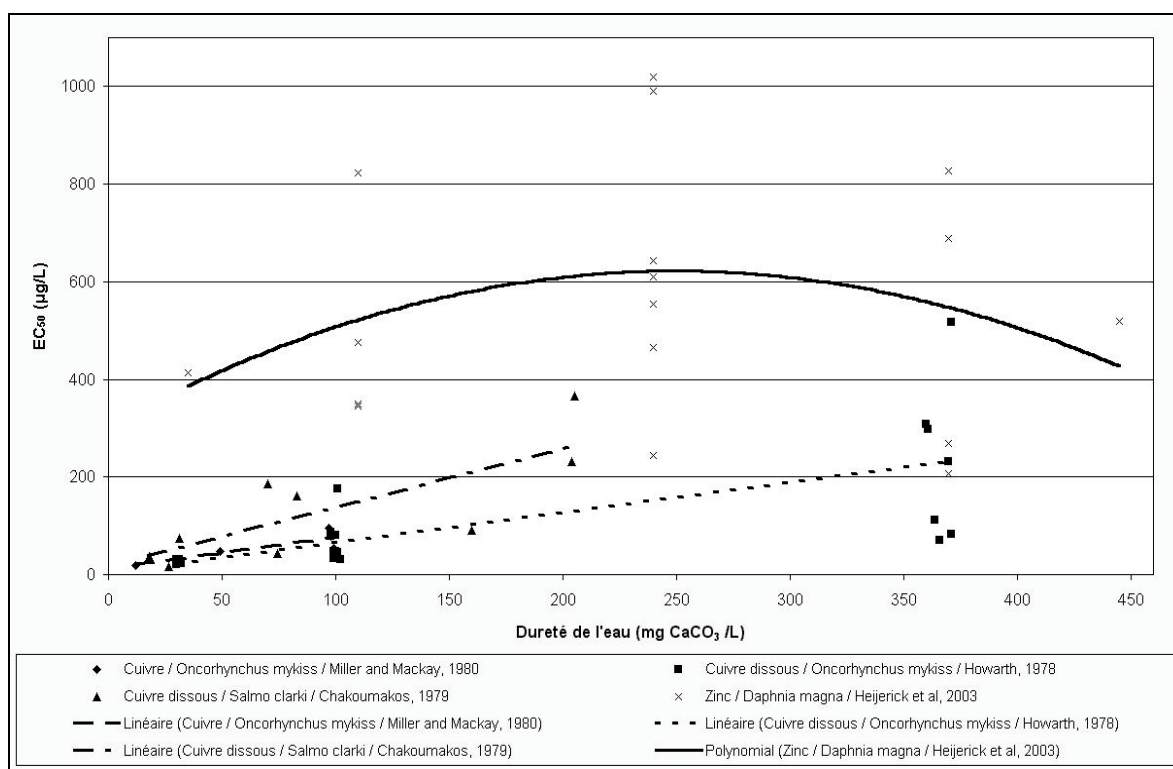
**Tableau 3-1 : Qualification des eaux en fonction de leur dureté**

Dureté en mg/l CaCO <sub>3</sub>	Qualification de l'eau
0-30	très douce
31-60	douce
61-120	moyennement douce
121-180	dure
> 180	très dure

La dureté de l'eau dépend essentiellement du contexte géologique. Les eaux des régions calcaires sont dures, celles des régions granitiques sont douces.

3.2.1.1.2 Influence de la dureté de l'eau sur la toxicité des métaux

Différentes études ont montré que l'augmentation de la dureté de l'eau diminuait la mortalité des poissons exposés au cuivre (Chakoumakos *et al.*, 1979 ; Howarth et Sprague, 1978 ; Miller et Mackay, 1980 ; Heijerick *et al.*, 2003 ; Rathore et Khangarot, 2003).



**Figure 3-2 : Influence de la dureté de l'eau<sup>24</sup> sur la toxicité des métaux envers les organismes vivants**

La Figure 3-2, réalisée à partir des données de la littérature, montre une diminution de la toxicité en fonction de la dureté de l'eau pour les poissons (*Oncorhynchus mykiss* et *Salmo clarki*). Des relations similaires ont également été mises en évidence pour les algues (Heijerick *et al.*, 2002a). En ce qui concerne les daphnies, une baisse de la toxicité en fonction de la dureté du milieu est également mise en évidence. Néanmoins, au-delà d'une dureté de 250 mg CaCO<sub>3</sub> /L, cette influence

<sup>24</sup> Les données ayant servies à la réalisation de ce graphique sont issue d'expériences au-cours desquelles la dureté des milieux d'essais est modifiée en même temps que d'autres paramètres physico-chimiques (pH ou COD principalement). Cependant, les courbes de tendance affichées rendent bien compte de l'influence de la dureté de l'eau.

n'est plus visible. Au contraire, de fortes valeurs de dureté ont un effet délétère sur les populations de daphnies. Les mécanismes physiologiques impliqués dans ce phénomène ne sont pas connus.

Si la dureté de l'eau n'affecte pas la spéciation chimique des métaux en revanche son effet protecteur de la toxicité des métaux sur certaines espèces trouve une explication physiologique. Plusieurs travaux ont montré que le calcium affectait la perméabilité des branchies des poissons et Pagenkopf, 1983 a suggéré que le calcium pouvait également jouer un rôle de compétiteurs pour les sites de fixation des métaux sur les branchies. Il existe ainsi une compétition entre les ions responsables de la dureté ( $\text{Ca}^{2+}$  et  $\text{Mg}^{2+}$ ) et les ions métalliques pour l'accès aux sites où la toxicité peut s'exercer. Playle *et al.*, 1992 ont montré que les ions métalliques entraînent en compétition avec les autres ions sur un nombre limité de sites des branchies de poissons. Cette compétition entre ions affecte le degré d'accumulation du métal sur les branchies. Ce résultat reflète non seulement la compétition entre les ions environnants mais aussi le degré de complexation du métal dans le milieu.

### 3.2.1.1.3 Ratio Ca : Mg

Il est communément accepté que la dureté de l'eau affecte la toxicité des métaux (voir ci-dessus). Cependant les ions majeurs responsables de la dureté ( $\text{Ca}^{2+}$  et  $\text{Mg}^{2+}$ ) peuvent agir différemment sur la toxicité causée par les métaux.

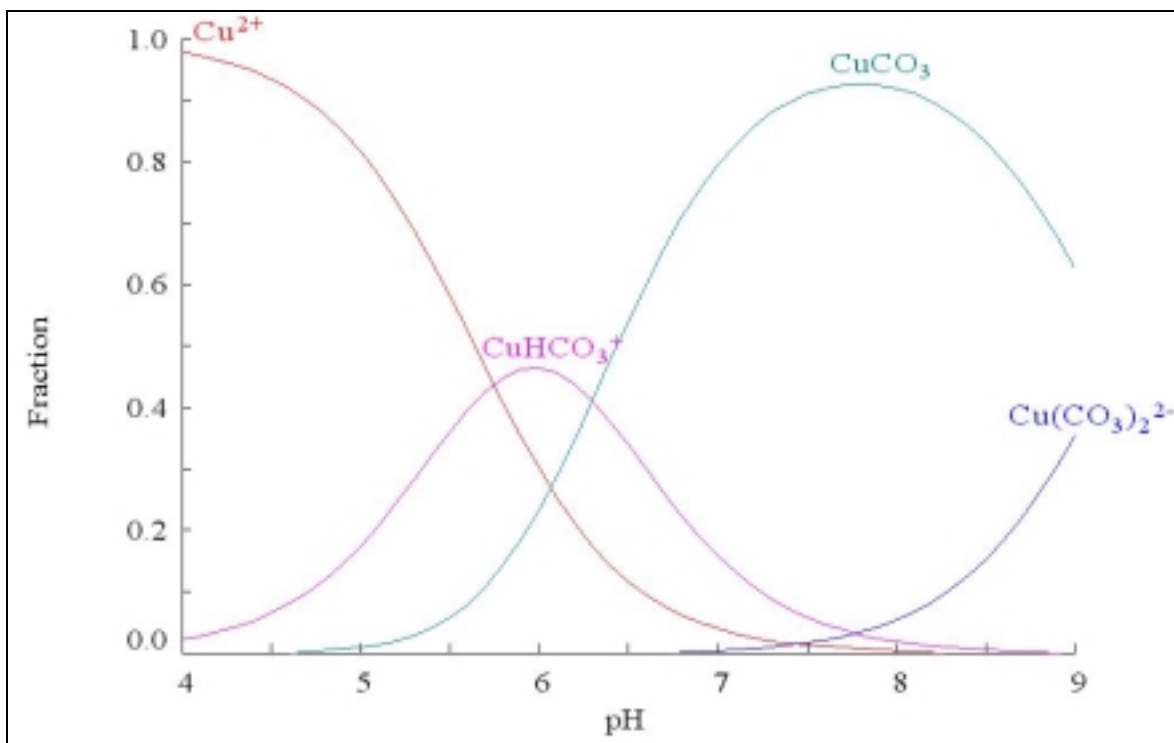
Cinq espèces aquatiques ont été testées en présence de cuivre et à des ratios calcium / magnésium différents, tout autre paramètre (DOC, dureté totale, alcalinité, pH, etc.) environ constant par ailleurs (Naddy *et al.*, 2002). Les résultats montrent que les concentrations létales médianes pour *Oncorhynchus mykiss* diminuent avec le rapport Ca : Mg, pour tous les tests conduits. Le calcium a donc une plus grande influence sur la toxicité du cuivre que le magnésium, pour cette espèce. De la même façon, après 96h, des individus appartenant à l'espèce *Pimephales promelas*, âgés de moins de 24 heures en début de test ont montré une plus forte sensibilité au cuivre dans un milieu contenant autant de calcium que de magnésium comparé à un autre milieu caractérisé par un rapport Ca : Mg égal à 3:1, pour des alcalinité et dureté constantes. Dans le cas de *Ceriodaphnia dubia* ou de *Gammarus*, la toxicité du cuivre n'a pas été affectée par les changements dans les rapports Ca : Mg. En ce qui concerne *Daphnia magna*, l'évolution de la sensibilité au cuivre selon le rapport Ca : Mg va en sens inverse de ce qui a été observé avec *Oncorhynchus mykiss*. Pour une dureté de 180 mg/L, les individus testés dans un milieu contenant plus de calcium que de magnésium (4:0) ont montré une plus grande sensibilité que ceux dont le milieu d'exposition affichait un rapport 1:1 entre le calcium et le magnésium. Cette différence de sensibilité au cuivre n'a pas été observée à des concentrations totales de calcium et de magnésium plus faibles (dureté de 90 mg/L).

$\text{Ca}^{2+}$  apparaît donc comme un meilleur inhibiteur de la toxicité du cuivre vis-à-vis d'*Oncorhynchus mykiss* ou de *Pimephales promelas* (âgé de moins de 24h) que  $\text{Mg}^{2+}$ . L'explication viendrait du fait que la compétition des ions calcium empêcherait les ions cuivriques ( $\text{Cu}^{2+}$ ) d'atteindre les canaux à  $\text{Na}^+$  au niveau des branchies (mode d'action toxique du cuivre). Ainsi à de fortes concentrations en calcium, la perméabilité des branchies diminue.



### 3.2.1.2. pH (ions $H^+$ , $OH^-$ )

L'influence du pH sur les concentrations dissoutes des formes cationiques des métaux lourds dans les rivières a été démontrée (pour le zinc voir Bourg *et al.*, 2000). Le pH agit en effet très fortement sur la spéciation des métaux dans l'eau, c'est à dire sur les proportions de leurs différentes formes chimiques.



**Figure 3-3 : Distribution de certaines espèces inorganiques du cuivre en fonction du pH**

La Figure 3-3 nous montre un exemple de la spéciation chimique du cuivre, en fonction du pH (les principales espèces sont représentées). Ce graphique a été obtenu à partir d'un logiciel de calcul de spéciation chimique (Hydra / Medusa : Puigdomenech, 2002). On peut observer une diminution de la fraction de cuivre libre ( $Cu^{2+}$ ) lors d'une augmentation de pH. A des pH compris entre 6 et 7, le carbonate de cuivre ( $CuCO_3$ ) devient l'espèce majoritaire.  $Cu^{2+}$  est considéré comme l'espèce chimique la plus toxique. C'est pourquoi on observe souvent une diminution de la toxicité du cuivre avec l'augmentation du pH.

L'influence du pH sur la toxicité du cuivre vis-à-vis de *Daphnia magna* a également été mise en évidence par De Schamphelaere et Janssen, 2002a. Dans la gamme de pH testée (5.98-7.92), les  $EC_{50}$  observées après 48h varient de 88 à 820 nM pour le cuivre dissous et de 17 à 33 nM pour le cuivre libre mesuré au moyen d'une électrode sélective (ISE<sup>25</sup>, Cf. Monbet et Coquery, 2003). Une partie des variations de la toxicité peut ainsi être attribuée à des différences de spéciation quand le pH varie. On peut cependant noter que Lauren et McDonald, 1986 ont conclu que le pH n'affectait pas la mortalité à court terme d'*Oncorhynchus mykiss* exposée au cuivre.

D'après Erickson *et al.*, 1996, une diminution de la toxicité du cuivre est observée pour *Pimephales promelas*. Cette diminution est de l'ordre d'un facteur trois par unité de pH supplémentaire (pH 6.5 et 7.4) et semble diminuer aux plus forts pH (entre 7.4 et 8.1). Au-delà d'un pH de 8.1 (entre 8.1 et 8.8), on observe une nouvelle baisse des  $LC_{50-96h}$  (augmentation de la toxicité).

<sup>25</sup> Ion Specific Electrode

### 3.2.1.3. L'alcalinité (ions $\text{CO}_3^{2-}$ )

En ne variant que l'alcalinité<sup>26</sup>, la dureté, la concentration en ions sodium et le pH étant maintenus constants, Lauren et McDonald, 1986 ont montré qu'il s'agissait d'un paramètre majeur agissant sur la toxicité aiguë du cuivre vis-à-vis d'*Oconrhynchus mykiss*. L'effet réducteur de l'alcalinité sur la toxicité résulte de la réduction des effets du cuivre sur la fonction ionorégulatrice des branchies. L'alcalinité joue sur la forme chimique de l'élément toxique : un équilibre se crée entre les espèces considérées comme toxiques ( $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{CuOH}^+$ ,  $\text{CuOH}_2$ ) et les espèces peu ou non toxiques ( $\text{CuHCO}_3^+$ ,  $\text{CuCO}_3$ ,  $\text{Cu}(\text{CO}_3)_2^{2-}$ ) dont les concentrations sont proportionnelles à l'alcalinité. Cet effet extérieur modulateur de l'alcalinité sur la toxicité du cuivre envers *Oconrhynchus mykiss* agit rapidement : en moins de 24h dans l'expérience de Lauren et McDonald, 1986.

Erickson *et al.*, 1996 ont également observé une diminution de la toxicité du cuivre sur *Pimephales promelas* lors d'une augmentation de l'alcalinité. Ils ont également mis en évidence une plus grande influence de l'alcalinité sur la diminution de la toxicité du cuivre aux plus forts pH. Ce qui est en accord avec les calculs de spéciation (voir Figure 3-3).

### 3.2.1.4. Autres ions compétiteurs ( $\text{Na}^+$ , $\text{K}^+$ , $\text{S}^{2-}$ , $\text{Cl}^-$ )

D'autres ions sont impliqués dans les phénomènes de compétitions avec les métaux. C'est par exemple le cas de  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$  ou  $\text{Cl}^-$ . De schamphelaere *et al.*, 2003 ont ainsi remarqué un effet protecteur des ces ions sur la toxicité du zinc vis-à-vis d'*Oncorhynchus mykiss*, effet cependant moins marqué que pour d'autres ions tels que  $\text{Ca}^{2+}$  et  $\text{CO}_3^{2-}$ .

De récentes études ont montré l'importance de la prise en compte de la présence des sulfures ( $\text{S}^{2-}$ ), même dans les eaux fortement oxygénées, e. g. entre 0.62 et 570 nM de sulfures pour les rivières Bianchini et Bowles, 2002. Les modèles actuels de spéciation n'intègrent pas encore les sulfures en tant que ligands possibles pour les métaux. Par voie de conséquence, aucune version de BLM incluant cette possibilité n'a été publiée.

## 3.2.2. Influence de la matière organique sur la toxicité des métaux

L'effet de la matière organique sur la biodisponibilité des métaux est reconnu (Kim *et al.*, 1999). Une diminution de la toxicité des métaux a souvent été associée à la présence de matières organiques. En effet, ces ligands organiques réduisent les concentrations en ions métalliques libres (espèce majoritairement responsable de la toxicité des métaux) dans l'environnement aquatique. Ce sont ces premières observations d'une baisse de la toxicité associée à une baisse de la concentration en ions métalliques libres qui ont conduit à l'élaboration des FIAM (voir point 2.3.5.1).

Erickson *et al.*, 1996 ont observé une diminution de la toxicité du cuivre (exprimée en concentration de cuivre total) vis-à-vis de *Pimephales promelas* lors de l'augmentation de la concentration en COD (Carbone Organique Dissous). En effet, les complexes formés entre le cuivre et les ligands organiques sont considérés comme moins biodisponibles pour les organismes vivants. L'ajout de matières organiques à une concentration de 5 mg/L a entraîné, dans cette étude, une complexation du cuivre à 90% et une baisse de la toxicité d'un facteur 4. Ces résultats sont en accord avec ceux obtenus par Welsh *et al.*, 1993 sur des larves de la même espèce même si, dans cette dernière étude, l'effet de la matière organique sur la toxicité du cuivre était encore plus prononcée.

---

<sup>26</sup> L'alcalinité est définie comme la capacité quantitative des milieux aqueux à réagir avec les ions hydrogène (ISO 6107-2). L'alcalinité représente donc le pouvoir tampon d'une eau et est exprimée par le titre alcalimétrique complet (TAC). Pour une eau naturelle, elle traduit la somme des anions hydrogénocarbonates, carbonates et hydroxydes alcalins (Na) ou alcalino-terreux (Ca, Mg).

Certaines espèces métalliques ne sont pas susceptibles de réagir directement avec les sites à la surface des membranes cellulaires et sont ainsi considérées comme biologiquement inactives, c'est à dire non biodisponibles. On sait par exemple que les métaux associés aux colloïdes (Rich et Morel, 1990) ou ceux complexés à des ligands organiques forts (Anderson et Morel, 1982) font partie de ces espèces.

### 3.2.3. Accumulation du métal au niveau du ligand biotique et toxicité

Les branchies des poissons sont considérées comme les organes critiques lors d'exposition à des concentrations toxiques de cuivre. En effet, leur importante surface de contact avec le milieu extérieur, pour assurer les fonctions respiratoires, ainsi que la faible distance entre les milieux interne (organisme) et externe (eau environnante), en font la cible privilégiée des tous les polluants. La fixation des métaux présents dans les eaux au niveau des branchies des poissons est la cause de dysfonctionnement des fonctions respiratoire et ionorégulatrice de ce système. Le cuivre est de plus connu pour provoquer de graves dommages au niveau de la structure lamellaire des branchies. Des altérations des cellules à chlorure, chargées de l'osmorégulation, ainsi que des cellules pavimenteuses, des hyperplasies et des fusions lamellaires des lamelles secondaires ont été observées par Arellano *et al.*, 1999 sur une espèce marine, *Solea senegalensis*. Mazon *et al.*, 2002 ont obtenus des résultats similaires en exposant une espèce de poisson tropical vivant dans les eaux douces, *Prochilodus scrofa*. Là aussi, des dégénération cellulaires se traduisant par des nécroses<sup>27</sup> et des apoptoses<sup>28</sup> étaient intenses pour des concentrations en cuivre comprises entre 25 et 29 µg Cu/L (valeurs proches de la LC<sub>50</sub> pour cette espèce).

On peut distinguer deux types de réponses à l'action d'un toxique :

- Des réponses non spécifiques telles que l'élongation des lamelles épithéliales, les hyperplasies<sup>29</sup>, ou encore les fusions lamellaires. Ces réponses sont connues pour être induites par de nombreux irritants des tissus des branchies.
- Des effets délétères directs associés à une exposition des branchies à des métaux lourds. C'est le cas des hypertrophies cellulaires (notamment les cellules à chlorures), et des nécroses suivies par des ruptures de l'épithélium.

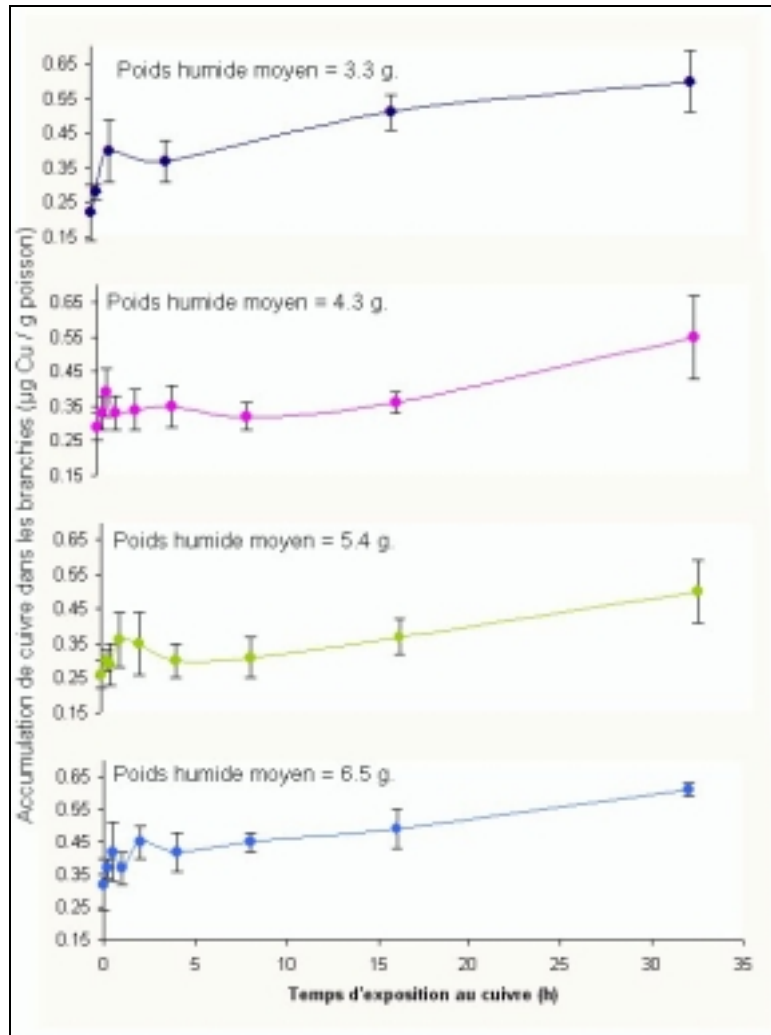
Les **cinétiques d'accumulation** du cuivre dans les branchies ont été étudiées pour différents gabarits de l'espèce *Lepomis gibbosus* (Anderson et Spear, 1980). Les courbes d'accumulation de cuivre dans les branchies en fonction du temps (Figure 3-4) peuvent être caractérisées par deux phases.

---

<sup>27</sup> Mort accidentelle des cellules causée par des facteurs extérieurs comme des dommages dus à des actions physiques ou chimiques (exposition à des substances toxiques).

<sup>28</sup> Mort cellulaire programmée physiologiquement par des facteurs internes comme les hormones, d'autres substances intra cellulaires ou des facteurs tissulaires. Cependant, des événements extérieurs à la cellule peuvent induire indirectement l'apoptose via l'action d'hormones.

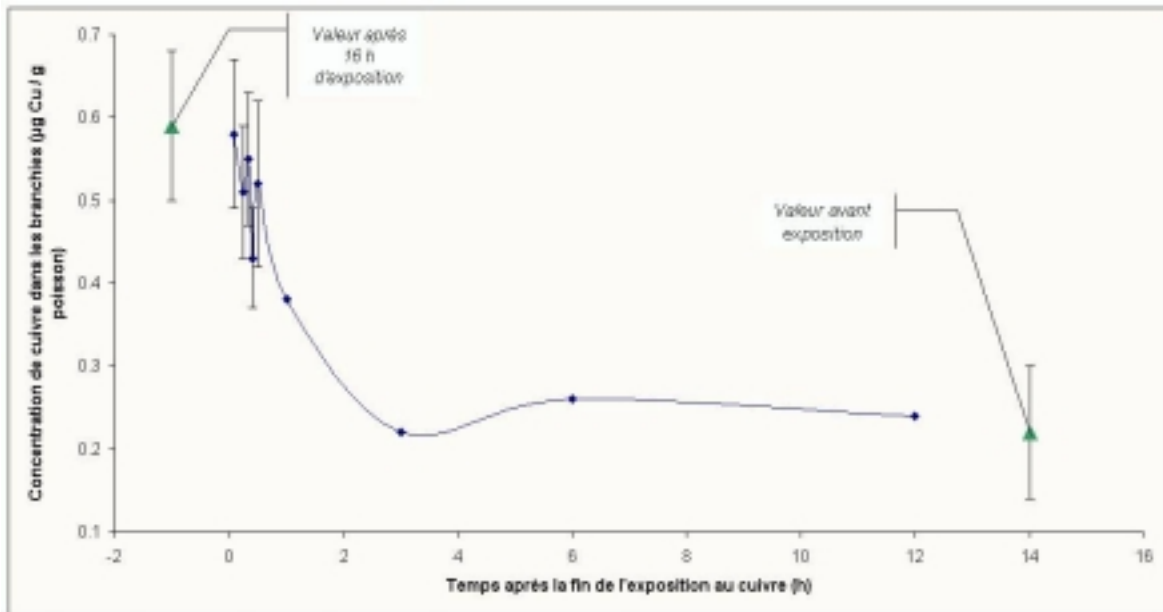
<sup>29</sup> Augmentation d'un tissu ou de cellules pour compenser une perte anormale ou en réaction à une agression.



**Figure 3-4 : Accumulation de cuivre dans les branchies de *Lepomis gibbosus* exposés à des concentrations proches des concentrations létales (d'après Anderson et Spear, 1980)**

Au cours de la première phase, le cuivre s'accumule rapidement. Une baisse temporaire des niveaux de contaminants précède la seconde phase d'augmentation moins rapide. En faisant l'hypothèse que l'accumulation est liée à l'activité des branchies, on peut alors imputer les changements dans les vitesses d'agglomération du cuivre à des modifications du système respiratoire que forment les branchies. Le déclin temporaire observé entre ces deux phases pourrait être attribué à un rejet de mucus, et du cuivre associé, au niveau des branchies. On peut également noter que les vitesses d'accumulation du cuivre dans les branchies sont inversement proportionnelles au poids des organismes étudiés. Il s'agirait d'un phénomène d'ordre allométrique : le nombre de sites potentiels de complexation pour le cuivre étant peut être lié à la surface totale des structures lamellaires des branchies, les « petits » poissons, possédant une surface respectivement plus importante que les « grands » poissons, auraient la capacité d'accumuler de plus grandes quantités de cuivre.

Anderson et Spear, 1980 ont également étudié la phase de détoxication suivant l'arrêt de la contamination en cuivre de *Lepomis gibbosus*. L'accumulation de cuivre lors d'expositions à des concentrations dépassant les seuils naturels est un phénomène complètement réversible dès lors que les concentrations en cuivre retrouvent leurs niveaux normaux. Au bout de trois heures, le retour aux concentrations mesurées avant l'exposition est atteint dans les branchies. Là encore, les vitesses d'élimination du cuivre excédentaire dépendent du poids de l'individu. Les cinétiques d'élimination étant inversement proportionnelles au poids.



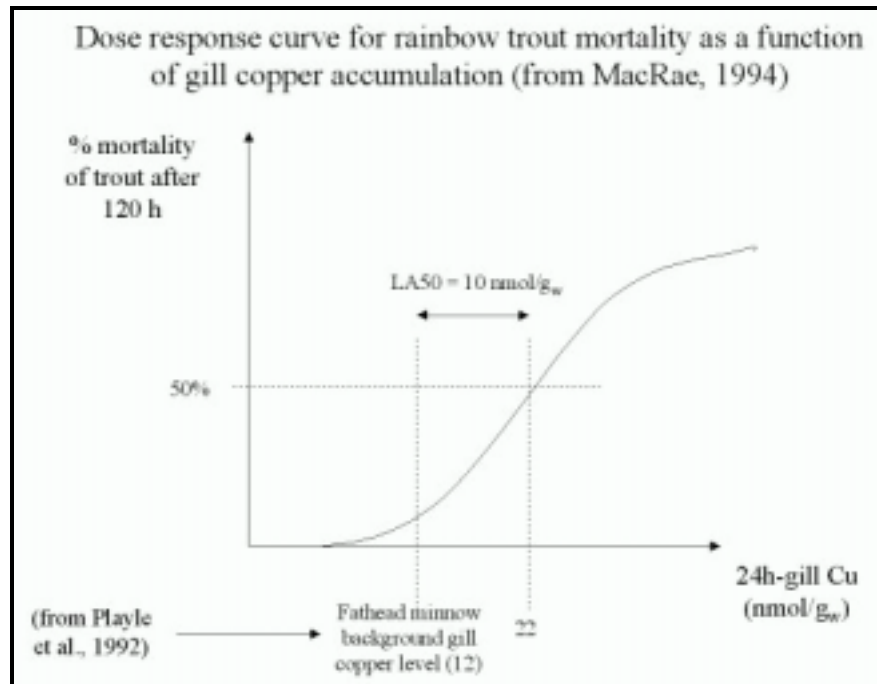
**Figure 3-5 : Détoxication des branchies de poissons ayant subis une exposition au cuivre (d'après Anderson et Spear, 1980)**

La demi-vie biologique du cuivre chez *Lepomis gibbosus* calculée d'après ces expériences varie de 1,6 à 4,8 h. en fonction du poids de l'individu.

Il apparaît donc que l'accumulation de cuivre dans les branchies est fonction du temps. Il a été par ailleurs montré qu'elle dépendait aussi des concentrations en cuivre présentes dans l'eau, bien que l'on suppose que le cuivre capté par les branchies soit d'abord partiellement transféré au plasma et distribué ensuite à l'ensemble de l'organisme via le réseau sanguin.

Le cuivre est présent dans les branchies essentiellement de façon intracellulaire mais aussi, partiellement sur les membranes plasmiques. Le cuivre s'accumule donc dans les cellules pavimenteuses, les cellules à chlorure, les cellules à mucus ainsi que dans la couche de base de l'épithélium des branchies.

Les hyperplasies dues aux hypertrophies des cellules pavimenteuses comme celles observées chez *Prochilodus scrofa* pourraient jouer un rôle de barrière empêchant la diffusion des espèces toxiques. Mais cet effet de l'exposition à un métal toxique (ici le cuivre) augmente aussi les distances pour les phénomènes de diffusion pour les échanges gazeux entre le sang et l'eau et réduit la distance entre les lamelles (donc réduction de la surface de contact) intervenant dans le captage de l'O<sub>2</sub> dans le processus de respiration. Tout ceci conduit à des situations hypoxiques pouvant conduire à la mort de l'organisme.



**Figure 3-6 : Représentation de la mortalité en fonction de l'accumulation de cuivre sur les branchies**

Démonstration est faite par (MacRae *et al.*, 1999), d'un lien entre la toxicité du cuivre et son accumulation dans les branchies (voir Figure 3-6). En effet, une accumulation constante correspondant à 50% de mortalité a été observée ( $LA_{50}$  = Lethal Accumulation) pour *Oncorhynchus mykiss*. Cette  $LA_{50}$  semble constante pour des caractéristiques physico-chimiques précises (Meyer, 1999). La  $LC_{50}$  est donc définie comme étant la concentration prédite de métal dissous requise pour obtenir une accumulation égale à la  $LA_{50}$  au bout de 24 h. Dans ce cas, la modélisation de la complexation du cuivre (ou d'autres métaux) au niveau des branchies permet l'évaluation de la toxicité d'une espèce métallique en fonction des différents paramètres régissant sa spéciation en milieu aqueux.

### 3.3. Un exemple : BLM-cuivre pour les daphnies

Nous avons vu précédemment que l'on considère que le ligand biotique se situe à la surface des branchies chez les poissons, et, plus précisément, au niveau des protéines constituant les canaux assurant la régulation des ions sodium et calcium dans le sang. En ce qui concerne les autres organismes, on émet l'hypothèse qu'un ligand biotique existe également et que la mortalité peut donc être modélisée d'une façon similaire. Nous allons ainsi détailler, pour exemple, les étapes de construction et de validation d'un BLM mis au point pour le cuivre, pour un invertébré (*Daphnia magna*).

#### 3.3.1. Construction d'un BLM-cuivre pour les daphnies (invertébrés)

Dans leur étude, De Schampelaere et Janssen, 2002a, présentent une méthodologie de construction d'un BLM pour les daphnies basée sur des résultats de tests de toxicité aiguë sur 48h. Le principe d'élaboration de ces tests consiste à ne faire varier qu'un paramètre au cours d'une série, les autres restant à de bas niveaux, les plus constants possibles. Cette série de tests permet de tester séparément les effets de Ca, Mg,  $SO_4$ , Cl, Na, K et du pH sur la toxicité du cuivre vis-à-vis de *Daphnia magna*. Des constantes d'affinité entre le ligand biotique et ces espèces chimiques peuvent ensuite être déterminée grâce à la résolution des équations mises au point dans le cadre du BLM.

La relation entre les concentrations létales en cuivre dans l'eau et les concentrations létales sur le ligand biotique (cuivre accumulé au niveau du ligand biotique) pour *Daphnia magna* était inconnue. Cette relation, connue pour *Oconrhynchus mykiss*, MacRae *et al.*, 1999, et partiellement vérifiée pour *Pimephales promelas*, est appliquée au cas de ces invertébrés. Cette étude permet le calcul de constantes spécifiques à *Daphnia magna*, basées exclusivement sur des résultats de tests de toxicité. Auparavant, l'hypothèse était faite que les constantes pour les poissons et les invertébrés étaient similaires. On observe pourtant des différences (voir Tableau 3-2).

**Tableau 3-2 : Mise en parallèle des constantes déterminées pour *Daphnia magna* et *Pimephales promelas***

Constantes pour le ligand biotique	<i>Daphnia magna</i>	<i>Pimephales promelas</i>
Log $K_{CaBL}$	3.47 (3.07-3.80)	3.6
Log $K_{MgBL}$	3.58 (3.10-3.90)	3.6 (Log $K_{CaBL}$ )
Log $K_{NaBL}$	3.19 (2.92-3.48)	3.0
Log $K_{HBL}$	-5.4 ( <i>P. promelas</i> )	5.4
Log $K_{CuBL}$	8.02	7.4
Log $K_{CuOHBL}$	7.45	
$f_{CuBL}^{50\%}$	0.39	0.33
$[EC50_{(Cu2+)}]_0$ (nM)	6.10 (5.45-6.74)	19.9

Données pour *Daphnia magna* (écarts-types obtenus par simulations Monte-Carlo) : De Schamphelaere et Janssen, 2002a

Données pour *Pimephales promelas* : Playle *et al.*, 1993a ; Santore *et al.*, 2001 ; Di Toro *et al.*, 2001

On peut également noter, comme on le voit dans le Tableau 3-2, que la toxicité du complexe  $CuOH^+$  a été prise en compte pour expliquer la toxicité du cuivre envers *Daphnia magna*. D'autres travaux proposaient également une démarche similaire (Blust *et al.*, 1991 ; Allen et Hansen, 1996).

Seules les concentrations de cuivre dissous ont été mesurées en début et fin d'expériences. Les concentrations en cuivre libre correspondantes ont été calculées à partir du BLM version a008. Cette version allie les capacités de modélisation en spéciation chimique de CHESS (Santore et Driscoll, 1995) et celles en complexation avec la matière organique du Model V de WHAM (Tipping, 1994). Les constantes de la base de données NIST (Martell *et al.*, 1997) ont été utilisées pour la complexation avec les espèces inorganiques. Les concentrations en ions n'ont pas été suivies pendant le test. Des expériences antérieures ayant montrées une bonne stabilité. Les concentrations en DOC ont été mesurées en début (271 µg/L) et fin (280 µg/L) de test. Ce qui donne une valeur moyenne d'environ 276 µg/L. L'hypothèse selon laquelle « en général, et en l'absence d'autres informations, il est raisonnable d'estimer, pour la modélisation, que 50% de la DOM est constituée d'acides fulviques ayant une capacité complexante pour les ions » (Dwane et Tipping, 1998) est utilisée. On a donc 138 µg/L de DOC composée en totalité d'acides fulviques. Ces acides fulviques contiennent 50% de carbone (valeur par défaut).

Une des particularités du BLM pour *D. magna* réside dans le fait que le magnésium doit être considéré dans le modèle comme réduisant la toxicité du cuivre, ce qui n'est pas le cas pour *P. promelas*. Cela tend à prouver l'existence de différences propres aux espèces testées.

### 3.3.2. Validation du modèle mis au point

Le BLM développé dans l'étude précédente est testé au cours d'une autre expérience (De Schamphelaere *et al.*, 2002b) dans le but d'affiner le modèle et de le valider avec d'autres jeux de données. La partie complexation avec la matière organique du BLM, c'est à dire le modèle WHAM V, doit ainsi être calibrée selon le type d'acides humiques utilisé. En effet, si le nombre de sites actifs pris en compte par le modèle semble être constant, les constantes de stabilité entre le cuivre et la MO doivent être adaptées. La constante d'échange entre le métal et les protons pour la complexation avec la MO est affinée en utilisant la technique des moindres carrés. Les concentrations en cuivre libre mesurées et modélisées sont exprimées en fonction de la concentration totale en cuivre, et ce pour chaque milieu d'essai. La validité des constantes ainsi définies, pour chaque milieu, doit ensuite être vérifiée.

### 3.3.3. Test du BLM-cuivre pour les daphnies

Les simulations présentées dans cette partie ont été réalisées grâce au BLM version Windows 1.0.0. (Hydroqual, 2002). Le module dédié à l'estimation de la toxicité du cuivre sur *Daphnia magna* a été utilisé. Le tableau suivant énumère les caractéristiques physico-chimiques de base du milieu choisi pour les calculs.

**Tableau 3-3 : Caractéristiques physico-chimiques de l'eau utilisée pour la modélisation**

Paramètre	Valeur
Température	18°C
pH	7.6
Cu	Variable
DOC	0.01
% acides humiques	50*
Ca	13.23* mg/L
Mg	3.65* mg/L
Na	5.29* mg/L
K	1.17* mg/L
SO <sub>4</sub>	6.63* mg/L
Cl	5.67* mg/L
Alcalinité	52.47* mg CaCO <sub>3</sub> /L

\* valeur par défaut du modèle

Les objectifs des tests conduits ici sont d'une part, d'utiliser un modèle « type BLM » actuellement disponible, et d'autre part, d'observer l'influence des paramètres pris en compte dans les calculs sur l'évolution de la toxicité du cuivre vis-à-vis de *Daphnia magna*. L'influence des différents paramètres testés est présentée dans la Figure 3-7.



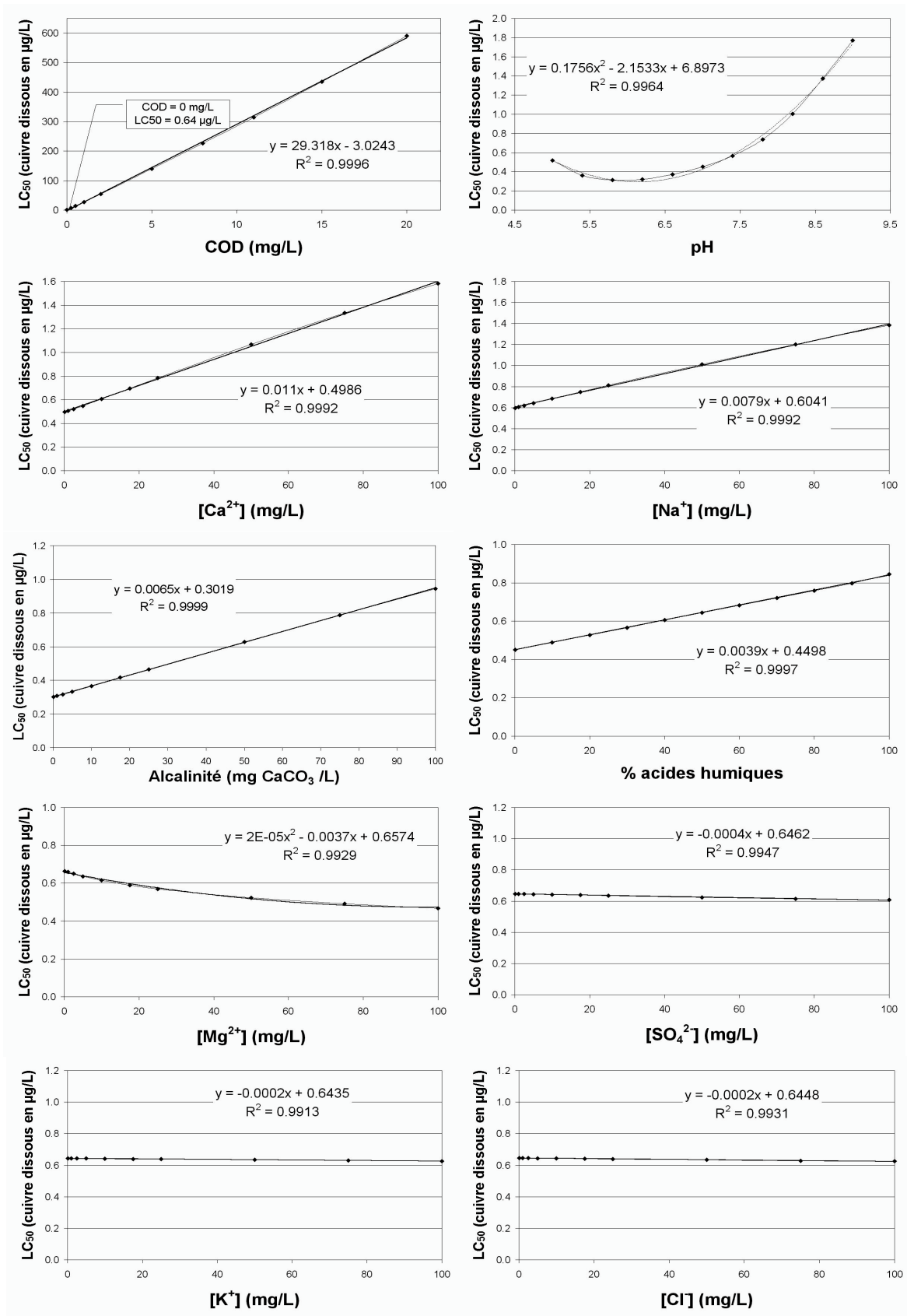


Figure 3-7 : Influence des paramètres du BLM sur la toxicité du cuivre vis-à-vis de *Daphnia magna*. Sur les graphiques sont indiqués, en abscisse, les paramètres testés et, en ordonnées, la LC<sub>50</sub> calculée et exprimée en cuivre dissous. Calculs effectués avec le Cu-BLM pour *Daphnia magna* (Hydroqual, 2002).

La Figure 3-7 présente l'influence décroissante des paramètres suivants sur la toxicité du cuivre vis-à-vis des daphnies (*Daphnia magna*) :

**COD >> pH > Ca<sup>2+</sup> > Na<sup>+</sup> > alcalinité > % d'acides humiques > Mg<sup>2+</sup> > SO<sub>4</sub><sup>2-</sup> > K<sup>+</sup> > Cl<sup>-</sup>**

Le BLM prédit la toxicité du métal pour un environnement aquatique donné, défini par certaines de ses caractéristiques physico-chimiques. L'utilisateur de ce programme de calcul est donc amené à fournir ces données en entrée. Certains de ces paramètres entraînent des effets importants sur les calculs de toxicité alors que d'autres n'ont qu'un effet mineur sur les prédictions.

**COD** : les concentrations de matières organiques dissoutes dans le milieu sont représentées par la mesure du carbone organique dissous. La matière organique dissoute joue un rôle important dans la détermination de la spéciation et de la biodisponibilité des métaux. De plus, comme l'effet de ce paramètre est important même à de faibles valeurs, il est important de s'assurer une limite de détection analytique suffisamment basse lors de la mesure.

**pH** : des valeurs précises de pH sont nécessaires car elles influent de manière importante sur la spéciation du métal et sur les prédictions du modèle. Le pH est également un élément important pour la détermination de la capacité de complexation du métal avec la matière organique.

**Les cations majeurs (Ca<sup>2+</sup>, Na<sup>+</sup>, Mg<sup>2+</sup>, K<sup>+</sup>)** : ces paramètres sont nécessaires au fonctionnement du modèle. Le calcium et le sodium entre en compétition avec le métal au niveau du ligand biotique. Ils auront donc un effet direct sur les prédictions de la toxicité du métal. Pour certains organismes, le magnésium peut également avoir une action non négligeable sur les calculs. En ce qui concerne le potassium, aucun effet direct sur la toxicité des métaux n'est connu actuellement. C'est pourquoi les valeurs de ce paramètre pourront être estimées en l'absence de données.

**Les anions majeurs (SO<sub>4</sub><sup>2-</sup> et Cl<sup>-</sup>)** : les ions sulfate et chlorure sont importants à considérer pour les calculs du BLM (le cas des ions carbonate, anions majeurs également, est étudié séparément). Même si ces anions n'ont pas réellement d'effets directs sur la toxicité du cuivre en particulier, il est néanmoins important d'indiquer leurs concentrations puisqu'elles interviennent dans le calcul de la force ionique et sont nécessaires au respect de l'équilibre des charges (ces paramètres peuvent, si besoin, être estimés). La chimie des métaux et de la matière organique dépend en effet des variations de la force ionique.

**Alcalinité** : le BLM utilise les valeurs d'alcalinité et de pH pour calculer la concentration de carbone inorganique dissous (CID) dans l'eau. Les espèces chimiques comprises dans le CID sont les ions carbonate (CO<sub>3</sub><sup>2-</sup>), hydrogénocarbonate (HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>) et dihydrogénocarbonate (H<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>). Les ions hydrogénocarbonate sont la forme prédominante dans la plupart des eaux naturelles (pour des pH compris entre 6.3 et 10.3). L'alcalinité est un paramètre important pour les calculs du BLM à cause de la formation des complexes métalliques avec les carbonates. L'alcalinité doit être mesurée sur des échantillons filtrés afin d'éliminer la contribution potentielle du carbonate de calcium précipité, en suspension.

### 3.4. Etude expérimentale 1 : influence de la matière organique sur l'accumulation de cuivre au ligand biotique

Cette expérience a pour but principal de tester l'influence de la matière organique dissoute sur l'accumulation du cuivre dans les branchies de *Gasterosteus aculeatus* (épioche), à court terme (durée du test = 96h.). Les résultats obtenus seront ensuite comparés aux calculs du BLM développé pour le cuivre sur une autre espèce de poisson, *Pimephales promelas* (vairon tête de boule).

#### 3.4.1. Etudes préliminaires

##### 3.4.1.1. Modélisation du devenir du cuivre en présence de matières organiques dissoutes

Dans un premier temps, afin de mettre en place des conditions expérimentales adéquates pour le test, des modélisations ont été réalisées. Celles-ci ont été menées à l'aide d'un programme de calcul de spéciation chimique permettant la prise en compte de la complexation des métaux avec la matière organique : WinHumic V, version 6 (Gustafsson, 2000), intégrant le module « Model V » du WHAM (Cf. point 2.2.4.1.1). Deux séries de modélisations ont été réalisées, la première en présence d'une forte concentration en cuivre (635 µg/L, Figure 3-8), et la seconde en présence d'une concentration en cuivre plus faible (25 µg/L, Figure 3-9). Les graphiques suivants présentent à la fois l'évolution des concentrations en cuivre dissous (symbole = carré) et en cuivre libre (symbole = losange), en fonction de la concentration en matières organiques dissoutes. Les paramètres physico-chimiques de l'eau utilisée pour l'expérience ont servi de données d'entrée au modèle (voir les caractéristiques de l'eau de l'aquarium « F », aquarium témoin, Tableau 3-7).

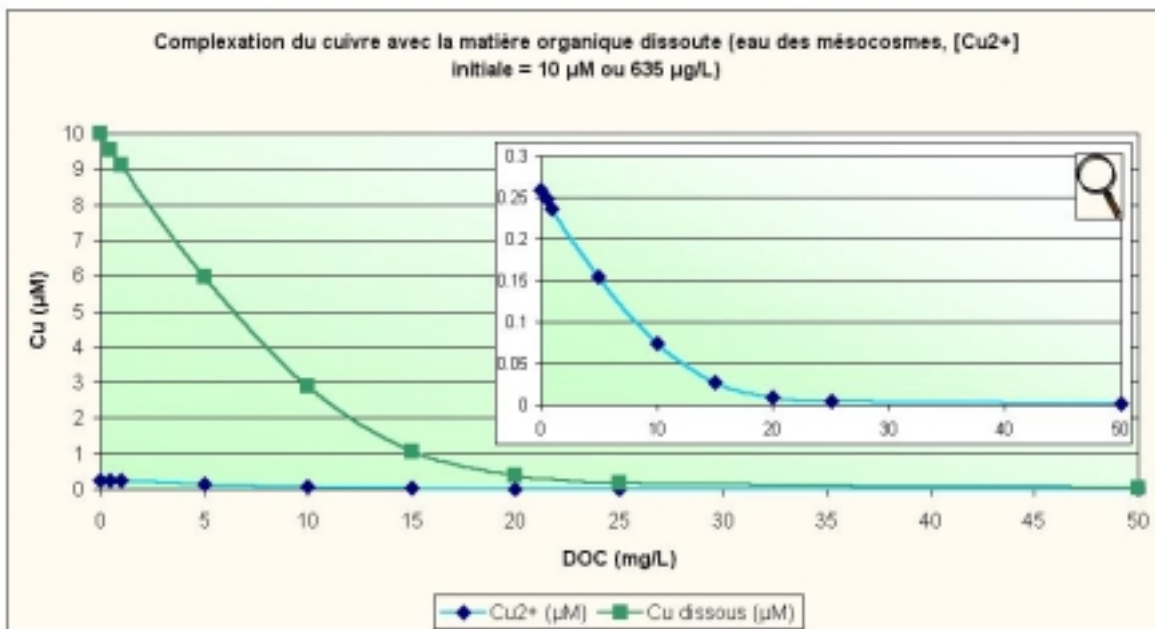
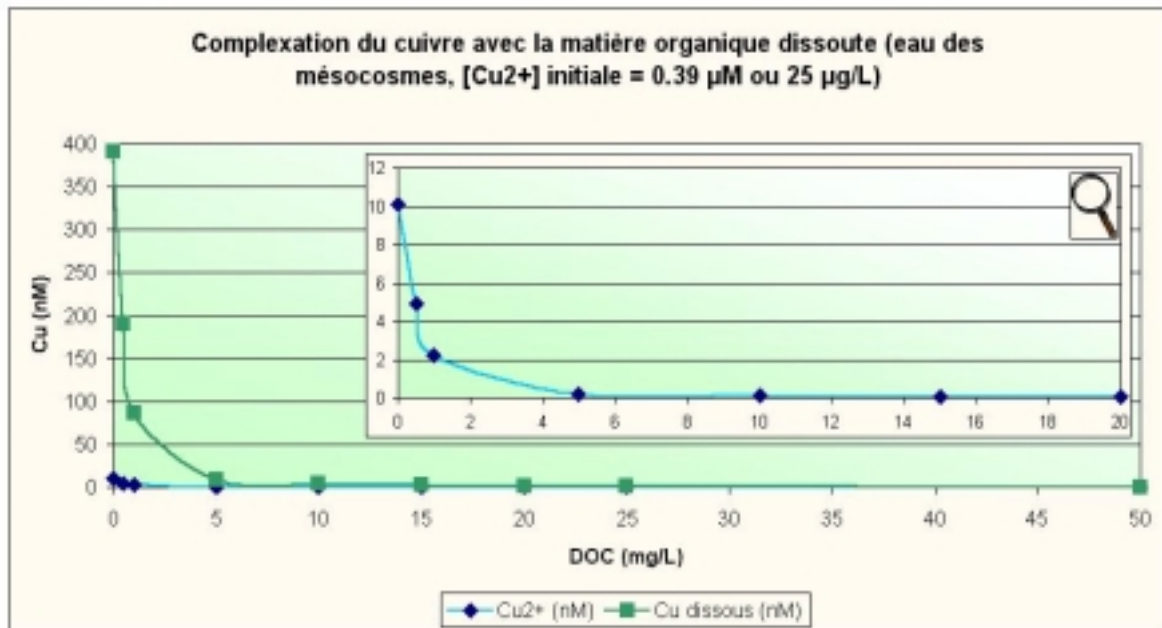


Figure 3-8 : Modélisation de la complexation du cuivre (cuivre libre) avec la matière organique dissoute (eau des mésocosmes, [Cu]<sub>init</sub> = 10 µM) – WinHumic V version 6



**Figure 3-9 : Modélisation de la complexation du cuivre (cuivre libre) avec la matière organique dissoute (eau des mésocosmes,  $[Cu]_{init} = 0.39 \mu M$ ) – WinHumic V version 6**

Ces modélisations nous permettent de constater les points suivants :

- En l'absence de MO, le cuivre est presque entièrement présent sous forme de complexes inorganiques, donc sous forme dissoute. Cependant, la fraction de cuivre sous forme libre n'est que d'environ 2.5%.
- A 5 mg/L de matières organiques, les concentrations de cuivre sous forme dissoute et libre diminuent d'un facteur 1.7 dans le cas d'une forte concentration en cuivre totale initiale (635  $\mu g/L$ ) et d'un facteur 45.5 pour une faible concentration en cuivre totale initiale (25  $\mu g/L$ ).

Comme la toxicité du cuivre semble liée, soit à la forme dissoute (surestimation de la toxicité), soit à la forme libre (sous estimation de la toxicité), ces concentrations ont besoin d'être suivies au cours de tests écotoxicologiques. On peut alors constater que le suivi des concentrations en cuivre libre pendant le test pourra être délicat aux faibles concentrations en cuivre total, et particulièrement en présence de matière organique.

Il semble important de préciser ici quel type d'analyse permet de mesurer les différentes formes chimiques des métaux et du cuivre, en particulier. De manière simplifiée, on peut citer les deux méthodes suivantes (voir Monbet et Coquery, 2003 pour une revue bibliographique) :

- ICP/MS : cuivre total et cuivre dissous, c'est à dire la majorité des espèces complexées du cuivre (y compris le cuivre complexé avec la matière organique).
- Ampérométrie : cuivre libre, sous forme  $Cu^{2+}$ .

#### 3.4.1.2. Modélisation de la toxicité du cuivre vis-à-vis de *Pimephales promelas*

Dans un second temps, la modélisation de la toxicité du cuivre vis-à-vis de *Pimephales promelas* a été menée en prenant en compte les paramètres physico-chimiques de tests trouvés dans la littérature et conduits sur l'épinoche. Cette modélisation a pour objectif de comparer les valeurs de toxicité du cuivre vis-à-vis de l'épinoche identifiées dans la littérature aux prédictions faites par le BLM développé pour *Pimephales promelas*, dans les mêmes conditions physico-chimiques.

Dans la littérature on ne trouve que peu d'essais écotoxicologiques mettant en œuvre le cuivre et l'épinoche. Le Tableau 3-4 en donne un récapitulatif.

**Tableau 3-4 : Récapitulatif des essais écotoxicologiques testant les effets du cuivre sur l'épinoche**

Substance / organisme tests	Résultat	Autres informations	Référence
Sulfate de cuivre / <i>Gasterosteus aculeatus</i> (-58 mm et 1.9 g)	LC <sub>50</sub> -24h = 2780 µg/L LC <sub>50</sub> -48h = 1960 µg/L LC <sub>50</sub> -72h = 1590 µg/L LC <sub>50</sub> -96h = 1490 µg/L	Essai dynamique, eau douce, pH = 8, T = 10°C, dureté = 284 mg CaCO <sub>3</sub> /L, alcalinité = 244 (HCO <sub>3</sub> ).	Svecevicus et Vosyliene, 1996
Sulfate de cuivre / <i>Gasterosteus aculeatus</i> (-47 mm et 0.6 g)	LC <sub>90</sub> -24h = 2800 µg/L	Essai statique	Lemma et Yau, 1974

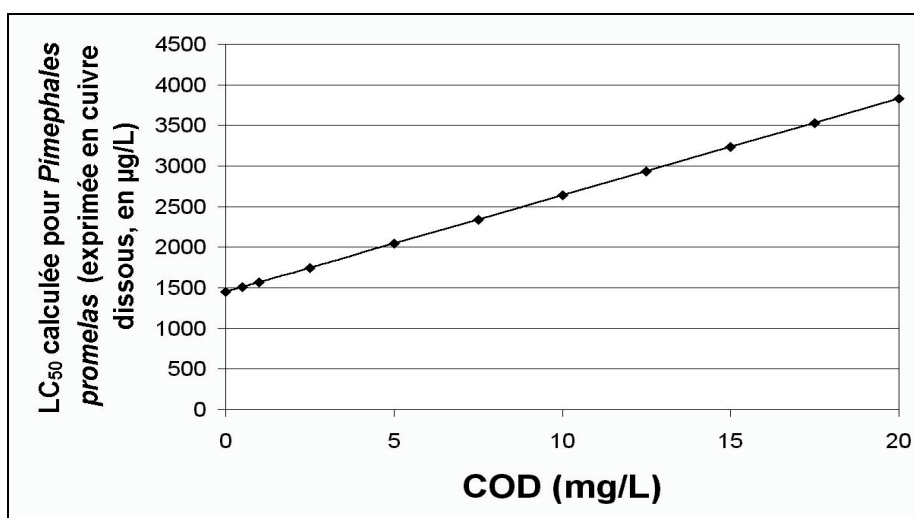
La modélisation suivante est basée, en ce qui concerne les paramètres physico-chimiques du milieu d'étude, sur les données des tests écotoxicologiques menés par Svecevicus et Vosyliene, 1996 sur l'épinoche. Les informations manquantes ont été remplacées par les valeurs par défaut proposées dans la documentation du BLM (Hydroqual, 2002).

**Tableau 3-5 : Qualité de l'eau utilisée pour la modélisation**

Paramètre	Valeur
Température	10°C
pH	8
Cu	Variable : 0.1-500 µg/L
DOC	Variable : 0.01-10 mg/L
% acides humiques	50*
Ca	114 mg/L
Mg	3.65* mg/L
Na	5.29* mg/L
K	1.17* mg/L
SO <sub>4</sub>	6.63* mg/L
Cl	5.67* mg/L
Alcalinité	400.26 mg CaCO <sub>3</sub> /L
S	1.10 <sup>-10</sup> * mg/L

\* valeur par défaut

Les résultats de la modélisation sont présentés sur la Figure 3-10, ci-dessous.



**Figure 3-10 : Evolution de la toxicité du cuivre vis-à-vis de *Pimephales promelas* calculée au moyen du BLM (Hydroqual, 2002). Les caractéristiques physico-chimiques du milieu employé pour les tests conduits sur l'épinoche Svecevicus et Vosyliene, 1996 ont été utilisées.**

Les résultats obtenus à partir des calculs réalisés par le BLM, pour *Pimephales promelas*, indiquent une toxicité du cuivre pour cette espèce comprise entre 1450 et 3800 µg/L en fonction de la concentration en COD, dans des conditions physico-chimiques similaires à celles utilisées pour l'épinoche. Même si la concentration en matières organiques dissoutes n'est pas précisée dans l'étude de Svecevicus et Vosyliene, 1996, il est possible de supposer que cette concentration était très faible, comme dans la plupart des tests écotoxicologiques de laboratoire. La toxicité du cuivre calculée pour *Pimephales promelas* (~1450 mg/L) est donc très proche de la toxicité mesurée pour l'épinoche (1490 mg/L).

### 3.4.2. Matériels et méthodes

La substance testée est le sulfate de cuivre (CuSO<sub>4</sub>) : M(CuSO<sub>4</sub>) = 159.62 g/mol, M(Cu) = 63.55 g/mol. L'essai mis en place est de type statique et a lieu dans une série de six aquariums de 15 L. La charge en poisson ne dépassera pas 1 g/L soit neuf poissons par aquarium. L'organisme testé est l'épinoche (*Gasterosteus aculeatus*), poisson d'eau douce que l'on retrouve également en estuaire jusqu'au niveau des zones mésohalines. De manière à éviter les interférences sur l'accumulation et la toxicité du cuivre du fait de l'ingestion de particules contaminées, aucun aliment n'a été introduit dans le milieu de test durant la période d'essai (96h). Le matériel utilisé a été soumis à des lavages à l'acide nitrique suprapur et à des rinçages préliminaires à l'eau distillée (déionisée) de manière à éviter toute contamination.

L'eau du robinet servant à l'approvisionnement des mésocosmes est utilisée comme solvant. Elle a été soumise, au préalable, à un bullage suivi d'une période de repos de manière à accélérer la précipitation des carbonates. Ceci permet d'éviter une éventuelle précipitation de carbonate de cuivre au cours de l'essai. Un suivi quotidien de la concentration en oxygène dissous, de la température et du pH est organisé tout au long du test, dans les aquariums contenant les organismes testés.

Deux types de matières organiques dissoutes sont testés au-cours de l'expérience. La première, MO(1), est constituée d'acides humiques ACROS®. La seconde, MO(2), a été obtenue à partir de tourbe blonde séchée et broyée. Les extraits des matières organiques ont été mis en solution, sous agitation magnétique pendant 12h suivie d'une mise à l'équilibre pendant 12h. Les solutions ont ensuite été filtrées à 0,45 µm. Les solutions mères ainsi obtenues affichaient des concentrations en carbone organique dissous de 610 et 100 mg/L respectivement.

Les caractéristiques des différents aquariums mis en place pour le test sont précisées dans le Tableau 3-6.

**Tableau 3-6 : Caractéristiques des aquariums utilisés au-cours du test**

Identifiant	Caractéristiques
A	Matières organiques dissoutes de type 1 MO(1) : ajout d'une concentration nominale de 2.5 mg/L [Cu] <sub>nominale</sub> = 50 µg/L
B	MO(1) : ajout d'une concentration nominale de 5 mg/L [Cu] <sub>nominale</sub> = 50 µg/L
C	MO(1) : ajout d'une concentration nominale de 2.5 mg/L 9 organismes test [Cu] <sub>nominale</sub> = 50 µg/L
D	MO(2) : ajout d'une concentration nominale de 5 mg/L [Cu] <sub>nominale</sub> = 50 µg/L
E	pas d'ajout de MOD supplémentaire 9 organismes test [Cu] <sub>nominale</sub> = 50 µg/L
F	Blanc : eau de dilution seule

Les méthodes utilisées pour les différentes analyses conduites au-cours du test sont explicitées dans les paragraphes suivants.

**Analyse du cuivre dans les branchies** : les échantillons (branchies d'épinoches) sont prélevés, après 96h, puis acidifiés (HNO<sub>3</sub> qualité suprapure). Ils sont ensuite chauffés à 120°C sur plaque chauffante pendant deux heures dans des flacons téflonisés. La préparation est enfin volumée à 10 mL avec de l'eau milliQ avant que l'analyse ne soit réalisée en ICP optique.

**Analyse du cuivre** : l'analyse du cuivre est réalisée par absorption atomique (four graphite). Les échantillons prélevés ont préalablement été acidifiés.

**Mesure des autres ions** : chromatographie échangeuse d'ions (Cl<sup>-</sup>, NO<sub>3</sub><sup>-</sup>, SO<sub>4</sub><sup>2-</sup>), NF EN ISO 9963-1 (TAC), analyse directe par ICP optique selon la norme NF EN ISO 1885 (Ca<sup>2+</sup>, K<sup>+</sup>, Mg<sup>2+</sup>, Na<sup>+</sup>).

**Analyse de la matière organique dissoute** : une analyse quantitative de la matière organique dissoute a été menée au cours de l'expérience de manière répétée (t<sub>0</sub>, t<sub>+24h</sub>, t<sub>+48h</sub> et t<sub>+96h</sub>). La concentration en Carbone Organique Dissous a été mesurée selon la norme NF EN 1484 « Lignes directrices pour le dosage du carbone organique total (COT) et carbone organique dissous (COD) ». Les échantillons ont été acidifiés avec H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> (1,5 mL/L), centrifugés à 400 g pendant 20 minutes puis ont subi un dégazage à l'oxygène pendant 15 minutes. La mesure est ensuite réalisée grâce à un analyseur de carbone pour échantillons liquides (Shimadzu TOC 5050).

### 3.4.3. Résultats et discussion

Les Tableau 3-7 et Tableau 3-8 présentent les résultats des différentes mesures réalisées sur l'eau des aquariums utilisés.

**Tableau 3-7 : Paramètres physico-chimiques de l'eau des différents aquariums**

Aquarium		COD (mg/L)	Ca <sup>2+</sup> (mg/L)	K <sup>+</sup> (mg/L)	Mg <sup>2+</sup> (mg/L)	Na <sup>+</sup> (mg/L)	TAC (mmol H/L)	Cl <sup>-</sup> (mg/L)	NO <sub>3</sub> <sup>-</sup> (mg/L)	SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup> (mg/L)	Cu <sub>T,dissous</sub> (µg/L)
A	t <sub>0</sub>	3.3	59±5	4.8±0.8	13.6±1.3	17.2±1.1	2.20±0.05	55.8±1.5	2.25±0.10	17.00±0.70	51.2±1.5
	t <sub>+24h</sub>	3.1									51.2±1.5
	t <sub>+48h</sub>	3.4									53.3±1.5
	t <sub>+96h</sub>	2.8	52±5	3.3±0.8	13.7±1.3	16.1±1.1	2.10±0.05	57.7±1.5	2.55±0.10	17.25±0.70	
B	t <sub>0</sub>	6.2	56±5	4.9±0.8	14.9±1.3	18.5±1.1	2.20±0.05	56.7±1.5	2.40±0.10	17.00±0.70	55.9±1.5
	t <sub>+24h</sub>	5.7									50.8±1.5
	t <sub>+48h</sub>	6.0									53.8±1.5
	t <sub>+96h</sub>	5.1	62±5	3.3±0.8	14.0±1.3	16.6±1.1	2.30±0.05	57.0±1.5	2.65±0.10	17.15±0.70	
C	t <sub>0</sub>	6.9	52±5	4.8±0.8	13.3±1.3	16.7±1.1	2.25±0.05	55.8±1.5	2.50±0.10	16.70±0.70	52.8±1.5
	t <sub>+24h</sub>	6.4									53.0±1.5
	t <sub>+48h</sub>	6.4									53.5±1.5
	t <sub>+96h</sub>	6.2	62±5	3.5±0.8	14.1±1.3	17.0±1.1	2.30±0.05	57.4±1.5	2.85±0.10	17.35±0.70	
D	t <sub>0</sub>	6.7	50±5	4.9±0.8	13.1±1.3	17.1±1.1	2.05±0.05	56.8±1.5	2.40±0.10	17.30±0.70	54.8±1.5
	t <sub>+24h</sub>	6.0									55.0±1.5
	t <sub>+48h</sub>	5.2									53.6±1.5
	t <sub>+96h</sub>	4.6	57±5	3.3±0.8	13.8±1.3	15.6±1.1	2.10±0.05	58.4±1.5	2.75±0.10	17.50±0.70	
E	t <sub>0</sub>	1.7*	48±5	4.9±0.8	13.1±1.3	15.4±1.1	2.15±0.05	57.8±1.5	2.45±0.10	17.50±0.70	46.5±1.5
	t <sub>+24h</sub>	1.4									41.0±1.5
	t <sub>+48h</sub>	1.5									39.7±1.5
	t <sub>+96h</sub>	1.6	58±5	3.3±0.8	14.2±1.3	16.0±1.1	2.25±0.05	58.0±1.5	2.75±0.10	17.35±0.70	
F	t <sub>0</sub>	1.4*	60±5	5.2±0.8	13.3±1.3	15.6±1.1	2.15±0.05	58.5±1.5	1.40±0.10	17.75±0.70	<0.5
	t <sub>+24h</sub>	1.2									<0.5
	t <sub>+48h</sub>	1.2									<0.5
	t <sub>+96h</sub>	1.4	56±5	3.3±0.8	14.1±1.3	16.1±1.1	2.25±0.05	57.9±1.5	1.55±0.10	17.75±0.70	

\* moyenne de deux mesures

**Tableau 3-8 : Suivi de la température, du pH et de l'oxygène dissous au cours du test**

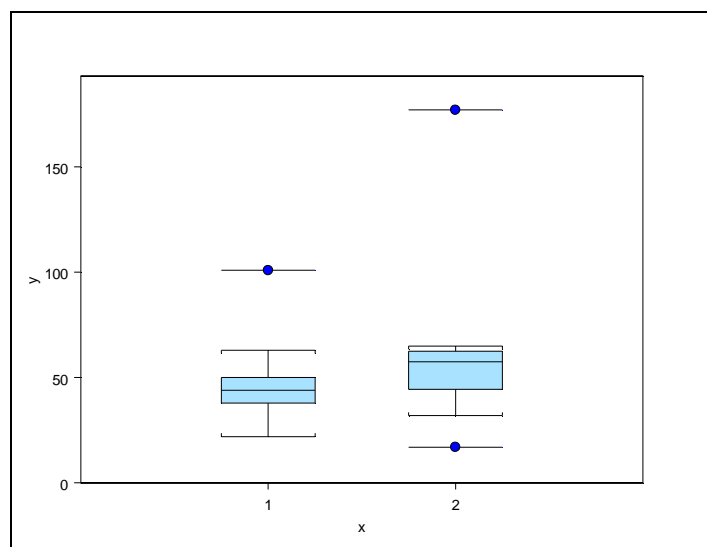
Aquarium	T (°C)	[O <sub>2</sub> ] <sub>dissous</sub> (mg/L)	pH	
C	t <sub>0</sub>	18.7	8	7.9
	t <sub>+24h</sub>	16.3	7.62	7.82
	t <sub>+48h</sub>	15.5	7.26	7.85
	t <sub>+72h</sub>	14.3	7.2	7.71
	t <sub>+96h</sub>	14.2	6.98	7.77
E	t <sub>0</sub>	18.7	8.5	7.9
	t <sub>+24h</sub>	16.3	7.62	7.89
	t <sub>+48h</sub>	15.5	7.4	7.65
	t <sub>+72h</sub>	14.3	7.3	7.72
	t <sub>+96h</sub>	14.2	7.2	7.73

Les résultats des analyses de cuivre dans les branchies des poissons exposés sont présentés dans le Tableau 3-9.

**Tableau 3-9 : Concentrations en cuivre accumulé au niveau des branchies des épinoches**

N° échantillon	Avec ajout de matières organiques dissoutes (aq.C), [Cu] <sub>branchies</sub> (nmol/g ph <sup>30</sup> )	Sans ajout de matières organiques dissoutes (aq.E), [Cu] <sub>branchies</sub> (nmol/g ph)
1	101	57
2	50	-
3	50	57
4	30	32
5	63	60
6	38	58
7	41	17
8	44	177
9	22	65

Les résultats du Tableau 3-9 sont repris pour être présentés sous forme de « boîtes à moustaches » dans la Figure 3-11.



**Figure 3-11 : Distribution des concentrations en cuivre mesurées dans les branchies des épinoches en présence (1) ou non (2) de matières organiques dissoutes**

<sup>30</sup> ph = poids humide



La comparaison des médianes indique une plus faible concentration de cuivre au niveau du ligand biotique des poissons en l'absence de matières organiques dissoutes : 42.63 nmol/g (poids humide) en présence de MOD et 56.94 nmol/g (poids humide) sans ajout de MOD. Néanmoins, la faible taille des échantillons utilisés lors de cette expérience n'aura pas permis de mettre en évidence une différence significative entre les concentrations de cuivre mesurées dans les branchies des épinoches exposées, en présence ou en l'absence de matières organiques dissoutes.

Ceci vient corroborer les résultats des études montrant l'influence de la matière organique dissoute sur la biodisponibilité des métaux. Ici, la présence de matière organique entraîne une complexation du cuivre plus importante, réduisant de ce fait sa biodisponibilité pour l'organisme testé.

Par ailleurs, des modélisations réalisées dans les mêmes conditions physico-chimiques que celles des aquariums C et E montrent une différence de toxicité pour *Pimephales promelas*. En effet, les  $LC_{50}^{31}$  calculées vont de 418 µg/L pour l'aquarium E (sans ajout de matières organiques dissoutes) à 993 µg/L pour l'aquarium C (avec ajout de matières organiques dissoutes). Ces modélisations ont été réalisées à l'aide du BLM développé pour le cuivre et *Pimephales promelas* Hydroqual, 2002.

### 3.5. Etude expérimentale 2 : test de modèles de spéciation

Comme nous l'avons vu tout au long de ce rapport, il est fait de plus en plus appel aux techniques de modélisation dans le cadre de l'estimation de la fraction biodisponible des métaux. Les différents outils qu'il est nécessaire de mettre en œuvre pour atteindre un tel but sont multiples et l'on retrouve ainsi des modèles de spéciation chimique avec les ligands inorganiques mais aussi des modèles de complexation avec la matière organique. Les BLM intègrent tous ces outils en plus d'un module permettant la modélisation des interactions entre le métal et le ligand biotique.

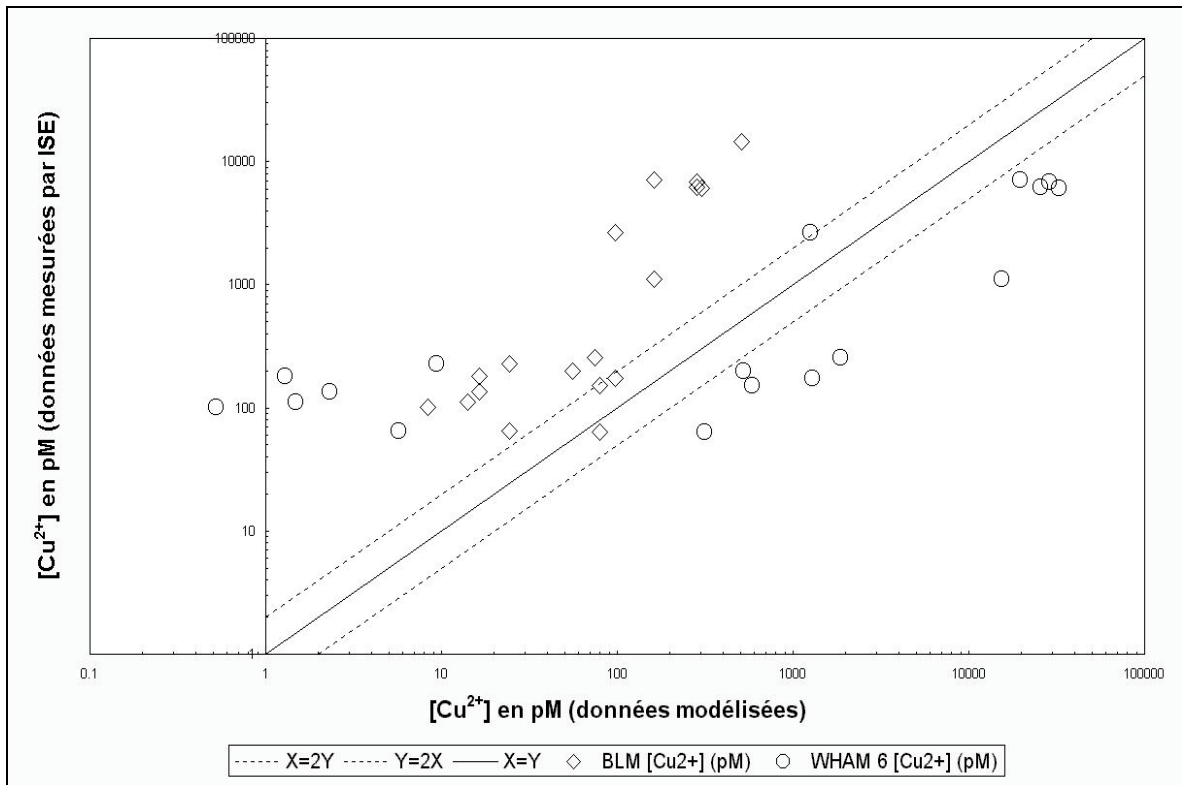
L'étude qui va suivre a pour but de tester deux modèles de spéciation différents prenant en compte les phénomènes de complexation avec des espèces inorganiques et organiques. Le module de spéciation intégré au BLM sera bien entendu testé. Les descriptions des modèles testés sont présentées ci-après.

- Module de spéciation inclus dans le Biotic Ligand Model v.AP08, interface pour Windows v.1.0.0. (Hydroqual, 2002). Ce module est basé sur une version du modèle CHESS (Santore et Driscoll, 1995) modifiée en prenant en compte les interactions chimiques et électrostatiques du modèle WHAM V (Tipping, 1994).
- WHAM 6.0 (Tipping, 1998).

Les concentrations en cuivre libre ( $Cu^{2+}$ ) sont obtenues par modélisations successives conduites à partir des deux modèles présentés précédemment. Ces concentrations sont mises en parallèle avec des données similaires, obtenues par mesure du cuivre libre, dans des conditions physico-chimiques identiques. Ces mesures ont été réalisées par électrode spécifique (ISE : Ion-Selective Electrode). Les résultats de cette comparaison sont présentés par la Figure 3-12.

---

<sup>31</sup> Valeurs exprimées en cuivre total dissous



**Figure 3-12 : Comparaison entre des mesures de la concentration en cuivre libre par ISE (*Ion Selective Electrode*) et des données obtenues par modélisation**

La Figure 3-12 nous permet donc de constater une certaine différence entre, d'une part les concentrations en cuivre libre mesurées et, d'autre part, les mêmes concentrations modélisées. Les différences sont multiples :

- les résultats obtenus grâce au BLM tendent à sous-estimer les concentrations en cuivre libre présentes dans le milieu. Cela entraîne comme conséquence directe une sous-estimation, par le BLM, de la toxicité du cuivre pour les organismes vivants.
- les résultats obtenus grâce à la dernière version du modèle WHAM montrent une tendance à sous-estimer la concentration en cuivre libre aux faibles concentrations et une tendance à surestimer celle-ci aux concentrations plus fortes.

Ces résultats permettent donc de se poser des questions sur la fiabilité des modèles de spéciation intégrés aux BLM. Il serait nécessaire, de manière à valider la partie du BLM correspondant à la spéciation chimique des métaux avec des ligands inorganiques et organiques, de conduire des expériences similaires à celle conduite ici. Il serait alors possible de comparer des données modélisées à des valeurs mesurées, dans les mêmes conditions physico-chimiques.

### 3.6. Limites des BLM

Les BLM ont été construits à partir de différents modèles préexistants auxquels vient se greffer un modèle chargé de prendre en compte l'interaction du métal, des cations (e. g.  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Na}^+$ ) et des organismes. Les différents modules de calcul intégrés au BLM ont été présentés tout au long de ce rapport. Il s'agit :

- d'un modèle de spéciation chimique inorganique, e. g. CHESS, MINEQL+, MINTEQA2.
- d'un modèle de complexation des métaux avec la matière organique, e. g. WHAM, NICA-Donnan.
- d'un modèle de complexation des métaux avec les ligands biotiques, e. g. FIAM, GSIM, BLM.

D'une manière générale, on peut dire que certains modèles constitutifs des BLM nécessiteraient des étapes de **validation** plus poussées. C'est par exemple le cas du Model V du WHAM. Le fait qu'il ait été développé, initialement, pour traiter des eaux et sols acides peut faire qu'il ne puisse pas être utilisé pour des milieux dont les caractéristiques sont très différentes. D'autre part, en plus des sites de fixation des métaux sur la matière organique, il existe, dans les eaux naturelles, d'autres ligands ayant une grande affinité pour les espèces métalliques. C'est le cas, par exemple, des sulfures (voir point 3.2.1.4). Comme tout modèle, les BLM reposent sur des hypothèses simplificatrices. Cependant certaines n'ont été encore que peu ou pas validées :

- *Les BLM sont fondés sur l'hypothèse du FIAM selon laquelle la toxicité des métaux vis-à-vis des organismes vivants est directement liée à la concentration (ou à l'activité, Cf. note 17, page 32) de l'ion métallique libre.* Certaines espèces métalliques, autres que l'ion libre, sont soupçonnées d'exercer un effet toxique (e. g. complexes hydroxydes, certains complexes entre le métal et la matière organique, etc.). Leur prise en compte dans le cadre de la modélisation au niveau du ligand biotique s'est limitée jusqu'à présent à l'ajustement de certains paramètres de manière à rendre compte de différences observées entre les mesures et les calculs. Il serait nécessaire de mettre en place des séries d'expériences visant à identifier les autres espèces responsables de la toxicité (Cf. Errecalde *et al.*, 1998).
- *Une des hypothèses des BLM veut que la stabilité des complexes entre les cations et le ligand biotique reste la même quelles que soient les caractéristiques physico-chimiques des milieux.* Or, les ligands biotiques font avant tout partie d'un organisme vivant. En cela, des modifications de la stabilité des complexes peuvent survenir en fonction des réactions de l'organisme aux perturbations environnementales susceptibles de changer la nature des ligands biotiques.
- *La modélisation BLM suppose que les relations entre le métal et l'organisme se fassent à l'équilibre thermodynamique.* Cependant, certaines études ont montré l'importance des cinétiques de réaction dans l'assimilation de quelques métaux par les organismes vivants (nickel, aluminium, cobalt, chrome).
- *Le BLM prend en compte, en entrée, les paramètres physico-chimiques du milieu environnant (caractéristiques de l'eau).* Or, dans le cas du pH, par exemple, des différences existent entre les valeurs relevées dans l'eau et celles mesurées dans le micro-environnement du ligand biotique chez les poissons Playle *et al.*, 1992 et les invertébrés Gensemer et Playle, 1999. Des travaux ont montré que les conditions au niveau du micro-environnement, constitué par les branchies des poissons par exemple, différaient des conditions du milieu environnant. Des essais de modélisation de ces phénomènes ont ainsi été entrepris (Tao *et al.*, 2001). Un modèle a été développé afin de calculer le pH au niveau des branchies à partir des conditions de pH du milieu extérieur. D'autres modèles calculent de la même manière les changements d'alcalinité et de sécrétions de mucus au niveau des branchies.

Les **incertitudes** liées à l'utilisation des BLM sont nombreuses car elles englobent toutes celles des différents modèles qui les composent. Ainsi, les incertitudes des modèles de spéciation avec les ligands inorganiques et organiques viennent s'associer à celles des modèles mettant en relation les espèces métalliques et les organismes vivants. La principale incertitude réside dans la détermination des constantes de complexation entre un métal et la matière organique ou entre le métal et le ligand biotique. En effet, si des bases de constantes thermodynamiques de référence existent pour les réactions de formation de complexes inorganiques (Smith *et al.*, 2003), cela n'est pas le cas pour les réactions de formation de complexes organiques ou avec des ligands biotiques. Celles-ci peuvent varier selon le type de matière organique et l'espèce biologique testée.

Certaines **limites d'applicabilité** des modèles dits « BLM » sont également à considérer. En effet, l'application des BLM développés pour une espèce n'a pas encore été validée pour différentes espèces, différents stades de développement et milieux aquatiques.

- Aux fortes concentrations en métaux utilisées pour les tests écotoxicologiques ayant servi au développement de BLM (tests de toxicité aiguë), les ligands les plus forts présents en solution, ont pu être saturés. Leur influence sur la spéciation des métaux n'était donc plus mesurable. En revanche, aux plus faibles concentrations (tests de toxicité chronique), les sites de complexation les plus forts pour les métaux ont pu jouer un rôle plus important. Les BLM développés pour le moment pour la modélisation d'effets aigus ne devront donc être utilisés que dans les cas d'expositions aiguës aux métaux.
- La majeure partie de l'activité scientifique porte sur la connaissance de l'interaction métal / branchies (Cf. modèle GSIM, point 2.3.5.3). La modélisation de la fixation du métal à la surface des cellules des algues ou des bactéries mais aussi des phénomènes conduisant à l'internalisation des espèces métalliques chez ces organismes nécessiterait d'être développée. Les BLM mis au point pour les algues, par exemple, partent de l'hypothèse que l'assimilation des métaux par ces organismes se déroule selon les mêmes phénomènes.

## CONCLUSION

Les éléments métalliques sont des constituants naturels de l'écorce terrestre qui peuvent se disséminer naturellement dans le milieu aquatique. Certains écosystèmes peuvent donc être naturellement très riches en éléments métalliques et abriter des communautés d'espèces qui y sont adaptées. Sous l'effet de la pression des activités anthropiques (activités industrielles, agricoles), la contamination métallique des milieux aquatiques peut augmenter significativement.

Au-delà d'une certaine concentration (parfois très faible) dans le milieu, les métaux ont des effets néfastes. L'évaluation de ces effets doit tenir compte des particularités associées aux métaux. En effet, les concentrations naturelles varient en fonction de la nature géologique du milieu. Il est ainsi difficile, pour les écosystèmes affectés par la présence de métaux, d'estimer la part de métal d'origine naturelle. Ensuite, certains métaux présentent la particularité d'être à la fois essentiels pour les organismes vivants mais aussi toxiques au-dessus d'une certaine concentration. Les seuils d'essentialité et de toxicité peuvent être très variables entre les espèces. Par ailleurs, les organismes vivants sont adaptés aux concentrations naturelles en métaux présentes dans leur environnement. La sensibilité des espèces peut ainsi être très variable entre les régions. Enfin, les métaux sont présents dans les milieux aquatiques sous différentes formes chimiques : dans la phase aqueuse sous forme ionique ou complexés avec des ligands (organiques ou inorganiques) ou dans la phase particulaire adsorbés (voire inclus) sur les particules solides en suspension ou dans les sédiments. La biodisponibilité des métaux est directement liée aux formes sous lesquelles ils se trouvent. Seuls les métaux sous forme ionique et certains complexes inorganiques et organiques sont considérés comme biodisponibles. La modification des caractéristiques physico-chimiques du milieu peut entraîner d'importants changements de biodisponibilité.

En pratique, les normes de qualité environnementale sont déterminées à partir d'essais d'écotoxicité réalisés en laboratoire. Dans les conditions de laboratoire, la majeure partie du métal se trouve sous forme dissoute. Actuellement, on considère que la totalité du métal introduit dans le milieu d'essai est biodisponible. Ces conditions sont éloignées de celles des milieux aquatiques naturels. La prédiction des effets dans des conditions environnementales spécifiques à partir des essais d'écotoxicité est alors problématique. Pour pallier ce problème, les modèles dits « BLM » ont été développés, pour quelques espèces aquatiques et quelques métaux, afin de prédire la toxicité (aiguë) de ces métaux en fonction des conditions physico-chimiques d'un milieu donné. Les BLM présentent l'avantage d'apporter une méthode de prise en compte des phénomènes de biodisponibilité des métaux. Dans le cadre du règlement CE/793/93 pour l'évaluation et le contrôle des risques présentés par les substances existantes, l'évaluation des risques liés à la production et à l'utilisation du zinc pour le milieu aquatique tient compte de la biodisponibilité de celui-ci suivant les milieux étudiés. La méthodologie retenue utilise les BLM développés pour le zinc, pour différents organismes vivants (une algue, un invertébré et un poisson). Des approches similaires seront peut-être proposées dans les années à venir pour la détermination de seuils de qualité.

Toutefois ces modèles récents sont encore en cours d'élaboration pour certains et nécessitent des étapes de validation supplémentaires pour d'autres. L'étude présentée ici a montré l'intérêt mais aussi les limites des BLM proposés pour l'estimation de la biodisponibilité des métaux dans les milieux naturels. En effet, les incertitudes sur les résultats sont encore très importantes et de nombreuses hypothèses n'ont pas encore été validées. Par ailleurs, il est indispensable de bien cerner le domaine d'utilisation des modèles développés compte tenu du peu de validation de leur applicabilité à différentes espèces, différents stades de développement et milieux aquatiques.

## REFERENCES

- Allen, H. E. et D. L. Hansen (1996). "The importance of trace metal speciation to water quality criteria." Water Environment Research **68**: 42-54.
- Allison, J. D., D. S. Brown et K. J. Novo-Gradac (1991). MINTEQA2/PRODEFA2, a geochemical assessment model for environmental systems: version 3.0 user's manual. US EPA, EPA/600/3-91/021.
- Anderson, M. A. et F. M. M. Morel (1982). "The influence of aqueous iron chemistry on the uptake of iron by the coastal diatom *Thalassiosira weissflogii*." Limnol.Oceanogr. **27**: 789-813.
- Anderson, P. D. et P. A. Spear (1980). "Copper pharmacokinetics in fish gills - I Kinetics in pumpkinseed sunfish, *Lepomis gibbosus*, of different body sizes." Water Research **14**: 1101-1105.
- Arellano, J. M., V. Storch et M. C. Sarasquete (1999). "Histological changes and Copper accumulation in liver and gills of the Senegales Sole, *Solea senegalensis*." Ecotox. and Environ. Safety **44**: 62-72.
- Ármannsson, H., J. Burton, G. Jones et A. Knap (1985). "Trace metals and hydrocarbons in sediments from the Southampton water region, with particular reference to the influence of oil refinery effluent." Marine Environmental Research **15**(1): 31-44.
- Arnaud, P. (1997). Cours de chimie physique, Dunod.
- Azimi, S. (2000). Caractérisation des retombées atmosphériques métalliques en milieu urbain : comparaison avec le milieu rural, Rapport de DEA sciences et techniques de l'environnement, Université Paris XII-Val de Marne, Ecole Nationale des Ponts et Chaussées, Ecole Nationale du Génie Rural des Eaux et Forêts.
- Balls, P. (1985). "Trace metals in the Northern North Sea." Marine pollution Bulletin **16**(5): 203 - 207.
- Baqué, D., P. Oliva, N. Jacquement, L. Crouzel, M. Loubet et B. Dupré Etude géochimique des eaux du bassin de la Garonne. Caractérisation du fond géochimique naturel et des apports anthropiques. Laboratoire d'étude des mécanismes de transfert en géologie. Université Paul Sabatier.
- Barata, C., D. Baird, S. Mitchell et A. Soares (2002). "Among - and within-population variability in tolerance to cadmium stress in natural populations of *Daphnia magna*: implications for ecological risk assessment." Envir. Toxicol. Chem. **21**(5): 1058-1064.
- Benedetti, M. F., C. J. Milne, D. G. Kinniburgh, W. H. Van Riemsdijk et L. K. Koopal (1995). "Metal ion binding to humic substances: application of the Non-Ideal Competitive Adsorption model." Environ. Sci. & Technol. **29**(2): 446-457.
- Bewers, J. et P. Yeats (1989). "Transport of river-derived trace metals through the coastal zone." Neth. J. Sea Res.(23): 359-368.
- Bianchini, A. et K. C. Bowles (2002). "Metal sulfides in oxygenated aquatic systems: implications for the biotic ligand model." Comparative Biochemistry and Physiology Part C **133**: 51-64.
- Biger, E. (1996). Mesure du bruit de fond géochimique naturel et mise en évidence de l'influence anthropique en zone rurale: application au bassin de la Seine, Rapport de DEA hydrologie,

hydrogéologie, géostatistique et géochimie, Université Pierre et Marie Curie, Ecole des Mines de Paris, Ecole Nationale du Génie Rural des Eaux et des Forêts.

Blust, R., A. Fontaine et W. Declair (1991). "Effect of hydrogen ions and inorganic complexing on the uptake of copper by the brine shrimp *Artemia franciscana*." Mar. Ecol. Prog. Ser. **76**: 273-282.

Borgmann, U. et K. M. Ralph (1983). "Complexation and toxicity of copper and the free metal bioassay technique." Water Research **17**(11): 1697-1703.

Bourg, A. C. M., M. A. M. Kedziorek et C. Crouzet (2000). "Seasonal cycles of dissolved Cd, Mn and Zn in river water caused by variations in pH induced by biological activity." Aquatic Geochemistry **6**: 461-471.

Boutier, B., J. Chiffolleau, D. Auger et I. Truquet (1993). "Influence of the Loire River on dissolved lead and cadmium concentrations in coastal waters of Brittany." Estuarine, Coastal and Shelf Science **36**: 133-145.

Boyle, E., S. Chapnick, X. Bai et A. Spivack (1985). "Trace metal enrichments in the Mediterranean Sea." Earth and Planetary Science Letters **74**: 405-419.

Brown, P. L. et S. J. Markich (2000). "Evaluation of the free ion activity model of metal-organism interaction: extension of the conceptual model." Aquatic Toxicology **51**: 177-194.

Brügmann, L., L. Danielsson, B. Magnusson et S. Westerlund (1985). "Lead in the North Sea and the north east Atlantic Ocean." Marine Chemistry **16**: 47-60.

Bruland, K. et R. Franks (1983). Mn, Ni, Cu & Cd in the western North Atlantic. Trace metals in sea water. New-York, Wong C.S., Boyle E.A., Bruland K.W., Burton J.D. & Goldberg E.D. (Eds). Plenum Press: 395-415.

Campbell, P. G. C. (1995). Interactions between trace metals and aquatic organisms: a critique of the free-ion activity model. Metal speciation and bioavailability in aquatic systems. A. Tessier and D. R. Turner.

Campbell, P. G. C., O. Errécalde, C. Fortin, V. P. Hiriart-Baer et B. Vigneault (2002). "Metal bioavailability to phytoplankton-applicability of the biotic ligand model." Comparative Biochemistry and Physiology Part C **133**: 189-206.

Chakoumakos, C., R. C. Russo et R. V. Thurston (1979). "Toxicity of copper to Cutthroat trout (*Salmo clarki*) under different conditions of alkalinity, pH, and hardness." Env. Sci. Techn. **13**(2): 213-219.

Coquery, M. et D. Cossa (1995). "Mercury speciation in surface waters of the North Sea." Neth. J. Sea Res. **34**: 245-257.

Cossa, D. et C. Fileman (1991). "Mercury concentrations in surface waters of the English channel: a cooperative study." Mar Pollut Bull **22**: 197-200.

Cossa, D., P. Michel, J. Noel et D. Auger (1992). "Vertical profile of total mercury in relation to arsenic, cadmium and copper distributions at the Eastern North Atlantic ICES reference station (46°N; 6°W)." Oceanol. Acta **15**: 603-608.

Cossa, D., J. Sanjuan et J. Noel (1994). "Mercury transport in the waters of the strait of Dover." Mar Pollut Bull **28**: 385-389.

- Cotzias, G. C. (1967). Importance of trace substances in environmental health as exemplified by manganese. University of Missouri's first annual conference on trace substances in environmental health, Missouri, USA, University of Missouri Press.
- Crist, R. H., J. R. Martin, P. W. Guptill et J. M. Eslinger (1990). "Interaction of metals and protons with algae. 2. Ion exchange in adsorption and metal displacement by protons." Environ. Sci. & Technol. **24**(3): 337-342.
- Crist, R. H., K. Oberholser, D. Schwartz, J. Marzoff, D. Ryder et D. R. Crist (1988). "Interactions of metals and protons with algae." Environ. Sci. & Technol. **22**(7): 755-760.
- De Schamphelaere, K. A. C., D. G. Heijerick et C. R. Janssen (2002b). "Refinement and field validation of a biotic ligand model predicting acute copper toxicity to *Daphnia magna*." Comparative Biochemistry and Physiology Part C **133**: 243-258.
- De schamphelaere, K. A. C., D. G. Heijerick et C. R. Janssen (2003). Development and validation of biotic ligand models for predicting chronic zinc toxicity to fish, daphnids and algae. Report prepared for the International Lead Zinc Research Organization (ILZRO), ZEH-WA-01.
- De Schamphelaere, K. A. C. et C. R. Janssen (2002a). "A biotic ligand model predicting acute copper toxicity for *Daphnia magna*: the effect of calcium, magnesium, sodium, potassium and pH." Environ. Sci. & Technol. **36**(1): 48-54.
- Depledge, M. H. et P. S. Rainbow (1990). "Models of regulation and accumulation of trace metals in marine invertebrates." Comp. Biochem. Physiol. C **97**: 1-7.
- Di Toro, D. M., H. E. Allen, H. L. Bergman, J. S. Meyer, P. R. Paquin et R. C. Santore (2001). "Biotic ligand model of the acute toxicity of metals. 1. Technical basis." Environmental Toxicology and Chemistry **20**(10): 2383-2396.
- Dwane, G. C. et E. Tipping (1998). "Testing a humic speciation model by titration of copper-amended natural waters." Environment International **24**(5/6): 609-616.
- Elbaz-Poulichet, F., C. Braungardt, E. Achterberg, N. Morley, D. Cossa, J. Beckers, P. Nomérange, A. Cruzado et M. Leblanc (2001). "Metal biogeochemistry in the Tinto-Odiel rivers (Southern Spain) and in the Gulf of Cadiz: a synthesis of the results of TOROS project." continental Shelf Research **21**: 1961-1973.
- Erickson, R. J., D. A. Benoit, V. R. Mattson, H. P. Nelson et E. N. Leonard (1996). "The Effects of Water Chemistry On the Toxicity of Copper to Fathead Minnows." Environmental Toxicology & Chemistry **15**(2): 181-193.
- Errecalde, O., M. Seidl et P. G. C. Campbell (1998). "Influence of a low molecular weight metabolite (citrate) on the toxicity of cadmium and zinc to the unicellular green alga *Selenastrum capricornutum*: an exception to the free-ion model." Water Research **32**(2): 419-429.
- Förstner, U. et G. Wittman (1983). Metal pollution in the aquatic environment. Berlin, Springer Verlag.
- Garret, G. G. (2000). "Natural sources of metals to the environment." Human & Ecological Risk Assessment **6**(6): 945-963.
- Gensemer, R. W. et R. C. Playle (1999). "The Bioavailability and Toxicity of Aluminum in Aquatic Environments." Critical Reviews in Environmental Science and Technology **29**(4): 315-450.



- Gustafsson, J. P. (2000). WinHumic V. Stockholm, Sweden.
- Haarich, M., W. Kienz, M. Krause, G. Zauke et D. Schmidt (1993). "Heavy metal distribution in different compartments of the Northern North Sea and adjacent areas." Dt. Hydrogr. Z. **45**: 313-336.
- Hagner, C. (2002). "Regional and Long-Term Patterns of Lead Concentrations in Riverine, Marine and Terrestrial Systems and Humans in Northwest Europe." Water, Air, & Soil Pollution **134**(1-4): 1-40.
- Hamilton, J. S. et M. P. Mehrle (1986). "Metallothionein in fish : review of its importance in assessing stress from metal contaminants." Transactions of the American Fisheries Society, **115**: 596-609.
- Heijerick, D., C. R. Janssen et W. M. De Coen (2003). "The combined Effects of Hardness, pH, and Dissolved Organic Carbon on the Chronic Toxicity of Zn to *D. magna*: Development of a Surface Response Model." Arch Environ Contam Toxicol **44**: 210-217.
- Heijerick, D. G., K. A. C. De Schamphelaere et C. R. Janssen (2002a). "Biotic ligand model development predicting Zn toxicity to the alga *Pseudokirchneriella subcapitata*: possibilities and limitations." Comparative Biochemistry and Physiology Part C **133**: 207-218.
- Her, N., G. Amy, D. Foss et J. Cho (2002). "Variations of molecular weight estimation by HP-size exclusion chromatography with UVA versus online DOC detection." Environ. Sci. & Technol. **36**: 3393-3399.
- Hjulström, F. (1935). "The morphological activity of rivers as illustrated by river Fyris." Bulletin of the Geological Institute Uppsala **25**: Chapter 3.
- Horowitz, A., M. Meybeck, Z. Idlafkih et E. Biger (1999). "Variations in trace element geochemistry in the Seine river basin based on floodplain deposits and bed sediments." Hydrological Processes **13**: 1329-1340.
- Howarth, R. S. et J. B. Sprague (1978). "Copper lethality to Rainbow trout in waters of various hardness and pH." Water Research **12**: 455-462.
- HydroGeoLogic, I. (1998). MINTEQA2/PRODEFA2, a geochemical assessment model for environmental systems: user manual supplement for version 4.0. US EPA.
- Hydroqual, I. (2002). The Biotic Ligand Model - Windows interface version. NY, USA.
- Kim, S. D., H. Ma, H. E. Allen et D. K. Cha (1999). "Influence of dissolved organic matter on the toxicity of copper to *Ceriodaphnia dubia*: effect of complexation kinetics." Envir. Toxicol. Chem. **18**(11): 2433-2437.
- Kinniburgh, D. G., C. J. Milne, M. F. Benedetti, J. P. Pinheiro, J. Filius, L. K. Koopal et W. H. Van Riemsdijk (1996). "Metal ion binding by humic acid: application of the NICA-Donnan model." Environ. Sci. & Technol. **30**(5): 1687-1698.
- Klerks, P. L. et C. Moreau (2001). "Heritability of resistance to individual contaminants and to contaminant mixtures in the sheepshead minnow (*Cyprinodon variegatus*)." Envir. Toxicol. Chem. **20**(8): 1746-1751.

- Klerks, P. L. et J. Weis (1987). "Genetic adaptation to heavy metals in aquatic organisms: a review." Environmental Pollution **45**: 173-205.
- Kraepiel, A., J. Chiffolleau, J. Martin et F. Morel (1997). "Geochemistry of trace metals in the Gironde estuary." Geochimica et Cosmochimica Acta **61**(7): 1421-1436.
- Kremling, K. (1985). "The distribution of cadmium, copper, nickel, manganese, and aluminum, in surface waters of the open Atlantic and European shelf area. ." Deep-Sea Research **32**(5A): 531-555.
- Kremling, K. et C. Pohl (1989). "Studies on the spatial and seasonal variability of dissolved cadmium, copper and nickel in North-East Atlantic surface waters." Marine Chemistry **27**: 43-60.
- Laane, R., H. Sonneveldt, A. Van der Weyden, J. Loch et G. Groeneveld (1999). "Trends in the spatial and temporal distribution of metals (Cd, Cu, Zn and Pb) and organic compounds (PCBs and PAHs) in Dutch coastal zone sediments from 1981 to 1996: a model case study for Cd and PCBs." Journal of Sea Research **41**(1-2): 1-17.
- Laane, R. e. (1992). Background concentrations of natural compounds in rivers, sea water, atmosphere and mussels. Ministry of transport, public works and water management., DGW-92.033.
- Lambert, C., E. Nicolas, A. Veron, P. Buat-Menard, G. Klinkhammer, P. Le Corre et P. Morin (1991). "Anthropogenic lead cycle in the northeastern Atlantic." Oceanologica acta **14**(1): 59-66.
- Laumond, F., G. Copin-Montegut, P. Courau et E. Nicolas (1984). "Cadmium, copper and lead in the western Mediterranean Sea." Marine Chemistry **15**: 251-261.
- Lauren, D. J. et D. G. McDonald (1986). "Influence of water hardness, pH, and alkalinity on the mechanisms of copper toxicity in juvenile rainbow trout, *Salmo gairdneri*." Can J Fish Aquat Sci **43**: 1488-1496.
- Leduc, C., Y. Husson et L. Viallefond (1996). Atlas géochimique des éléments métalliques sur le bassin Loire-Bretagne. BRGM, N 2234.
- Leenheer, J. A. et J. P. Croué (2003). "Characterizing dissolved aquatic organic matter." Environ. Sci. & Technol. (**01/2003**): 18A-26A.
- Lemma, A. et P. Yau (1974). "Studies on the Molluscicidal Properties of Endod (*Phytolacca dodecandra*): II. Comparative Toxicity of Various Molluscicides to Fish and Snails." Ethiop.Med.J. **12**(3): 109-114.
- Lichtfuss, R. et G. Brümmer (1981). "Natürlicher gehalt und anthropogearnreicherung von Schwermetallen in den Sedimenten von Elbe, Eider, Trave und Schwentine." Catena **8**: 251-264.
- Luria, S. et M. Delbrück (1943). "Mutations of bacteria from virus sensitivity to virus resistance." Genetics **28**: 491-511.
- Ma, H., H. E. Allen et Y. Yin (2001). "Characterization of isolated fractions of dissolved organic matter from natural waters and a wastewater effluent." Wat. Res. **35**(4): 985-996.
- Ma, H., S. D. Kim, D. K. Cha et H. E. Allen (1999). "Effect of kinetics of complexation by humic acid on toxicity of copper to *Ceriodaphnia dubia*." Environmental Toxicology and Chemistry **18**(5): 828-837.

MacRae, R. K., D. E. Smith, N. Swoboda-Colberg, J. S. Meyer et H. L. Bergman (1999). "Copper binding affinity of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) and brook trout (*Salvelinus fontinalis*) gills: implications for assessing bioavailable metal." Environmental Toxicology and Chemistry **18**(6): 1180-1189.

Markert, B. (1994). "The biological system of the elements (BSE) for terrestrial plants (glycophytes)." Sci. Tot. Environ **155**: 221-228.

Markich, S. J. et P. L. Brown (1998). "Relative importance of natural and anthropogenic influences on the fresh surface water chemistry of the Hawkesbury-Nepean river, south-eastern Australia." The Science of the Total Environment **217**: 201-230.

Mart, L. et H. Nuernberg (1986). "Cd, Pb, Cu, Ni and Co distribution in the German Bight." Marine Chemistry **18**(2-4): 197-213.

Martell, A. E., R. M. Smith et R. J. Motekaitis (1997). Critical stability constants of metal complexes database, version 4.0. NIST standard reference database 46. National Institute of Standards and Technology.

Mazon, A. F., C. C. C. Cerqueira et M. N. Fernandes (2002). "Gill cellular changes induced by Copper exposure in the south american tropical freshwater fish *Prochilodus scrofa*." Environmental Research Section A **88**: 52-63.

McGeer, J. C., K. V. Brix, J. M. Skeaff, D. K. DeForest, S. I. Brigham, W. J. Adams et A. Green (2003). "Inverse relationship between bioconcentration factor and exposure concentration for metals: implications for hazard assessment of metals in the aquatic environment." Environm. Toxicol. Chem. **22**(5): 1017-1037.

McGeer, J. C., R. C. Playle, C. M. Wood et F. Galvez (2000). "A physiologically based biotic ligand model for predicting the acute toxicity of waterborne silver to rainbow trout in freshwaters." Environ. Sci. & Technol. **34**: 4199-4207.

McLaughlin, M. J. et E. Smolders (2001). "Background zinc concentrations in soil affect the zinc sensitivity of soil microbial processes-a rationale for a metalloregion approach to risk assessments." Environmental Toxicology and Chemistry **20**(11): 2639-2643.

Mérian, E. (1991). Metals and their environment. Weinheim, VCH.

Meybeck, M. (1986). "Composition chimique des ruisseaux non pollués de France." Sci. Géol. Bull. **39**(1): 3-77.

Meybeck, M., A. Horowitz, C. Grosbois et Y. Gueguen (2003). "Changes in sediment-associated trace element concentrations in the Seine river basin (1994-2001)." J. Phys. IV France **107**: 871-874.

Meyer, J. S. (1999). "A mechanistic explanation of the ln(LC50) vs ln(hardness) ajustement equation for metals." Environ. Sci. & Technol. **33**(6): 908-912.

Meyer, J. S. (2002). "The utility of the terms "bioavailability" and "bioavailable fraction" for metals." Marine Environ. Res. **53**: 417-423.

Miller, T. G. et W. C. Mackay (1980). "The effects of hardness, alkalinity and pH of test water on the toxicity of copper to Rainbow trout (*Salmo gairdneri*)." Water Research **14**: 129-133.

Miquel, M. (2001). Rapport sur les effets des métaux lourds sur l'environnement et la santé. Office Parlementaire d'évaluation des choix scientifiques et technologiques., N° 2979 Assemblée Nationale, N°261 Sénat.

Monbet, P. et M. Coquery (2003). Approches analytiques pour l'évaluation de la biodisponibilité des métaux dans les milieux aquatiques. INERIS, DRC-CHEN-03-46822-PhM/JL-03.0672.

Morel, F. M. M. (1983). Principles of aquatic chemistry.

Morley, N., J. Burton et P. Statham (1990). Observations on dissolved trace metals in the Gulf of Lion. Water pollution research report n°20 EROS 2000. M. J. M. B. H. eds.: 309 - 328.

Naddy, R. B., W. A. Stubblefield, J. R. May, S. A. Tucker et J. R. Hockett (2002). "The effect of calcium and magnesium ratios on the toxicity of copper to five aquatic species in freshwater." Environmental Toxicology and Chemistry **21**(2): 347-352.

Négre, P., E. Petelet-Giraud, J. Barbier et E. Gautier (2003). "Surface water-groundwater interactions in an alluvial plain: chemical and isotopic systematics." Journal of Hydrology **277**: 248-267.

Newman, M. C. et C. H. Jagoe (1994). Ligands and the bioavailability of metals in aquatic environments. Bioavailability: physical, chemical and biological interactions. J. M. Heamlink, P. F. Landrum, H. L. Bergman and W. H. Benson. Boca Raton, USA, Lewis Publishers.

Nicolas, E., D. Ruiz-Pino, P. Buat-Ménard et J. Béthoux (1994). "Abrupt decrease of lead concentration in the Mediterranean sea : response to antipollution policy." Geophysical Research Letters **21**(19): 2119-2122.

Nieober, E. et D. H. S. Richardson (1980). "A biologically and chemically significant classification of metal ions." Environ. Pollut. **B1**: 3-26.

Nolting, R. et W. Helder (1990). Distribution of nickel in sediment and pore water in the Golfe du Lion (Mediterranean Sea). Water Pollution Research Report 20. EROS 2000. M. J.-M. B. H. (Eds).

Pagenkopf, G. K. (1983). "Gill Surface Interaction Model for trace metal toxicity to fishes: role of complexation, pH and water hardness." Env. Sci. Techn. **17**(6): 342-347.

Paquin, P. R., J. W. Gorsuch et S. Apte (2002). "The biotic ligand model: a historical overview." Comparative Biochemistry and Physiology Part C **133**: 3-35.

Parkhurst, D. L. et C. A. J. Appelo (1999). User's guide to PHREEQC (version 2) - A computer program for speciation, batch-reaction, one-dimensional transport, and inverse geochemical calculations. US Geological Survey.

Pereira-Ramos, L. (1989). Exploitation critique des résultats d'analyses de métaux sur sédiments et bryophytes dans le bassin Seine-Normandie - De 1979 à 1988 -. Agence de Bassin Seine Normandie, Institut d'Hydrologie et de Climatologie, Naturalia et Biologia.

Playle, R., D. Dixon et K. Burnison (1993a). "Copper and cadmium binding to fish gills: estimates of metal-gill stability constants and modeling of metal accumulation." Can J Fish Aquat Sci **50**: 2678-2687.

Playle, R., R. Gensemer et D. Dixon (1992). "Copper accumulation on gills of fathead minnows - influence of water hardness, complexation, and pH for the gill micro-environment." Environmental Toxicology and Chemistry **11**: 381-391.

- Puigdomenech, I. (2002). *Make Equilibrium Diagrams Using Sophisticated Algorithms*. Stockholm, Sweden, Royal Institute of Technology.
- Randall, D., B. Eddy et D. MacKinlay (2000). *Ion transfer across fish gills*. International Congress on the Biology of Fish, University of Aberdeen, Scotland.
- Rantisch, G. (2000). "Application of fuzzy clusters to quantify lithological background concentrations in stream-sediment geochemistry." *Journal of Geochemical Exploration* **71**: 73-82.
- Rathore, R. S. et B. S. Khangarot (2003). "Effects of water hardness and metal concentration on a freshwater Tubifex tubifex muller." *Water, Air and Soil Poll.* **142**: 341-356.
- Rich, H. W. et F. M. M. Morel (1990). "Availability of well-defined iron colloids to the marine diatom Thallasiosira weissflogii." *Limnol.Oceanogr.* **35**: 652-662.
- Ridgway, J., N. Breward, W. Langston, R. Lister, J. Rees et S. Rowlett (2003). "Distinguishing between natural and anthropogenic sources of metals entering the Irish Sea." *Applied Geochemistry* **18**: 283-309.
- Santore, R., D. Di Toro, P. Paquin, H. Allen et J. Meyer (2001). "Biotic ligand model of the acute toxicity of metals. II. Application to acute copper toxicity in freshwater fish and *Daphnia*." *Environ. Tox. Chem.* **20**(10): 2397-2402.
- Santore, R. C. et C. T. Driscoll (1995). The CHESS model for calculating chemical equilibria in soils and solutions. *Chemical equilibrium and reaction models*. A. P. S. R. Loeppert, and S. Goldberg. Madison, WI, American Society of Agronomy: 357-375.
- Schäfer, A. I., R. Mauch, T. D. Waite et A. G. Fane (2002). "Charge effects in the fractionation of natural organics using ultrafiltration." *Environ. Sci. & Technol.* **36**: 2572-2580.
- Schecher, W. D. et D. C. McAvoy (1998). *A chemical equilibrium program for personal computers*. Hallowell, ME, USA, Environmental Research Software.
- Schnitzer, M. et S. I. M. Skinner (1966). "Organo-metallic interactions in soil: 5. Stability constants of Cu<sup>++</sup>, Fe<sup>++</sup>, and Zn<sup>++</sup>-fulvic acid complexes." *Soil Sci.* **102**: 361-365.
- Schnitzer, M. et S. I. M. Skinner (1967). "Organo-metallic interactions in soil: 7. Stability constants of Pb<sup>++</sup>, Ni<sup>++</sup>, Mn<sup>++</sup>, Co<sup>++</sup>, Ca<sup>++</sup>, and Mg<sup>++</sup>-fulvic acid complexes." *Soil Sci.* **103**: 247-252.
- Slater, F., E. Boyle et J. Edmond (1976). "On the marine geochemistry of nickel." *Earth and planetary Science Letters* **31**: 119-128.
- Selinus, O. et K. Esbensen (1995). "Separating anthropogenic from natural anomalies in environmental geochemistry." *Journal of Geochemical Exploration* **55**: 55-66.
- Shaule, B. et C. Patterson (1983). Perturbation of natural lead profile in the Sargasso sea by industrial lead. In : . . . , *Trace metals in sea water*. New-York, Wong C.S., Boyle E.A., Bruland K.W., Burton J.D. & Goldberg E.D. (Eds), Plenum Press: 395-415.
- Slaveykova, V. I. et K. J. Wilkinson (2002). "Physicochemical aspects of lead bioaccumulation by *Chlorella vulgaris*." *Environ. Sci. & Technol.* **36**: 969-975.
- Slaveykova, V. I., K. J. Wilkinson, A. Ceresa et E. Pretsch (2003). "Role of fulvic acid on lead bioaccumulation by *Chlorella kesslerii*." *Environ. Sci. & Technol.* **37**: 1114-1121.

- Smith, R. M., A. E. Martell et R. J. Motekaitis (2003). NIST Standard Reference Database 46: critically selected stability constants of metal complexes database. Gaithersburg, National Institute of Standards and Technology.
- Spivack, A., S. Husted et E. Boyle (1983). Coper, nickel and cadmium in the surface waters of the Mediterranean. Trace metals in sea water. B. E. A. Wong C.S., Bruland K.W., Burton J.D. & Goldberg E.D. (Eds). Plenum Press. New-York: 505-512.
- Statham, P., S. Leclercq, V. Hart, M. Batte, Y. Auger, M. Wartel et J. Cheftel (1999). "Dissolved and particulate trace metal fluxes through the central English Channel, and the influence of coastal gyres." Continental Shelf Research **19**(15-16): 2019-2040.
- Struijs, J., R. Ritsema, R. van de Kamp et D. de Zwart (2000). Toxic pressure in surface water. A pilot of new monitoring techniques. RIVM, report 607200 003.
- Svecevicus, G. et M. Z. Vosyliene (1996). "Acute toxicity of copper to common freshwater fishes of Lithuania." Ekologija **2**: 17-21.
- Takacs, M., J. J. Alberts et P. K. Egeberg (1999). "Characterization of natural organic matter from eight norwegian surface waters : proton and copper binding." Environment International **25**(2/3): 315-323.
- Tao, S., A. Long, C. Liu et R. Dawson (2000). "The influence of mucus on copper speciation in the gill microenvironment of carp (*Cyprinus carpio*)." Ecotoxicol. Environ. Saf **47**: 59-64.
- Tao, S., Y. Wen, A. Long, R. Dawson, J. Cao et F. Xu (2001). "Simulation of acid-base condition and copper speciation in fish gill microenvironment." Computers and Chemistry **25**: 215-222.
- Tappin, A., D. Hydes, J. Burton et P. Statham (1993). "Concentrations, distributions and seasonal variability of dissolved Cd, Co, Cu, Mn, Ni, Pb and Zn in the English Channel." Cont. Shelf Res **13**(8-9): 941-969.
- Tappin, A., G. Millward, P. Statham, J. Burton et A. Morris (1995). "Trace metals in the central and southern North Sea." Estuarine, Coastal and Shelf Science **41**: 275-323.
- Tessier, L., P. Bonté, J. Mouchel, I. Lefèvre, S. Sogon, S. Ayrault et M. Le Cloarec (2002). "Transport et caractérisation des MES dans le bassin de la Seine : identification de signatures naturelles et anthropiques. Rapport d'activité PIREN 2002."
- Thomas, R. et M. Meybeck (1992). The use of particulate material. Water Quality Assessments. D. E. Chapman. London, Chapman & Hall Ltd: 212-270.
- Tipping, E. (1994). "WHAM - a chemical equilibrium model and computer code for waters, sediments and soils incorporating a discrete site / electrostatic model of ion binding by humic substances." Computer Geoscience **20**(6): 973-1023.
- Tipping, E. (1998). "Humic ion-binding model VI: an improved description of the interactions of protons and metal ions with humic substances." Aquatic Geochemistry **4**: 3-48.
- Tipping, E. et M. A. Hurley (1992). "A unifying model of cation binding by humic substances." Geochimica et Cosmochimica Acta **56**(10): 3627-3641.

Tipping, E. et C. Woof (1991). "The distribution of humic substances between the solid and aqueous phases of acid organic soils; A description based on humic heterogeneity and charge-dependent sorption equilibria." J. Soil Sci. **42**: 437-448.

Turekian, K. et K. Wedepohl (1961). "Distribution of the elements in some major units of the earth's crust." Geol. Soc. Amer. Bull. **72**: 175-192.

van de Berg, G. et J. Zwolsman (2000). Nieuwe methode voor inschatting van achtergrondconcentraties aan zware metalen in oppervlaktewater. DGRW/RIZA, Werkdocument 99.200X.

van der Weijden, C. et J. Middelburg (1989). "Hydrogeochemistry of the river Rhine: long term and seasonal variability, elemental budgets, base levels and pollution." Wat. Res. **23**(10): 1247-1266.

Vindimian, E. et J. Garric (1993). Bio-essais et bioindicateurs de toxicité dans le milieu naturel, Etude Inter-Agence n°17.

Welsh, P. G., J. F. Skidmore, D. J. Spry, D. G. Dixon, P. V. Hodson, N. J. Hutchinson et B. E. Hickie (1993). "Effect of pH and dissolved organic carbon on the toxicity of copper to larval fathead minnow (*Pimephales promelas*) in natural waters of low alkalinity." Can J Fish Aquat Sci **50**: 1356-1362.

Windom, H. (1988). A guide to the interpretation of metal concentrations in estuarine sediments. Skidaway Institute of Oceanography.

Yeats, P. et J. Campbell (1983). "Nickel, copper, cadmium and zinc in the Northwest Atlantic Ocean." Marine Chemistry **12**: 43-58.

Zhang, H. et R. Wollast (1990). Distributions of dissolved cobalt and nickel in the Rhone and in the gulf of Lions. Water Pollution Research Report 20. EROS 2000. M. J.-M. B. H. (Eds).

Zuurdeeg, B., R. van Enk et S. Vrien (1992). Natuurlijke achtergrondgehalten van zware metalen en enkele andere sporenelementen in Nederlands oppervlaktewater. (Unpubl), GEOCHEM Research Report by commission of VROM.