



Analyse critique des méthodologies pour la détermination et l'application de normes de qualité environnementale pour les métaux

Rapport de synthèse

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

*Responsables d'affaire : M. COQUERY (2) – H. MAGAUD (1)
V. BONNOMET (1) - F. LE GOFF (1) - P. MONBET (2)*

Direction des Risques Chroniques

(1) Unité « Evaluation des Risques Ecotoxicologiques »

(2) Unité « Chimie Analytique Environnementale »

13 JANVIER 2004

Analyse critique des méthodologies pour la détermination et l'application de normes de qualité environnementale pour les métaux

Rapport de synthèse

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

13 JANVIER 2004

PERSONNES AYANT PARTICIPE A L'ETUDE

V. BONNOMET – M. COQUERY – F. LE GOFF – H. MAGAUD –
 P. MONBET – A. MORIN

Ce document comporte 27 pages (hors couverture).

	Rédaction	Vérification	Approbation
NOM	V. BONNOMET ¹ F. LE GOFF ¹ Ph. MONBET ²	M. COQUERY ² H. MAGAUD ¹	A. MORIN ² E. THYBAUD ¹
Qualité	¹ Ingénieur à l'Unité Evaluation des Risques Ecotoxicologiques ² Ingénieur à l'Unité Chimie Analytique Environnementale	² Ingénieur à l'Unité Chimie Analytique Environnementale ¹ Ingénieur à l'Unité Evaluation des Risques Ecotoxicologiques	² Responsable de l'Unité Chimie Analytique Environnementale ¹ Responsable de l'Unité Evaluation des Risques Ecotoxicologiques
Visa			

TABLE DES MATIERES

RESUME	3
CONTEXTE	4
INTRODUCTION	5
1. DÉTERMINATION DES SEUILS DE QUALITÉ POUR LES MÉTAUX	7
1.1 MÉTHODE DU RISQUE AJOUTÉ	7
1.1.1 <i>Principes généraux du risque ajouté</i>	7
1.1.2 <i>Difficultés pour la détermination des concentrations naturelles de référence</i>	8
1.1.3 <i>Prise en compte de l'adaptation des espèces à leur environnement</i>	9
1.2 NOTION DE BIODISPONIBILITÉ	10
1.2.1 <i>Biodisponibilité dans l'eau</i>	10
1.2.1.1 Exposé de la problématique	10
1.2.1.2 BLM (Biotic Ligand Model): une méthode d'estimation de la biodisponibilité des métaux	11
1.2.1.3 Prise en compte de la biodisponibilité dans la détermination de seuils dans l'eau	12
1.2.2 <i>Biodisponibilité dans les sédiments</i>	14
1.3 DÉTERMINATION DE SEUILS DANS LES SÉDIMENTS	15
1.4 DÉTERMINATION DE SEUILS DANS LES ORGANISMES	16
2. APPLICATION DES SEUILS DE QUALITÉ POUR LES MÉTAUX	17
2.1.1 <i>Suivi dans l'eau</i>	17
2.1.1.1 Importance de la stratégie et du mode d'échantillonnage	17
2.1.1.2 Analyse des métaux et surveillance	17
2.1.2 <i>Suivi dans les sédiments</i>	20
2.1.2.1 Importance de l'échantillonnage ; paramètres à prendre en compte	20
2.1.2.2 Analyse des métaux et surveillance	21
2.1.2.3 AVS/SEM : une méthode d'évaluation de la toxicité des sédiments	21
2.1.3 <i>Suivi dans les organismes</i>	23
CONCLUSION	24
REFERENCES	26

RESUME

La Directive 2000/60/CE établissant un cadre pour une politique communautaire dans le domaine de l'eau (Directive Cadre sur l'Eau : DCE), contraint les Etats Membres à maintenir et améliorer la qualité de leur environnement aquatique d'ici 2015. L'article 16 de la Directive leur impose en particulier de respecter des normes de qualité environnementale pour les substances prioritaires proposées par la Commission européenne. Ces normes de qualité sont des concentrations « seuil » qui ne doivent pas être dépassées dans le milieu pour assurer la protection des écosystèmes et de la santé humaine.

Quatre métaux font parti de la liste des substances prioritaires : le cadmium, le plomb, le mercure, le nickel. La détermination des normes de qualité pour les métaux est particulièrement problématique en raison de leurs particularités (leur présence naturelle, le caractère essentiel de certains d'entre eux, la capacité d'adaptation des espèces aux concentrations naturelles, leur spéciation et l'impact des caractéristiques physico-chimiques du milieu sur leur biodisponibilité) qui les différencient des substances organiques. De même, le suivi de leur présence dans le milieu et l'application des normes de qualité soulèvent un certain nombre de questions et de problèmes, abordés par les experts chargés de la mise en place de ces aspects de la DCE.

Ce rapport synthétise l'ensemble des connaissances spécifiques aux métaux, concernant la méthodologie pour la détermination des normes de qualité environnementale ainsi que les techniques pour leur mise en application.

CONTEXTE

La Directive 2000/60/CE du Parlement Européen et du Conseil du 23 octobre 2000 établissant un cadre pour une politique communautaire dans le domaine de l'eau (Directive Cadre sur l'Eau : DCE), contraint les Etats Membres à maintenir et améliorer la qualité de leur environnement aquatique d'ici 2015.

L'article 16 de la Directive leur impose en particulier de respecter des normes de qualité environnementale pour les substances prioritaires proposées par la Commission européenne. Ces normes de qualité sont des concentrations « seuil » qui ne doivent pas être dépassées dans le milieu pour assurer la protection des écosystèmes et de la santé humaine.

La Décision 2455/2001/CE a établi une liste de 33 substances prioritaires pour lesquelles des normes de qualité (ou seuils de qualité) doivent être déterminées par la Commission Européenne. Quatre métaux en font partie : le cadmium, le plomb, le mercure, le nickel. En raison de leurs particularités (présence naturelle, caractère essentiel, caractéristiques physico-chimiques, etc.) qui les différencient des substances organiques la détermination des normes de qualité pour les métaux est particulièrement problématique. De même le suivi de leur présence dans le milieu et l'application des normes de qualité soulèvent un certain nombre de questions et de problèmes, abordés par les experts chargés de la mise en place de ces aspects de la Directive.

Toutes ces questions et tous ces problèmes n'ont pas été résolus. De nombreux travaux seront nécessaires pour évaluer de manière plus pertinente les effets des métaux dans les milieux aquatiques. Cependant, en raison des délais réglementaires fixés par la Directive Cadre, un certain nombre de choix ont été ou sont sur le point d'être effectués, soit par la Commission Européenne, soit par les Etats Membres.

L'objectif de ce rapport est de synthétiser l'ensemble des connaissances relatives aux différents aspects méthodologiques spécifiques aux métaux, qui ont suscité et susciteront certainement dans le futur des discussions. Cela concerne la méthodologie pour la détermination des normes de qualité environnementale ainsi que les techniques pour leur mise en application.

INTRODUCTION

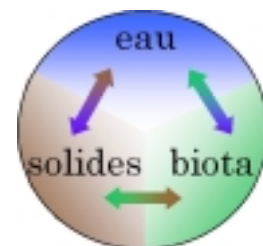
Les éléments métalliques sont des constituants naturels de la croûte terrestre qui peuvent se disséminer, notamment dans l'environnement aquatique, par l'intermédiaire de phénomènes tels que l'érosion ou le volcanisme. Indépendamment de tout apport anthropique, de grandes différences (plusieurs ordres de grandeur) peuvent ainsi être observées dans les concentrations naturelles des masses d'eau selon la nature géologique du bassin versant ou la proximité d'une éventuelle activité volcanique. **Certains écosystèmes sont ainsi naturellement très riches en éléments métalliques** alors que d'autres ne le sont pas.

Certains métaux, comme le cuivre, le zinc ou le fer, sont essentiels aux organismes vivants parce qu'ils sont nécessaires à la structure moléculaire de nombreuses co-enzymes. Cependant, au-delà d'une certaine concentration, ils deviennent toxiques. D'autres éléments traces (comme le mercure, le plomb ou le cadmium) n'ont pas de rôle biologique apparent et sont toxiques même à faibles concentrations. Mais **les espèces vivantes peuvent s'adapter** à leur environnement et notamment aux concentrations naturelles en métaux qui peuvent être très variables. La variabilité de ces concentrations naturelles contribue ainsi à la diversité des milieux.

A la différence de la grande majorité des polluants organiques, les métaux ne sont pas synthétisés par l'homme. En revanche, leur distribution dans l'environnement et leurs formes chimiques peuvent être modifiées par les activités anthropiques. **L'exploitation et l'utilisation des métaux par l'homme peuvent exagérément augmenter leur dissémination** dans des écosystèmes qui n'y sont pas exposés naturellement. Les espèces qui ne sont pas adaptées pour vivre en présence de concentrations élevées en métaux peuvent ainsi être mises en danger.

Véhiculés généralement par les eaux de ruissellement ou par l'atmosphère (poussières, pluie), **les métaux vont contaminer progressivement le milieu aquatique** : l'eau, les sédiments et les organismes vivant dans ce milieu. Ces trois compartiments sont interdépendants ; il existe en effet des échanges entre les phases aqueuse, solide et biotique. Les métaux sont donc distribués entre ces trois phases :

- sous forme libre (ionique) ou complexée dans l'eau
- adsorbés sur les particules en suspension ou sédimentaires,
- accumulés dans les tissus des organismes vivants (biota)



Par ailleurs, les métaux sont présents au sein des différentes phases, sous différentes formes chimiques. On parle de **spéciation**. Celle-ci est liée aux caractéristiques physico-chimiques du milieu.

Dans le milieu aquatique, les différentes formes chimiques d'un élément n'ont pas la même toxicité vis à vis des organismes vivants. Les **formes biodisponibles** sont les formes susceptibles **d'induire un effet sur les organismes**.

La **Directive Cadre sur l'Eau 2000/60/CE** (article 2, définition 35) spécifie qu'**une norme (ou seuil) de qualité environnementale** correspond à « la concentration d'un polluant ou d'un groupe de polluants dans l'eau, les sédiments ou le biote qui ne doit pas être dépassée, afin de protéger la santé humaine et l'environnement ». Ceci implique que ce seuil puisse protéger les organismes pélagiques¹, les organismes benthiques², les prédateurs (se nourrissant des organismes aquatiques), et la santé humaine (en s'assurant notamment que les normes pour l'eau potable³ et pour les denrées destinées à l'alimentation humaine soient respectées⁴).

La détermination des seuils de qualité nécessite donc de prendre en compte les dangers pour les organismes pélagiques et benthiques, les prédateurs et l'homme. Mais, comment prendre en compte les concentrations naturelles des métaux et ne considérer que les effets induits par les apports anthropiques ? Comment évaluer la toxicité des métaux vis à vis des organismes aquatiques ? Leur intoxication peut se faire par l'eau, par l'ingestion de particules solides, éventuellement par la prédation. Mais pour chacune de ces voies, comment prédire la fraction qui sera effectivement disponible et toxique pour les organismes, *i.e.* la fraction dite biodisponible ?

Par ailleurs, la mise en application des seuils de qualité nécessite la comparaison des concentrations de métaux mesurées dans le milieu aux valeurs des seuils définies. Comment les concentrations en métaux peuvent être mesurées *in situ* : dans l'eau, les sédiments, les organismes ? Est-il possible de ne suivre que la fraction biodisponible ?

Ce rapport propose une synthèse des connaissances actuelles pour tenter de répondre à ces questions. Deux rapports techniques présentent les travaux détaillés réalisés par l'INERIS sur les méthodes de spéciation et la biodisponibilité (Monbet and Coquery, 2003 ; Le Goff and Bonnet, 2003).

∇ Evaluation des risques pour les métaux : règlement européen pour les substances existantes

Les risques liés à la présence de certains métaux ont été évalués (cas du **cadmium** et de certains composés du **chrome**) ou sont en cours d'évaluation (cas du **zinc** et du **nickel**) dans le cadre de la réglementation européenne sur les substances existantes (Règlement 793/93/CE, E.C., 1993). Le **cuivre** et le **plomb** sont en cours d'évaluation dans le cadre d'un programme volontaire de l'industrie en liaison avec le Règlement 793/93. Les approches et les choix qui ont été faits pour évaluer les risques liés à ces métaux, en particulier le zinc et le cadmium, sont repris dans ce rapport pour illustrer nos propos.

¹ vivant dans la colonne d'eau

² vivant au contact des sédiments

³ en particulier la Directive 98/83/CE relative à la qualité des eaux destinées à la consommation humaine ou, à défaut, les recommandations de l'OMS

⁴ règlement 466/2001/CE relatif à la fixation de teneurs maximales pour certains contaminants dans les denrées alimentaires

1. DETERMINATION DES SEUILS DE QUALITE POUR LES METAUX

1.1 METHODE DU RISQUE AJOUTE

1.1.1 Principes généraux du risque ajouté

Pour atteindre un bon état écologique et chimique des masses d'eau il est nécessaire de contrôler l'apport anthropique en métaux, comme pour toute autre substance toxique. Dans la Directive Cadre sur l'Eau (DCE), le bon état chimique est défini par rapport à des concentrations naturelles de référence, déterminées dans des conditions non perturbées par l'activité humaine, alors que jusqu'à présent, en France, le SEQ-Eau (Agences de l'Eau, 1999) définit la qualité de l'eau suivant différents usages⁵. Dans le cas particulier des métaux, les concentrations naturelles de référence peuvent être localement élevées. Ainsi, une masse d'eau pour laquelle la concentration en éléments métalliques est élevée de façon naturelle, en dehors de toute pollution anthropogénique, sera déclarée impropre pour certains usages suivant le SEQ-Eau mais ne serait pas classée «en mauvais état» selon la DCE.

∇ Quelques définitions

- Concentration naturelle (Cf. partie 1.1.2) : concentration présente dans l'environnement ayant une origine exclusivement naturelle.
- Concentration ambiante : somme de la concentration naturelle et des apports anthropiques diffus. La concentration ambiante correspond à la concentration mesurée dans le milieu naturel en dehors de tout site soumis à une forte pression anthropique (rejet ponctuel).

Pour l'application de l'article 16 de la DCE, qui impose de définir des seuils de qualité pour les substances prioritaires, il a ainsi été décidé de prendre en compte les concentrations naturelles des métaux (Lepper, 2002) (EAF(6) *on priority substances*, 17-18 novembre 2003, Bruxelles). Pour les métaux inscrits sur la liste des substances prioritaires (cadmium, plomb, mercure, nickel) il est proposé d'établir les seuils de qualité par la méthode dite du risque ajouté.

Cette méthode, initialement proposée par Struijs *et al.*, 1997 puis modifiée par Crommentuijn *et al.*, 2000, a été développée aux Pays Bas où il a été constaté que la plupart des concentrations en métaux mesurées dans l'environnement étaient supérieures aux seuils de qualité déterminés en laboratoire. La méthode du risque ajouté tient compte des concentrations naturelles en métaux et propose de déterminer un apport anthropique à ne pas dépasser. La norme de qualité (QS : *Quality Standard*) est alors calculée comme étant la somme de la concentration naturelle (Cb : *Background Concentration*) et de la concentration maximale ajoutée dans l'environnement de façon anthropogénique (MPA : *Maximum Permissible Addition*) :

$$QS = Cb + MPA$$

Actuellement dans le cadre de la détermination des normes de qualité environnementale, la MPA est déterminée comme une PNEC⁶, selon les guides techniques européens établis en support de la réglementation sur les substances chimiques (E.C., 2003).

⁵ Dans le SEQ-Eau, ces usages sont : l'aptitude de l'eau à la biologie, l'eau potable, les loisirs et sports aquatiques, l'irrigation, l'abreuvement, l'aquaculture

⁶ *Predicted No Effect Concentration* (concentration prédite sans effet)

La concentration naturelle (C_b) peut être déterminée, par exemple, par des prélèvements sur des sites épargnés de toute pollution anthropogénique ou par modélisation géochimique (Cf. Le Goff and Bonnet, 2003).

▼ A retenir

- La méthode du risque ajouté a été proposée pour dériver des seuils de qualité pour les substances naturelles, en particulier les métaux, afin de ne pas déterminer des seuils en deçà des concentrations naturelles.
- Actuellement, le seuil de qualité est calculé par la somme de la MPA, correspondant à la PNEC déterminée en laboratoire, et de la concentration naturelle dans le milieu.

1.1.2 Difficultés pour la détermination des concentrations naturelles de référence

Les sites préservés de toute pollution sont rares en Europe, et la détermination des concentrations de référence n'est pas nécessairement facile. Elle dépend de l'homogénéité géologique du bassin hydrographique.

Par exemple, le bassin Seine-Normandie, drainant des terrains sédimentaires, a des concentrations en métaux homogènes et naturellement basses. Ainsi, dans le cadre du programme PIREN-Seine⁷, la concentration de référence en métaux pour le bassin de la Seine a pu être évaluée à partir de prélèvements (matières en suspension et sédiments principalement) sur des ruisseaux forestiers en tête de bassin.

Le cas des bassins drainant des terrains cristallins, naturellement riches en métaux, est plus complexe : de très fortes teneurs naturelles peuvent être localement observées (présence de filons métallifères). Pour ces bassins, on peut alors s'attendre à trouver de larges variations spatiales et temporelles des concentrations naturelles. Par exemple, la Loire traverse des régions avec des fonds lithologiques très variés (Leduc *et al.*, 1996). Des hétérogénéités locales pour le bassin de la Garonne sont également observées (Baqué *et al.*,). Le Rhin est majoritairement alimenté en été par la fonte des glaciers alpins, alors qu'en hiver ce sont les eaux de ruissellement des plaines qui apportent la plus grosse contribution aux eaux du fleuve ; une variation saisonnière de la géochimie du Rhin est ainsi observée (van der Weijden and Middelburg, 1989).

Le BRGM⁸ et la SNEA (P)⁹ ont réalisé entre 1975 et 1993 un inventaire minier du territoire métropolitain. Des données géochimiques, recueillies notamment dans les sédiments de ruisseaux et dans les sols en fond de vallon, sont donc disponibles pour les principaux métaux d'intérêt métallurgique. Il est donc possible d'identifier les régions géologiques naturellement riches ou non en éléments métalliques.

Pour la DCE, il est prévu par la Commission Européenne que la méthodologie pour élaborer les concentrations naturelles soit soumise à un comité scientifique.

⁷ Programme Interdisciplinaire de Recherches Environnementales sur la Seine.
<http://www.sisyphes.jussieu.fr/internet/piren/>

⁸ Bureau de Recherches Géologiques et Minières

⁹ Société Nationale Elf Aquitaine (Pétroles)

▽ A retenir

- Il est essentiel de distinguer la concentration naturelle en métaux de la concentration ambiante. La concentration naturelle dépend directement de la nature géologique du bassin versant. En France, des données géologiques sont disponibles mais l'extrapolation aux concentrations dans l'eau est problématique : la géologie de certains bassins est très hétérogène et la diffusion dans l'eau varie en fonction des conditions météorologiques. Il n'existe pas à l'heure actuelle de consensus sur une méthodologie pour la détermination de ces concentrations naturelles.

1.1.3 Prise en compte de l'adaptation des espèces à leur environnement

De nombreuses études (Cf. Le Goff and Bonnomet, 2003) suggèrent que les espèces vivant au sein de biotopes naturellement riches en éléments métalliques y sont adaptées. Autrement dit, les espèces adaptées pour vivre à des concentrations élevées en métaux ont été sélectionnées. Ainsi, les niveaux de sensibilité des organismes vivants peuvent être très différents entre les écosystèmes¹⁰. La diversité biologique entre écosystèmes est donc en partie induite par les différences de concentration naturelle en métaux.

La concentration maximale ajoutée (MPA) est déterminée à partir des résultats d'essais d'écotoxicité. Pour chaque concentration naturelle, il serait nécessaire d'effectuer des essais d'écotoxicité avec des espèces adaptées à ces mêmes concentrations naturelles. Par conséquent, la MPA serait différente selon la concentration naturelle du milieu. En pratique, comme il n'est pas possible de multiplier ainsi les essais, une MPA unique est estimée à partir de tous les résultats disponibles.

Struijs *et al.*, 1997 ont essayé de déterminer une MPA dépendant de la concentration naturelle, mais n'ayant pas pu tenir compte des sensibilités différentes des espèces dans chacun de ces milieux, cette méthode ne s'est pas avérée applicable.

Par conséquent, actuellement, le même ajout (MPA) est toléré quelle que soit la concentration naturelle.

▽ A retenir

- La méthode du risque ajouté ne tient pas compte des différences de sensibilités aux métaux des espèces adaptées à différents milieux (y compris en laboratoire). Les communautés d'espèces sont en effet adaptées à leur environnement et en particulier aux concentrations naturelles en métaux. L'intensité des effets induits par les apports anthropiques dépend en partie de cette adaptation.
- Pour estimer la concentration maximum ajoutée (MPA), il serait préférable de prendre en compte la concentration naturelle. Malheureusement, à ce jour, les connaissances sur ces phénomènes d'adaptation sont encore trop partielles. Par conséquent, actuellement, la MPA est estimée indépendamment de la concentration naturelle.

¹⁰ De même, la sensibilité des organismes adaptés aux conditions de laboratoire n'est pas la même que celles des organismes du milieu naturel

1.2 NOTION DE BIODISPONIBILITE

Pour que les métaux présents dans les différents compartiments de l'environnement exercent un effet sur les organismes vivants, 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. Il existe dans la littérature plusieurs définitions de la biodisponibilité. 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.

▼ La biodisponibilité

- Selon (Newman and 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.

1.2.1 Biodisponibilité dans l'eau

1.2.1.1 Exposé de la problématique

Les métaux sont présents dans l'environnement sous différentes formes chimiques. Dans les eaux naturelles, ils se trouvent dans la phase dissoute et dans la phase particulaire. La phase dissoute comprend des métaux sous forme d'ions hydratés, de complexes inorganiques et organiques. Dans cette phase, les métaux peuvent aussi être associés à la fraction colloïdale. Dans la phase particulaire, les métaux sont liés aux particules depuis l'adsorption faible jusqu'à la liaison au sein même de la matrice minérale.



▼ Quelques définitions

- 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 l'eau (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 ionique (ex : Cu²⁺), généralement hydratée (ex : Cu(H₂O)₆²⁺). Les espèces « libres » appartiennent à la fraction métallique dissoute.

Les proportions des différentes formes chimiques d'un métal dans un milieu dépendent des caractéristiques physico-chimiques de ce milieu (température, dureté, présence de matière organique, de cations, d'autres métaux, etc.). Seules certaines formes du métal (ions libres hydratés, certaines espèces inorganiques et organiques) peuvent être assimilables. Par ailleurs, selon l'organisme considéré, les modes d'assimilation peuvent être différents. Pour un même organisme, des facteurs comme l'âge, la taille, le cycle de reproduction peuvent aussi modifier les modes d'assimilation. Par conséquent, seule une fraction de la concentration totale en métal présente dans le milieu est biodisponible pour un organisme.

Classiquement, la détermination des normes de qualité dans l'eau s'effectue à partir de résultats d'essais d'écotoxicité réalisés en laboratoire. Dans les conditions de laboratoire, la majeure partie du métal se trouve sous forme dissoute. La totalité du métal introduit dans le milieu d'essai est alors considérée comme biodisponible. Ces conditions sont éloignées de celles des milieux aquatiques naturels. L'extrapolation des effets associés à des conditions environnementales spécifiques à partir des essais d'écotoxicité est alors problématique.

Comment la biodisponibilité des métaux peut-elle être prise en compte pour la détermination de seuils de qualité ? Dans l'eau, en réponse à une demande de l'US-EPA, des modèles dits BLM ont été développés afin d'estimer la biodisponibilité des métaux. Ces modèles ainsi que d'autres approches sont utilisés pour prendre en compte la biodisponibilité lors de la détermination de seuils dans l'eau.

1.2.1.2 BLM (Biotic Ligand Model): une méthode d'estimation de la biodisponibilité des métaux

Les BLM sont des modèles qui permettent d'obtenir une estimation de la toxicité aiguë des métaux vis à vis des organismes aquatiques en fonction de certains paramètres caractéristiques d'un environnement donné (pH, matières organiques dissoutes, dureté, etc.).

L'une des hypothèses fondamentales des BLM est que le système (eau et organisme vivant) est à l'équilibre. Cette hypothèse permet d'adopter une démarche similaire à celle utilisée en modélisation de spéciation chimique classique, c'est-à-dire l'utilisation de constantes d'équilibre thermodynamiques¹¹. Ces dernières sont calculées pour caractériser les réactions de complexation entre le métal et des ligands inorganiques (e. g. OH⁻, CO₃²⁻) ou organiques (acides humiques) mais aussi les réactions entre le métal et le ligand biotique (e. g. sites récepteurs à la surface des branchies). L'estimation de la complexation des ions métalliques par des ligands inorganiques est réalisée au moyen de modèles de spéciation géochimique (e. g. CHESS ou MINEQL+) avec des constantes de stabilité provenant de bases de données (e. g. NIST : Smith *et al.*, 2003). En ce qui concerne la complexation avec la matière organique, la modélisation est plus difficile du fait de la grande variabilité des ligands naturels. Des modèles spécifiques sont généralement utilisés (e. g. model V du WHAM). Ces modèles sont décrits en détail dans Le Goff and Bonnomet, 2003. L'originalité des BLM réside dans l'hypothèse selon laquelle une certaine accumulation de métal sur ou dans un organisme (par exemple les branchies pour les poissons) est létale. Autrement dit, une mortalité est observée quand le complexe formé entre le métal et le ligand biotique atteint une concentration critique (MacRae *et al.*, 1999). Le ligand biotique correspond au site d'action toxique pour un organisme. Les BLM permettent, outre l'estimation de la toxicité de l'ion libre (espèce considérée comme la plus toxique), l'estimation de la toxicité d'autres espèces métalliques présentes (hydroxydes, chlorures, complexes faibles avec la matière organique).

¹¹ Pour l'instant seul l'aspect thermodynamique est pris en compte dans le BLM. L'effet de la cinétique pourrait avoir son importance dans les situations où de faibles concentrations en métaux sont en jeu. La diffusion du métal à partir de l'eau pourrait être alors l'étape limitante des réactions chimiques. Ainsi certains métaux atteignent l'équilibre thermodynamique lentement (Ni²⁺, Al³⁺, Co³⁺, Cr³⁺) - Ma, H., S. D. Kim, et al. (1999). "Effect of kinetics of complexation by humic acid on toxicity of copper to *Ceriodaphnia dubia*." Environmental Toxicology and Chemistry **18**(5): 828-837.

Les limitations de l'utilisation des BLM pour la détermination de seuils sont multiples. Premièrement ces modèles n'intègrent que des résultats de tests aigus¹² pour établir les relations entre les quantités de métal accumulées au ligand biotique et la toxicité. Les effets susceptibles d'apparaître à plus long terme (effets sur la reproduction par exemple) ne sont pas considérés.



Une deuxième limitation réside dans la validité des modèles de spéciation. En effet, des bases de constantes thermodynamiques de référence existent pour les réactions de formation de complexes inorganiques (Smith *et al.*, 2003) mais pas pour la complexation avec la matière organique et le ligand biotique où les quelques constantes définies varient selon le type de matière organique et l'espèce biologique testée. On n'a ainsi pas encore de données précises sur la variation inter espèces pour ces constantes.

▼ A retenir

- Les modèles dits "BLM" ont été développés pour prendre en compte la spéciation des métaux, c'est à dire les différentes formes chimiques des métaux (dont les proportions dépendent des caractéristiques physico-chimiques du milieu), lors de l'évaluation de la toxicité. Ils permettent donc de prédire la toxicité dans un milieu aquatique donné.
- Ces modèles ont été développés pour quelques espèces aquatiques (poisson, daphnies, algues) et quelques métaux (cuivre, zinc, argent). Ils sont toujours en développement pour d'autres espèces et nécessitent encore des phases de validation. Il existe également, dans la littérature, quelques exemples pour lesquels l'utilisation d'un modèle BLM n'a pas été concluante.

1.2.1.3 Prise en compte de la biodisponibilité dans la détermination de seuils dans l'eau

Initialement, les concentrations de métaux prises en compte pour l'élaboration des critères de qualité aquatiques aux Etats-Unis (WQC : *Water Quality Criteria*, US-EPA, 2002) étaient basées sur les concentrations totales. Depuis 1993, l'US-EPA recommande l'utilisation de la fraction dissoute des métaux pour la détermination de ces critères puisqu'il a été montré que la fraction dissoute permet une meilleure estimation de la fraction biodisponible que le métal total. En Europe, l'évaluation des risques pour les métaux dans le cadre du règlement 793/93 se base également sur les concentrations dissoutes. Pour la détermination des normes de qualité environnementale des métaux de la DCE, ce sont également des concentrations dissoutes qui seront *a priori* retenues.

Deux méthodes existent pour prendre en compte la biodisponibilité des métaux :

- ❶ la détermination de plusieurs seuils dépendant des caractéristiques physico-chimiques du milieu
- ❷ la détermination d'un seuil biodisponible unique, accompagnée de l'estimation de la fraction biodisponible dans le milieu

¹² 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.

La première méthode permettant la prise en compte de la biodisponibilité pour la dérivation de seuils consiste à établir une série de valeurs limites applicables à des conditions de milieux différentes (méthode ❶). Par exemple, l'US-EPA a déterminé des seuils en fonction de la dureté de l'eau pour certains métaux. En France, la première version du SEQ-Eau prend en compte trois niveaux de dureté de l'eau pour la détermination des seuils. Cette méthode est également appliquée dans le cadre du Règlement 793/93 sur les substances existantes (voir exemple ci-dessous). La concentration dissoute mesurée dans le milieu est alors comparée à la valeur du seuil estimée en fonction des caractéristiques du milieu aquatique.

▼ Détermination d'un seuil fonction des caractéristiques du milieu (exemple du Cadmium)

Dans le cadre de l'évaluation européenne des risques pour le cadmium, une PNEC¹³ générique de 0.19 µg.L⁻¹ (dissous) a été déterminée en utilisant la méthode statistique exposée dans le TGD (E.C., 2003). Cependant, cette PNEC n'a pas été jugée suffisamment protectrice pour les milieux caractérisés par une très faible dureté de l'eau.

Dans les pays du nord de l'Europe, près de la moitié des eaux continentales ont une dureté inférieure à 10 mg CaCO₃.L⁻¹, alors que pour les pays situés à l'ouest, la même proportion des eaux continentales présente une dureté supérieure à 200 mg CaCO₃.L⁻¹.

Une PNEC dépendant de la dureté de l'eau a donc été proposée pour l'évaluation des risques (cette relation n'étant valable que pour des duretés > 40 mg CaCO₃.L⁻¹) :

$$PNEC_{\text{eau}} = 0.09(H/50)^{0.7409}, \text{ H représentant la dureté de l'eau, en mg CaCO}_3\text{.L}^{-1}.$$

Cette équation empirique a été élaborée par l'US-EPA, en considérant l'évolution des effets chroniques pour trois espèces (*Daphnia magna* - un invertébré, *Pimephales promelas* et *Salmo trutta*- des poissons) en fonction de la dureté de l'eau.

La deuxième façon de prendre en compte la biodisponibilité est de déterminer une concentration seuil unique (considérée comme totalement biodisponible) et d'estimer, pour le milieu considéré, la fraction de métal dissous biodisponible (méthode ❷). Il faut cependant noter que cette fraction biodisponible dépend des espèces visées et que les connaissances des phénomènes de biodisponibilité ne sont pour l'instant disponibles que pour un très faible nombre d'espèces. Par ailleurs cette fraction est assujettie aux variations temporelles et spatiales des paramètres physico-chimiques. Cette méthode est présentée dans l'encadré suivant.

▼ Utilisation d'un seuil fixe et estimation de la fraction biodisponible (exemple du Zinc)

Dans le cadre de l'évaluation européenne des risques pour le zinc, la méthode du risque ajouté a été utilisée. Dans ce contexte, une MPA de 7,8 µg.L⁻¹ a été déterminée de façon statistique, à partir de l'ensemble des données d'écotoxicité disponibles. Comme les conditions physico-chimiques des essais en laboratoire tendent à maximiser la biodisponibilité (faibles concentrations en matières organiques et en matières en suspension, renouvellement continu ou fréquent du milieu d'essai, utilisation de sels métalliques, etc.), cette MPA correspond, en théorie, à une concentration en zinc biodisponible.

Lors de l'évaluation des risques vis à vis des organismes aquatiques, la fraction biodisponible de zinc ajouté dans le milieu est comparée à la MPA. Cette fraction biodisponible est estimée pour chaque site en utilisant des BLMs¹⁴ développés pour trois espèces aquatiques (une algue, un invertébré et un poisson).

¹³ La méthode du risque ajouté n'a pas été utilisée pour le cadmium. Il s'agit bien d'une PNEC et non d'une MPA.

¹⁴ Voir paragraphe 1.2.1.2. Ces modèles permettent de comparer la toxicité prédite dans un milieu donné, caractérisé par des valeurs de paramètres physico-chimiques, avec la toxicité prédite dans les milieux d'essai classiques, utilisés pour dériver la MPA.

▽ A retenir

La prise en compte de la biodisponibilité permet une évaluation plus précise des effets des métaux sur les organismes vivants. Elle permet en particulier de ne pas trop surestimer les effets des métaux. Actuellement, dans certains cas, ce phénomène a été pris en compte dans un cadre réglementaire.

Cependant, il est nécessaire de tenir compte des limites suivantes :

- les connaissances sur la biodisponibilité sont encore trop partielles pour la plupart des métaux. De plus elles sont basées sur des études concernant un très faible nombre d'espèces ;
- la difficulté de la prise en compte de la variabilité spatiale et temporelle des caractéristiques physico-chimiques des milieux.

1.2.2 Biodisponibilité dans les sédiments

Le compartiment sédimentaire est un système complexe en interaction avec l'eau. Un seuil de qualité pour les sédiments doit pouvoir préserver la fonctionnalité de ce système. Le milieu sédimentaire comprend une phase liquide (l'eau interstitielle) et une phase solide composée de matériaux de nature (fragments rocheux et minéraux, débris organiques animaux ou végétaux) et de granulométrie (sables, limons, argiles) hétérogènes. Les sédiments abritent divers organismes qui interagissent avec ce milieu : micro-organismes, algues, invertébrés benthiques. Ces différents organismes participent à la dégradation de la matière organique, et à l'oxygénation et l'hydratation des couches superficielles du sédiment. La biodisponibilité des métaux dépend à la fois des caractéristiques physico-chimiques du sédiment et de l'activité des organismes qui y vivent.



Certaines études (Ankley *et al.*, 1996) montrent que les métaux dissous dans l'eau interstitielle sont plus biodisponibles que les métaux adsorbés sur la phase solide.

En condition aérobie, les métaux sont généralement piégés par les oxydes de fer et de manganèse. En condition anaérobie, ils sont séquestrés sous forme de sulfures insolubles (Cf. partie 2.1.2.3). Ils peuvent également s'adsorber sur la matière organique.

Cependant, les métaux piégés dans les sédiments ne peuvent pas être considérés comme irréversiblement indisponibles pour la phase aqueuse. En effet :

- Les métaux peuvent être remobilisés suite à la perturbation physique de la couche sédimentaire : érosion, remise en suspension en période de crue, bioturbation due à la faune benthique, opérations de dragage.
- Les métaux peuvent être désorbés suite à la modification des paramètres physico-chimiques : salinité (dans les estuaires), dureté, conditions redox ou pH (ce qui peut être le cas au niveau des zones de confluence de plusieurs cours d'eau).
- L'activité des micro-organismes peut également influencer sur la biodisponibilité des métaux dans les sédiments (en dégradant la matière organique sur laquelle étaient adsorbés les métaux, en modifiant la forme chimique du métal : par exemple méthylation du mercure, etc.).
- Par ailleurs, les adjuvants anticalcaires, tels ceux utilisés dans les lessives (EDTA, NTA, zéolites, phosphates, etc.), forment des complexes avec les métaux, et participent ainsi à leur remise en solution.

Les métaux ainsi désorbés redeviennent biodisponibles via la phase aqueuse. L'équilibre entre la phase aqueuse et la phase solide est donc rarement atteint pour les métaux.

Par ailleurs, les métaux peuvent aussi affecter les organismes *via* l'ingestion directe des particules sédimentaires.

Des propositions méthodologiques pour mieux considérer la fraction biodisponible des métaux dans les sédiments sont présentées ci-après (partie 3.1.2.3).

∇ A retenir

- Dans les sédiments, certains auteurs ont montré que la fraction biodisponible en métaux se trouve principalement dans l'eau interstitielle. Cependant, il ne faut pas négliger l'intoxication par l'ingestion directe des particules. Une partie importante des métaux est séquestrée par complexation avec des sulfures (en conditions anoxiques) ou avec des oxydes (en conditions oxiqes). Mais ces équilibres de complexation dépendent de nombreux facteurs : physico-chimie, facteurs biotiques, facteurs physiques, perturbations anthropiques.

1.3 DETERMINATION DE SEUILS DANS LES SEDIMENTS

Il existe de nombreuses méthodes, la plupart d'origine nord-américaine, pour définir des seuils de qualité dans les sédiments. Schématiquement, ces seuils peuvent être définis en fonction :

- de la concentration mesurée sur des sites de référence
- des résultats d'essais d'écotoxicité (réalisés en laboratoire)
- des effets écologiques observés *in situ*

En France, pour le SEQ-Eau, les données disponibles issues de ces trois approches ont été utilisées.

Cependant, on peut constater que :

- les résultats d'essais d'écotoxicité sur organismes benthiques sont rares,
- les effets observés dépendent beaucoup des caractéristiques des sédiments, que ce soit lors des essais de laboratoire ou pour les observations *in situ*.

Lorsqu'il n'existe pas de données concernant le compartiment sédimentaire, il est possible d'extrapoler un seuil à partir des résultats d'essais disponibles vis à vis des organismes pélagiques grâce à la méthode dite « de l'équilibre de partage » proposée par Di Toro *et al.*, 1991. La concentration totale dans les sédiments est reliée à la concentration dans l'eau interstitielle en faisant l'hypothèse que les compartiments sont à l'équilibre. Le coefficient de partage entre l'eau et la matière solide dans les sédiments caractérise cet équilibre. Cependant pour les métaux, la variabilité du coefficient de partage entre la phase solide et aqueuse du sédiment est plus importante que pour les molécules organiques en raison des phénomènes de spéciation.

Pour ces différentes raisons, les incertitudes lors de la détermination de seuils de qualité pour les sédiments sont très importantes.

▼ A retenir

- Il est difficile de déterminer des seuils de qualité pour les sédiments en raison du manque de connaissances (spéciation, biodisponibilité, etc.) et de données sur les effets des substances sur les organismes benthiques. La plupart des seuils proposés dans la littérature sont d'origine nord-américaine et sont essentiellement issus d'observations faites sur le terrain (par exemple MacDonald *et al.*, 2000) . En Europe actuellement, dans le cadre de la réglementation sur les substances chimiques existantes et pour la DCE, les résultats d'essais d'écotoxicité vis à vis des organismes benthiques, voire la méthode de « l'équilibre de partage », sont privilégiés lors de la détermination des seuils. Ces seuils sont déterminés pour répondre à un besoin réglementaire, néanmoins de nombreuses questions restent en suspens (Crane, 2003)

1.4 DETERMINATION DE SEUILS DANS LES ORGANISMES

Il est reconnu que les organismes peuvent accumuler la plupart des métaux. Il existe d'importantes différences selon les espèces et les métaux. La bioaccumulation de cadmium et de plomb chez les poissons est 2 à 10 fois inférieures à celle chez les mollusques et les crustacés. Les poissons accumulent très fortement le mercure, notamment sous sa forme méthylée ; c'est tout particulièrement le cas pour les espèces carnivores et les super-prédateurs (phénomène de biomagnification du mercure) (Miquel, 2001). La concentration en méthylmercure dans les poissons peut être de l'ordre de 10^7 fois plus importante que celle dans l'eau (UNEP, 2002 ; Wiener *et al.*, 2003).



▼ Quelques définitions

- Bioconcentration : accumulation d'une substance dans un organisme vivant via l'eau.
- Bioaccumulation : accumulation d'une substance dans un organisme vivant via le milieu aquatique (eau, matières en suspension, sédiments) et l'alimentation.
- Biomagnification (ou bioamplification) : accumulation et transfert d'une substance via une chaîne alimentaire. Cela implique une augmentation des concentrations dans les organismes situés aux plus hauts niveaux des réseaux trophiques.

De ce fait, même présents dans l'eau en très faibles quantités, les métaux peuvent être dangereux pour les prédateurs et l'homme qui consomment les espèces aquatiques. Pour tenir compte de ces effets il est nécessaire de connaître les concentrations dans les organismes engendrant des effets sur les prédateurs lors d'une contamination par voie alimentaire. Il est ainsi possible de déterminer une concentration seuil dans les organismes. Pour certains métaux (nickel) ces données ne sont pas disponibles.

Pour la DCE, les normes de qualité environnementale (dans l'eau) pour le mercure et le plomb, seront *a priori* définis par rapport au danger pour les prédateurs (empoisonnement secondaire) à partir des concentrations à ne pas dépasser dans les organismes (Cf. partie 2.1.3).

▼ A retenir

- La prise en compte de l'empoisonnement secondaire est déterminante pour fixer les seuils des métaux à fort potentiel de bioaccumulation ou de biomagnification.
- Pour cela il est nécessaire de connaître les concentrations dans les organismes engendrant des effets sur les prédateurs lors d'une contamination par voie alimentaire.

2. APPLICATION DES SEUILS DE QUALITE POUR LES METAUX

La surveillance actuellement mise en place en France pour le suivi des métaux dans les milieux aquatiques est basée sur la mesure du métal total dans l'eau, les sédiments ou dans les organismes (SEQ et RNO¹⁵). Dans l'optique d'appliquer des seuils de qualité de la façon la plus réaliste possible, la spéciation des métaux devrait être prise en compte afin d'estimer la fraction de métal biodisponible pour les organismes vivants. Pour l'application de la DCE, il n'y a pour l'instant pas de cadre réglementaire fixant quel compartiment, aquatique, sédimentaire ou biotique, doit être suivi pour les métaux. Il semble, à cette date, que le suivi dans l'eau (fraction dissoute ou matières en suspension) soit privilégié par la Commission Européenne.

2.1.1 Suivi dans l'eau

2.1.1.1 Importance de la stratégie et du mode d'échantillonnage

La stratégie et le mode de prélèvement doivent fournir des échantillons représentatifs du milieu à surveiller. La stratégie de prélèvement doit donc être adaptée aux caractéristiques intrinsèques des écosystèmes. Elle doit par exemple tenir compte de facteurs comme le débit ou la turbidité pour déterminer les points de prélèvements et évaluer la représentativité de l'échantillonnage sur le plan spatial et temporel. De plus, parce que les éléments métalliques sont généralement présents à l'état de traces dans l'eau, le traitement des échantillons doit être particulièrement contrôlé pour éviter les éventuelles contaminations. Entre le prélèvement et l'analyse, les échantillons subissent un certain nombre de manipulations qui peuvent modifier leur composition (conditionnement, transport, filtration, etc.). Le suivi des métaux dans la phase dissoute (eau filtrée à 0,45 µm) est une opération relativement délicate (Meybeck *et al.*, 1994).

▼ A retenir














- La stratégie d'échantillonnage dans l'eau doit définir des sites de prélèvement ainsi qu'une fréquence d'échantillonnage spatiale et temporelle en accord avec les objectifs du programme de surveillance, tout en tenant en compte des caractéristiques intrinsèques de l'écosystème. Le prélèvement, le conditionnement et les manipulations en laboratoires nécessitent des moyens techniques et humains spécifiques en particulier pour les mesures dans la phase dissoute.

2.1.1.2 Analyse des métaux et surveillance

Actuellement, la surveillance des métaux en France consiste à mesurer le métal total (dissous + particulaire) dans des échantillons d'eau brute. Pourtant, les formes dissoutes des métaux sont nettement plus biodisponibles que les formes particulières pour les organismes. Dans des échantillons d'eau brute, la concentration en métal total peut être élevée, en particulier si la teneur en matières en suspension est importante (période crue en rivière ou estuaire), alors que la fraction de métal biodisponible peut être faible. A ce jour différentes techniques analytiques permettent d'estimer la fraction de métal biodisponible. Le Tableau 2-1 présente un aperçu de ses méthodes et leurs principales caractéristiques. Ces méthodes nécessitent toutes de séparer la phase dissoute de la phase particulaire. Cette étape s'effectue habituellement par filtration à travers une membrane de 0,45 µm.

¹⁵ Réseau National d'Observation de la qualité du milieu marin, réseau géré par l'IFREMER pour le compte du ministère de l'Environnement.

Tableau 2-1 : Principales méthodes pour la détermination de la spéciation des métaux dissous

APPROCHE	METHODE	METAUX	ESPECES MESUREES	PRINCIPALES CARACTERISTIQUES	
ELECTROCHIMIQUE	ISE (<i>Ionic Specific Electrode</i>)	Cu, Cd, Ag, Pb, Fe	Ions libres	 Sélectivité ; LD 10 ⁻¹¹ à 10 ⁻¹⁵ M sous certaines conditions	
				 Difficile à mettre en œuvre ; interférences ; contamination	
	ASV (Redissolution anodique suivie par voltamétrie)	Cu, Zn, Pb, Cd, Fe, Ni, Co	Ions libres + Espèces labiles	 LD 10 ⁻⁸ à 10 ⁻¹² M ; très utilisée	
				 Interférences (O ₂ et matière organique)	
NON ELECTROCHIMIQUE (Séparation + mode de détection classique*)	Compétition de ligand (MnO ₂)		Cu	Ions libres	 Sélectivité
	Résines	Via Adsorbants hydrophobes (SEP-PAK C18 ; XAD-2)	Cu, Zn, Cd, Ni, Pb	Complexes métalliques organiques	 Sélectivité ; mise en œuvre aisée ; rapide
					 Estimation indirecte de la fraction biodisponible
		Chélatante (Chelex ; ASLA)		Ions libres + Espèces labiles	 Sélectivité ; très utilisée mise en œuvre aisée (en colonne) ; rapide
					 Capacité complexante relativement élevée selon le groupement complexant
		Echangeuse d'ions		Cations métalliques	 Isole la fraction ionique des métaux ; rapide
					 Manque de sélectivité ; problème de compétition entre les ions
	THEORIQUE (MODELISATION)	MINEQL, MINEQL+, WHAM, PHREEQC, HYDRA/MEDUSA	Tous	Fonction des variables insérées	 Peu coûteux ; accès rapide à la spéciation du métal
 Complexité ; précision et validité des constantes thermodynamiques ; nécessite la mesure des principaux paramètres physico-chimiques de l'eau					

* Spectrométrie d'Adsorption Atomique (AAS) ou torche à Plasma (ICP) par exemple, LD: Limite de détection,  avantage,  inconvénient

Hormis les électrodes ioniques spécifiques et la méthode de compétition de ligand qui mesurent exclusivement la concentration en ions libres, les méthodes d'analyse ne permettent pas de quantifier des formes chimiques métalliques précises. Les fractions de métal quantifiées sont opérationnelles¹⁶ (Cf. Tableau 2-1). Elles comprennent toujours plusieurs formes chimiques d'un même élément regroupées sous une appellation spécifique. Par exemple, la fraction dite « labile » (généralement assimilée à la fraction biodisponible) comprend tous les

¹⁶ Fraction opérationnelle : fraction comprenant plusieurs formes chimiques d'un même élément définis par les propriétés de la méthode analytique d'extraction, de complexation ou de mesure et les conditions expérimentales dans lesquelles l'extraction, la complexation ou la mesure est réalisée.

complexes métalliques organiques et inorganiques susceptibles de se dissocier lors de la mesure. Une fraction de même appellation peut donc ne pas être composée exactement des mêmes formes chimiques métalliques selon la méthode utilisée pour la déterminer. Il est alors très difficile de comparer les résultats obtenus par des méthodes différentes. Aucune étude approfondie n'a jusqu'à présent été réalisée afin de comparer les différentes méthodes de détermination de la spéciation (Cf. Monbet and Coquery, 2003).

L'approche théorique par modélisation permet de déterminer rapidement la spéciation des métaux dans la phase dissoute, et de façon peu coûteuse par rapport aux méthodes expérimentales. Toutefois, cette approche souffre d'un manque de validation dû d'une part au caractère empirique des constantes thermodynamiques utilisées et d'autre part à l'absence de techniques analytiques capables de quantifier spécifiquement les différentes formes chimiques simulées (Cf. Monbet and Coquery, 2003). Pour utiliser ces modèles, il est indispensable de déterminer les principaux paramètres physico-chimiques des échantillons (pH, ions majeurs, etc.).

Afin d'estimer la fraction de métal biodisponible dans l'eau, une nouvelle technique a été développée récemment : la méthode du « *Diffusive Gradient in Thin film* » appelée couramment DGT (Zhang and Davison, 1995). Cette méthode associe la technique de filtration sur gel afin d'opérer une séparation par taille et la technique de complexation sur résine chélatante qui permet de concentrer et de déterminer la fraction labile des métaux en solution. Comme la complexation sur la résine s'apparente fortement au phénomène d'assimilation d'un métal à travers la membrane cellulaire d'un organisme, la fraction labile mesurée est considérée comme la fraction de métal biodisponible. Différents gels diffusifs peuvent être utilisés et permettent ainsi d'affiner le critère de séparation des complexes migrant vers la résine.

Les dispositifs de mesures (Cf. Figure 1) sont déployés *in situ* présentant ainsi un avantage par rapport aux autres techniques de spéciation sur le plan du conditionnement et d'éventuelles contaminations. Les temps de déploiement sont variables en fonction de la concentration en métal dans le milieu. Ils peuvent varier de quelques heures dans des environnements riches en métaux jusqu'à plusieurs jours dans des milieux faiblement contaminés.

Cette méthode présente aussi l'avantage d'intégrer d'éventuelles variations de concentrations en métal au cours du temps. Après le déploiement *in situ* des dispositifs, ces derniers sont démontés au laboratoire et les concentrations en métaux sont mesurées dans le gel contenant la résine¹⁷.

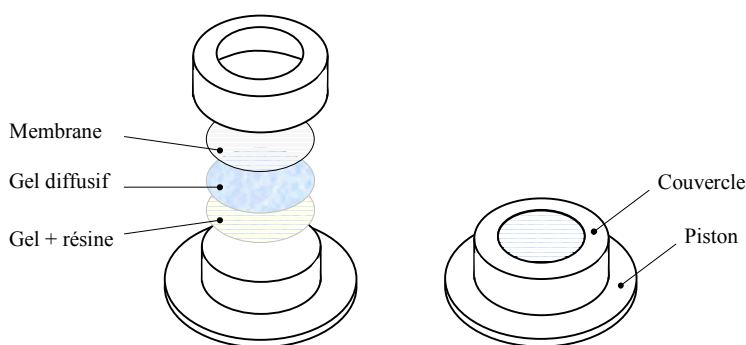


Figure 1 : Dispositif expérimental utilisé pour la technique DGT dans l'eau

L'utilisation de la DGT est de plus en plus courante en raison de son efficacité et de sa simplicité d'utilisation, mais des études supplémentaires sont nécessaires, en particulier pour corréler les mesures par DGT avec la réponse biologique.

¹⁷ Le gel contenant la résine est élué en milieu acide (HNO₃, 1M). Les mesures sont réalisées dans l'éluat par adsorption atomique, électrochimie ou ICP (Torche à Plasma) par exemple.

▽ A retenir

- Dans l'eau, les formes chimiques métalliques considérées comme « biodisponibles » sont présentes essentiellement dans la phase dissoute. Les concentrations en métal total (dissous + particulaire) ne sont donc généralement pas corrélées aux effets potentiels causés par la présence des métaux dans l'eau. L'application des seuils de qualité nécessite de distinguer métal dissous et particulaire. L'estimation de la fraction de métal biodisponible dans la phase dissoute peut être réalisée à l'aide de différentes méthodes. Ces méthodes déterminent généralement une fraction opérationnelle de métal qui est apparentée à la fraction « biodisponible ». Les fractions opérationnelles peuvent être différentes selon la méthode utilisée. La méthode DGT représente une méthode simple et innovante capable de déterminer in situ la fraction de métal labile et d'intégrer les variations de métal au cours du temps. Son utilisation est certainement amenée à se développer dans le cadre de programme de surveillance pour l'application des seuils de qualité.

2.1.2 Suivi dans les sédiments

Les métaux ont tendance à se concentrer au cours du temps dans le compartiment sédimentaire. C'est en partie pourquoi le suivi de la contamination en métaux se fait couramment sur les sédiments dans de nombreux pays, dont la France. Cela permet par ailleurs de retracer l'historique d'une pollution. Les concentrations sont aussi plus facilement mesurables dans les sédiments que dans l'eau (moindre coût, risque de contamination diminué).

2.1.2.1 Importance de l'échantillonnage ; paramètres à prendre en compte

Comme il a été rappelé précédemment, l'évaluation de la qualité du sédiment tient une place importante dans les programmes de surveillance des écosystèmes. En fonction des objectifs de ces programmes, il est nécessaire de définir les sites de prélèvements, l'épaisseur de la couche échantillonnée, la période et la fréquence des prélèvements. A titre d'exemple, dans des systèmes où l'accumulation de particules est très faible, les mesures de métaux obtenues à partir de l'échantillonnage du premier centimètre de surface peuvent intégrer d'importantes variations temporelles (de l'ordre de l'année ou plus). Les mesures obtenues sur la même épaisseur de sédiment dans des systèmes où l'accumulation des particules est très importante ne reflèteront que les processus récents (de l'ordre de la semaine ou du mois). Les critères cités précédemment doivent être modulés si nécessaire en fonction des caractéristiques de l'écosystème étudié. En France, le suivi des métaux dans les sédiments est généralement réalisé une fois par an en milieu continental et tous les dix ans en milieu côtier.

Par ailleurs, il est aujourd'hui reconnu que les méthodes utilisées pour le prélèvement, le transport, la manipulation et la conservation des échantillons de sédiment peuvent modifier leurs caractéristiques physico-chimiques et donc les résultats des analyses. Dans le cadre de programmes nationaux pour l'application des seuils de qualité, il apparaît donc nécessaire de définir un protocole pour le prélèvement, le transport, la manipulation et la conservation des échantillons de sédiment.

▽ A retenir

- La stratégie et la méthodologie d'échantillonnage représentent une étape importante pour l'application des seuils de qualité dans les sédiments. Ils doivent répondre aux objectifs du programme de surveillance tout en prenant en compte les spécificités du milieu étudié : l'hydrologie du système et les taux de sédimentation sont les principaux facteurs pour déterminer la localisation, la fréquence d'échantillonnage et l'épaisseur de sédiments collectés. L'obtention de données représentatives et comparables nécessite l'utilisation de procédures standardisées.

2.1.2.2 Analyse des métaux et surveillance

En France, la surveillance des métaux dans les sédiments est réalisée par la mesure du métal total dans la fraction de sédiment tamisé à 2 mm. Il est important de souligner que les métaux ont une forte affinité pour les particules fines (plus de 90% des métaux sont généralement concentrés dans la fraction < 63 µm). La comparaison de sites caractérisés par des granulométries différentes nécessite alors impérativement une normalisation. Cette étape de normalisation peut être réalisée grâce à des mesures de granulométrie (e. g. quantification de la fraction inférieure à 63 µm). La mesure de l'aluminium (Al) peut aussi être utilisée, car ce métal est généralement bien corrélé avec la proportion de particules fines (argiles : aluminosilicates).

Dans les conditions actuelles de surveillance, les mesures réalisées dans le sédiment ne reflètent pas directement la quantité de métal biodisponible. Pour estimer cette fraction de métal biodisponible, il est nécessaire de déterminer la capacité du sédiment à redistribuer le métal particulaire (adsorbé, co-précipité et/ou inclus sur les particules de sédiment) vers la phase dissoute (eau interstitielle). Les méthodes d'extraction chimique de référence sont celles développées par Tessier *et al.*, 1979 et le BCR¹⁸ de l'Union Européenne (Cf. Tableau 2-2).

Tableau 2-2 : Les différentes fractions des schémas d'extraction chimique des sédiments

TECHNIQUE	FRACTIONS		TECHNIQUE	
Tessier et al. (1979)	Echangeable		Echangeable, soluble dans l'eau et en milieu acide	BCR
	Acido-soluble		Réductible	
	Réductible		Oxydable	
	Oxydable			
	Résiduelle			

Ces méthodes permettent de définir différentes fractions opérationnelles pour un métal. Les fractions échangeables solubles dans l'eau, en milieu acide, correspondent aux fractions les plus biodisponibles. A l'inverse, la fraction résiduelle n'est jamais biodisponible.

2.1.2.3 AVS/SEM : une méthode d'évaluation de la toxicité des sédiments

Pour la surveillance des métaux dans les sédiments, une alternative aux approches classiques de spéciation a été développée par Di Toro *et al.*, 1990. Cette approche consiste à évaluer la toxicité des sédiments à partir de la concentration en AVS (*Acid Volatil Sulfide*) et SEM (*Simultaneously Extracted Metals*). La fraction AVS représente la concentration des différentes formes chimiques à base de soufre dans le sédiment. Elle joue un rôle important dans la distribution des métaux dans le sédiment car, en milieu anoxique, les sulfures présents dans l'eau interstitielle précipitent avec les métaux dissous. Lors de cette précipitation, les métaux dissous présents dans l'eau interstitielle (potentiellement « biodisponibles ») sont séquestrés dans la phase particulaire et deviennent peu, voire non « biodisponible ».

¹⁸ BCR : *Community Bureau of Reference* devenu récemment *Standards, Measurements and Testing Programme*

Les AVS sont obtenus grâce à une extraction en milieu acide. Les métaux sont également mesurés dans la solution d'extraction. Cette fraction est désignée sous l'appellation SEM (*Simultaneously Extracted Metals*). Certaines études¹⁹ montrent qu'il est possible de prédire la toxicité du sédiment en fonction du rapport entre Σ SEM (représentant la somme des différents métaux extraits) et AVS ou de la différence entre Σ SEM et AVS. En présence de matière organique, susceptible de se complexer avec les métaux, le rapport Σ SEM/AVS apparaît parfois inadapté pour prévoir correctement la toxicité du sédiment. Dans ce cas, la différence (Σ SEM-AVS) peut être normalisée à l'aide de la fraction en carbone organique (f_{OC}). L'incertitude liée à la prédiction sur la toxicité serait alors largement réduite.

∇ Quelques définitions

- AVS (*Acid Volatil Sulfide*) : ensemble des composés soufrés volatils (S^{2-} , FeS, $FeHS^+$, Fe_3S_4 , MeS, etc.) obtenus par extraction en milieu acide chlorhydrique 1N à froid
- SEM (*Simultaneously Extracted Metals*) : ensemble des métaux divalents (Cu^{2+} , Ni^{2+} , Zn^{2+} , Cd^{2+} , etc.) obtenus au cours de l'extraction en milieu acide chlorhydrique 1N à froid
- Σ SEM/AVS < 1 ou Σ SEM-AVS < 0 : les métaux sont potentiellement tous associés aux sulfures dans la phase particulaire et aucune toxicité n'est généralement attendue dans ces sédiments
- Σ SEM/AVS > 1 ou Σ SEM-AVS > 0 : la fraction métallique est en excès par rapport à la fraction d'AVS. La capacité de séquestration du sédiment est dépassée et le sédiment est potentiellement toxique

La capacité de complexation de chaque métal avec les sulfures est différente. On peut classer les métaux depuis celui ayant la plus forte affinité pour les AVS (donc qui sera piégé en premier dans le milieu naturel) à celui ayant la plus faible affinité : Cu > Pb > Cd > Zn > Ni (Ankley *et al.*, 1996)

L'approche (AVS/SEM) n'est en théorie pas adaptée aux sédiments oxiqes, qui représentent une grande partie des sédiments de surface. Dans ces conditions, il n'y a pas ou très peu d'AVS et l'hypothèse selon laquelle les AVS piègent les SEM n'a donc pas lieu d'être émise. Le rapport SEM/AVS est alors toujours très largement supérieur à 1. La méthode conduit toujours à une évaluation positive de la toxicité des sédiments, alors que la distribution des métaux est contrôlée par d'autres propriétés du sédiment. A titre d'exemple, lors du passage de conditions anoxiques à oxiqes, les métaux vont être libérés vers l'eau interstitielle. Cependant, ils peuvent simultanément co-précipiter suite à d'autres processus (formation des oxydes de fer et de manganèse liés à la présence d'oxygène en particulier). Dans ce cas, les métaux libérés par les AVS sont alors immédiatement séquestrés par une autre fraction particulaire et leur biodisponibilité n'a finalement pas ou peu évolué.

Ainsi l'approche Σ SEM/AVS utilisée dans le cadre de l'évaluation des risques apparaît plus fiable pour prévoir l'absence de toxicité plutôt que la toxicité du sédiment. D'importants travaux ont été réalisés dans le cadre de l'évaluation de la biodisponibilité du zinc dans les sédiments à partir de données de sédiments prélevés en Belgique et aux Pays Bas principalement (Vangheluwe *et al.*, 2003). A ce jour, cette approche n'a jamais été utilisée dans le cadre de la surveillance des sédiments en France. Il est donc difficile de l'utiliser pour en déduire des seuils de qualité pour les écosystèmes français.

¹⁹ *Environmental Toxicology and Chemistry* a publié en décembre 1996 (Volume 15, Numéro 12) un numéro consacré à la biodisponibilité des métaux dans les sédiments. L'historique et les perspectives offertes par la méthode AVS-SEM y sont exposés et discutés.

∇ A retenir

- L'application des seuils de qualité dans les sédiments est actuellement basée sur la concentration en métal total. Cette approche ne prend pas en compte le caractère « biodisponible » des métaux dans le sédiment. Des extractions séquentielles (Tessier *et al.*, 1979 ; BCR) et l'approche AVS/SEM permettent d'évaluer la fraction de métal « biodisponible ». La mise en place de ces méthodes nécessite des études préalables sur le plan technique (tests des matériels et des méthodes) afin de rédiger des protocoles standardisés. La surveillance des concentrations en métal total dans les sédiments doit être poursuivie en parallèle.

2.1.3 Suivi dans les organismes

Il est difficile d'établir une correspondance entre les concentrations en métaux dans les organismes et celles dans l'eau. L'utilisation de modèles de bioaccumulation fondés sur le facteur de bioconcentration (BCF) n'est pas satisfaisante pour les métaux. Les organismes peuvent en effet, dans une certaine mesure, réguler leur concentration interne en éléments métalliques et s'acclimater aux variations des concentrations environnementales. Il a ainsi été observé que le facteur de bioconcentration pour les métaux dépendait de leurs concentrations dans le milieu (McGeer *et al.*, 2003).

A faibles concentrations environnementales, les organismes tendent à concentrer les métaux, en particulier ceux qui leur sont essentiels, et le BCF observé sera alors important. Une augmentation de l'exposition aux métaux induit des mécanismes de régulation physiologique (par exemple métallothionéines) : une partie du métal assimilé est alors éliminée, et le BCF observé en sera d'autant plus faible. Les connaissances scientifiques sont actuellement insuffisantes pour prédire correctement la concentration dans les organismes à partir de celle dans l'eau, et réciproquement.

Actuellement en France, pour les huit métaux considérés dans le SEQ-Eau (arsenic, cadmium, cuivre, chrome, mercure, nickel, plomb, zinc.), le suivi dans l'eau douce peut être réalisé à partir de mesures sur des bryophytes (mousses végétales). Pour le milieu marin, le RNO suit les concentrations en mercure, cadmium, plomb, zinc et cuivre dans les moules et les huîtres.

∇ A retenir

- Il apparaîtrait préférable de suivre les métaux directement dans les organismes vivants, en particulier lorsque l'effet sur les prédateurs conditionne la valeur de la norme de qualité environnementale (cas, a priori, du plomb et du mercure). Les concentrations mesurées dans les organismes devraient alors être comparées au seuil déterminé pour les organismes.

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, la contamination métallique des milieux aquatiques peut augmenter significativement. Au-delà d'une certaine concentration, parfois très faible, dans le milieu, ils ont des effets toxiques. Par ailleurs, la plupart des métaux s'accumulent dans les organismes. De ce fait, même lorsqu'ils sont présents dans l'eau en très faibles quantités, ils peuvent être dangereux pour la santé des écosystèmes. Ils peuvent aussi mettre en péril les activités économiques associées au milieu aquatique (aquaculture, tourisme, etc.). La surveillance des écosystèmes et en particulier le suivi des métaux s'avèrent donc nécessaires.

∇ Détermination des seuils

La Directive Cadre sur l'Eau, impose de définir des normes de qualité environnementale pour quatre métaux prioritaires : le cadmium, le plomb, le mercure et le nickel. Ces normes de qualité sont des concentrations seuils qui ne doivent pas être dépassées pour protéger les écosystèmes aquatiques. La détermination des seuils est particulièrement problématique pour les métaux pour plusieurs raisons :

- 1- 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. Pour l'application des seuils de qualité, la notion de risque ajouté fait la distinction entre la concentration naturelle et celle due aux apports anthropiques.
- 2- 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 de carence (i.e. manque en éléments essentiels) et de toxicité peuvent être très variables entre les espèces.
- 3- Les **communautés d'espèces sont adaptées aux teneurs naturelles en métaux** présentes dans leur environnement. La sensibilité des communautés peut ainsi être très variable entre différents écosystèmes. De même, les **organismes sauvages peuvent avoir des sensibilités très différentes** de ceux testés en laboratoire.
- 4- 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.

Dans l'eau, la détermination des normes de qualité est basée sur des essais d'écotoxicité réalisés en laboratoire. Dans les conditions de laboratoire, la majeure partie du métal se trouve sous forme dissoute. La totalité du métal introduit dans le milieu d'essai est alors considérée comme biodisponible. Ces conditions sont éloignées de celles des milieux aquatiques naturels. L'extrapolation des effets associés à des conditions environnementales spécifiques à partir des essais d'écotoxicité est alors problématique.

Pour pallier en partie ce problème, les modèles BLM ont été développés pour prédire la toxicité (aiguë) des métaux dans l'eau à partir des conditions physico-chimiques d'un milieu donné. Toutefois ces modèles, récents, sont encore en cours d'élaboration pour certains et nécessitent des étapes de validation supplémentaires pour d'autres.

Dans les sédiments, la fraction biodisponible en métaux se trouve principalement sous forme dissoute dans l'eau interstitielle. Mais la fraction séquestrée par les particules sédimentaires est généralement importante. Cette fraction peut être remobilisée suite à la modification des caractéristiques physico-chimiques du milieu souvent liée aux conditions hydrologiques, au dragage ou encore à la bioturbation. Par ailleurs, les organismes peuvent être intoxiqués par l'ingestion directe de particules solides contaminées.

∇ Méthodes d'analyse

Tant pour l'eau que pour le sédiment, des **méthodes analytiques** permettent une estimation de la fraction biodisponible.

Dans l'eau, des techniques comme l'ASV ou la DGT permettent de déterminer une fraction opérationnelle de métal « labile ». Cette fraction « labile » est généralement assimilée à la fraction biodisponible car les processus mis en jeu lors de la mesure sont proches de ceux intervenant lors du passage du métal à travers une membrane cellulaire.

Dans les sédiments, deux protocoles d'extraction (Tessier et BCR) sont utilisés pour évaluer la capacité du sédiment à relarguer les métaux sous forme dissoute dans l'eau interstitielle. La méthode AVS/SEM semble également améliorer la prédiction de la toxicité du sédiment.

La mise en place de ces méthodes analytiques dans le cadre des programmes de surveillance pour l'application de normes de qualité dans l'eau et le sédiment nécessite un investissement important tant sur le plan technique qu'humain. Comparées aux systèmes de surveillance actuellement en place en France (surveillance du métal total dans l'eau, les sédiments, les bryophytes, coquillages), ces méthodes ont un coût plus élevé (matériels spécifiques coûteux, analyses supplémentaires, temps d'analyse accrus). Par ailleurs, certaines de ces méthodes doivent encore être validées et des procédures standardisées devront être rédigées.

∇ Application des seuils

Par conséquent, la fraction dissoute est souvent considérée comme étant la plus représentative de la fraction biodisponible. Selon la Commission Européenne, les normes de qualité environnementale devraient être exprimées en métal dissous. Mais du fait de leurs propriétés d'adsorption et de bioaccumulation, les métaux se concentrent principalement sur la phase solide, sédiments et matières en suspension, dès que la teneur en particules dans l'eau est importante, et dans les organismes. Les concentrations dans l'eau sont comparativement faibles et parfois en deçà des limites de détection des méthodes d'analyses chimiques, en particulier dans les eaux naturelles faiblement chargées en particules.

Des modèles (équilibre de partage entre l'eau et les sédiments, bioconcentration dans les organismes aquatiques) permettent d'établir des correspondances entre les concentrations des différents compartiments, sous l'hypothèse d'un équilibre entre les phases. Cependant, la détermination de la constante d'équilibre de partage entre eau et matière solide et du facteur de bioconcentration dépend de nombreux facteurs pour les métaux. En pratique, il serait préférable de déterminer et de prendre en compte des **seuils pour les sédiments et pour les organismes**, basés sur les connaissances scientifiques sur ces compartiments, et de faire, lorsque c'est possible, le **suivi des métaux dans le milieu sur les phases solide et biotique**.

REFERENCES

- Agences de l'Eau (1999). Les outils d'évaluation de la qualité des cours d'eau (S.E.Q.). Les études des Agences de l'Eau n°72.
- Ankley, G. T., D. M. Di Toro, et al. (1996). "Technical basis and proposal for deriving sediment quality criteria for metals." Environmental Toxicology and Chemistry **15**(12): 2056-2066.
- Baqué, D., P. Oliva, et al. 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.
- 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. D. R. Turner.
- Crane, M. (2003). "Proposed development of Sediment Quality Guidelines under the European Water Framework Directive: a critique." Toxicology letters **142**: 195-206.
- Crommentuijn, T., M. Polder, et al. (2000). "Evaluation of the Dutch environmental risk limits for metals by application of the added risk approach." Environmental Toxicology and Chemistry **19**(6): 1692-1701.
- Di Toro, D. M., J. D. Mahony, et al. (1990). "Toxicity of cadmium in sediments : the role of acide volatile sulfide." Environmental Toxicology and Chemistry **9**: 1497-1502.
- Di Toro, D. M., C. S. Zarba, et al. (1991). "Technical basis for establishing sediment quality criteria for nonionic organic chemicals using equilibrium partitioning." Environmental Toxicology and Chemistry **10**: 1541-1583.
- E.C. (1993). Règlement du Conseil du 23 mars 1993 concernant l'évaluation et le contrôle des risques présentés par les substances existantes (CE/793/93).
- E.C. (2003). Technical Guidance Document on Risk Assessment in support of Commission Directive 93/67/EEC on Risk Assessment for new notified substances, Commission Regulation (EC) N° 1488/94 on Risk Assessment for existing substances, Directive 98/8/EC of the European Parliament and of the Council concerning the placing of biocidal products on the market. Luxembourg, Office for Official Publications of the European Communities.
- Le Goff, F. and V. Bonnomet (2003). Devenir et comportement des métaux dans l'eau : biodisponibilité et modèles BLM. DRC-03-46822-FLg/JL/03.0693. Verneuil en Halatte (France), INERIS: 80p.
- Leduc, C., Y. Husson, et al. (1996). Atlas géochimique des éléments métalliques sur le bassin Loire-Bretagne. N 2234, BRGM.
- Lepper, P. (2002). Towards the derivation of quality standards for priority substances in the context of the water framework directive. Final report of the study contract n° B4-3040/2000/30637/MAR/E1: Identification of quality standards for priority substances in the field of water policy, Fraunhofer-Institute Molecular Biology and Applied Ecology.
- Ma, H., S. D. Kim, et al. (1999). "Effect of kinetics of complexation by humic acid on toxicity of copper to *Ceriodaphnia dubia*." Environmental Toxicology and Chemistry **18**(5): 828-837.
- MacDonald, D. D., C. G. Ingersoll, et al. (2000). "Development and evaluation of consensus-based sediment quality guidelines for freshwater ecosystems." Archives of Environmental Contamination and Toxicology **39**: 20-31.

- MacRae, R. K., D. E. Smith, et al. (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.
- McGeer, J. C., K. V. Brix, et al. (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.
- Meybeck, M., A. Pasco, et al. (1994). Evaluation des flux polluants dans les rivières. Pourquoi, comment et à quel prix ? Synthèse de l'étude Inter-Agences 9.
- Miquel, M. (2001). Rapport sur les effets des métaux lourds sur l'environnement et la santé. N° 2979 Assemblée Nationale, N°261 Sénat., Office Parlementaire d'évaluation des choix scientifiques et technologiques.
- Monbet, P. and M. Coquery (2003). Approches analytiques pour l'évaluation de la biodisponibilité des métaux dans les milieux aquatiques. DRC-CHEN-03-46822-PhM/JL-03.0672. Verneuil en Halatte (France), INERIS: 90p.
- Newman, M. C. and C. H. Jagoe (1994). Ligands and the bioavailability of metals in aquatic environments. Bioavailability: physical, chemical and biological interactions. W. H. Benson. Boca Raton, USA, Lewis Publishers.
- Smith, R. M., A. E. Martell, et al. (2003). NIST Standard Reference Database 46: critically selected stability constants of metal complexes database. Gaithersburg, National Institute of Standards and Technology.
- Struijs, J., D. van de Meent, et al. (1997). "Added risk approach to derive maximum permissible concentrations for heavy metals: how to take natural background levels into account." Ecotoxicology and Environmental Safety **37** : 112-118.
- Tessier, A., P. G. C. Campbell, et al. (1979). "Sequential extraction procedure for the speciation of particulate trace metals." Analytical Chemistry **51**(7) : 844-851.
- UNEP (2002). Global Mercury Assessment. UNEP Chemicals, Geneva, Switzerland
- US-EPA (2002). National recommended Water Quality Criteria : 2002. EPA-822-R-02-047, US EPA: 33.
- van der Weijden, C. and 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.
- Vangheluwe, M., D. Heijerick, et al. (2003). Probabilistic assessment of zinc bioavailability in sediments. EURAS : 119.
- Wiener, J., G. Krabbenhoft, et al. (2003). Ecotoxicology of Mercury. Handbook of Ecotoxicology, Ed. DJ Hoffman, BA Rattner, GA Burton Jr, J Cairns Jr. Lewis Publishers.
- Zhang, H. and W. Davison (1995). "Performance Characteristics of Diffusion Gradients in Thin Films for the in Situ Measurement of Trace Metals." Aqueous Solution. Analytical Chemistry **67** (19) : 3391-3400.