



## THESE DE L'UNIVERSITE DE LYON

ECOLE DOCTORALE : *Evolution Ecosystèmes Microbiologie Modélisation*



Présentée devant L'UNIVERSITE CLAUDE BERNARD LYON 1 pour

l'obtention du grade de

**Docteur en Ecologie des communautés, fonctionnement des écosystèmes,  
écotoxicologie**

par

Delphine BERTIN

---

# Transfert des composés perfluorés des sédiments aux invertébrés benthiques

---

*Soutenue publiquement le 01 Décembre 2014 devant la commission d'examen suivante :*

<u>Directrice</u>	<b>Mme. Jeanne GARRIC</b>	Directrice de Recherche, Iristea
<u>Co-Directeur de thèse</u>	<b>M. Marc BABUT</b>	Ingénieur en chef des ponts, des eaux et des forêts, Iristea
<u>Rapporteurs</u>	<b>Mme Catherine GOURLAY-FRANCÉ</b>	Chef d'Unité, HDR, ANSES
	<b>M. Sergi SABATER</b>	Professeur de l'Université de Gironne (Espagne)
<u>Examineurs</u>	<b>Mme Emmanuelle VULLIET</b>	Chargée de Recherche CNRS
	<b>M. Pierre MARMONIER</b>	Professeur de l'Université Claude Bernard Lyon 1
	<b>M. Pierre LABADIE</b>	Chargé de Recherche, CNRS



# UNIVERSITE CLAUDE BERNARD - LYON 1

## **Président de l'Université**

Vice-président du Conseil d'Administration

Vice-président du Conseil des Etudes et de la Vie Universitaire

Vice-président du Conseil Scientifique

Directeur Général des Services

**M. François-Noël GILLY**

M. le Professeur Hamda BEN HADID

M. le Professeur Philippe LALLE

M. le Professeur Germain GILLET

M. Alain HELLEU

## ***COMPOSANTES SANTE***

Faculté de Médecine Lyon Est – Claude Bernard

Faculté de Médecine et de Maïeutique Lyon Sud – Charles  
Mérieux

Faculté d'Odontologie

Institut des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques

Institut des Sciences et Techniques de la Réadaptation

Département de formation et Centre de Recherche en Biologie  
Humaine

Directeur : M. le Professeur J. ETIENNE

Directeur : Mme la Professeure C. BURILLON

Directeur : M. le Professeur D. BOURGEOIS

Directeur : Mme la Professeure C. VINCIGUERRA

Directeur : M. le Professeur Y. MATILLON

Directeur : Mme. la Professeure A-M. SCHOTT

## ***COMPOSANTES ET DEPARTEMENTS DE SCIENCES ET TECHNOLOGIE***

Faculté des Sciences et Technologies

Département Biologie

Département Chimie Biochimie

Département GEP

Département Informatique

Département Mathématiques

Département Mécanique

Département Physique

UFR Sciences et Techniques des Activités Physiques et Sportives

Observatoire des Sciences de l'Univers de Lyon

Polytech Lyon

Ecole Supérieure de Chimie Physique Electronique

Institut Universitaire de Technologie de Lyon 1

Ecole Supérieure du Professorat et de l'Education

Institut de Science Financière et d'Assurances

Directeur : M. F. DE MARCHI

Directeur : M. le Professeur F. FLEURY

Directeur : Mme Caroline FELIX

Directeur : M. Hassan HAMMOURI

Directeur : M. le Professeur S. AKKOUCHE

Directeur : M. le Professeur Georges TOMANOV

Directeur : M. le Professeur H. BEN HADID

Directeur : M. Jean-Claude PLENET

Directeur : M. Y. VANPOULLE

Directeur : M. B. GUIDERDONI

Directeur : M. P. FOURNIER

Directeur : M. G. PIGNAULT

Directeur : M. le Professeur C. VITON

Directeur : M. le Professeur A. MOUGNIOTTE

Directeur : M. N. LEBOISNE





## Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier mes directeurs et co-directeurs de thèses : Jeanne Garric, Marc Babut et Benoît Ferrari.

Merci à Jeanne pour m'avoir offert l'opportunité d'être ma directrice de thèse et pour m'avoir apporté un regard différent sur mon travail.

Marc je te remercie tout particulièrement car tu as rapidement compris mon tempérament anxieux, tu as su me mettre en confiance et m'intégrer à part entière dans « ma thèse » comme tu me le répétais si souvent. Tu as été présent à chaque moment clé de la thèse, en m'aidant lors des arrêts d'expositions, en me consacrant du temps lors de réunions de réflexion mutuelle et en corrigeant tous mes écrits.

Benoît, merci pour ton soutien, toujours positif, devant chaque difficulté rencontrée, et merci pour ta vision et ta passion de ce métier de chercheur, qui m'ont vraiment inspiré pour la suite de ma vie professionnelle.

Je remercie également tous les membres de mon jury et plus particulièrement Catherine Gourlay-Francé et Sergi Sabater pour avoir accepté d'être les rapporteurs de mon travail de thèse ainsi qu'Emmanuelle Vuillet mais qui, pour des raisons administratives, n'a pas pu l'être.

Merci aussi à tous les membres de mon comité de pilotage, Pierre Marmonier, Jérémy Lebrun, Sébastien Sauvé lors de ces deux réunions qui ont eu lieu au cours de la thèse et qui m'auront permis de faire le point et d'aller plus loin dans les pistes de réflexions.

Je remercie mes co-auteurs, Magalie Houde, Rémy Beaudoin, Alexandre Péry, pour leur aide précieuse.

Je tiens également à remercier toute l'équipe de Bordeaux pour leur accueil et en particulier Hélène Budzinki et Pierre Labadie.

Pierre, merci de m'avoir transmis avec patience et bonne humeur, les différentes techniques d'extraction et d'analyse des perfluorés ainsi que tous les calculs et les dépouillages de pics pas toujours évident à distinguer pour moi. Ce n'est pas sans émotion que je te remercie, Gabriel, pour ton aide précieuse, ta répartie qui m'a à chaque fois fait mourir de rire, pour nos pauses goûter autour d'un chocolat chaud et d'un kinder, nos sorties et surtout pour ton amitié qui j'espère continuera au-delà de nos thèses respectives.

J'adresse également mes remerciements à toute l'équipe d'écotoxicologie, Alexandre, Patrice, Hervé, Adeline, Rémy, Arnaud. Olivier pour ton expertise sur le gammare et pour partager mon amour des shih tzu. Paul pour ta compréhension de « l'âme » qui règne dans le Poitou-Charentes et plus sérieusement pour partager ce bureau « des thésards » dans lequel tu es le seul garçon. Justement dans ce même bureau « des thésards », je tiens à remercier mes deux

acolytes thésardes, Judith et Amandine, nous avons commencé ensemble et au cours de ces trois années nous avons pu nous soutenir mutuellement afin de passer chaque étape, non sans difficulté, de la thèse.

Je tiens tout de même, à remercier plus particulièrement, Alex pour sa précieuse aide lors de mes expérimentations, son humour légendaire, pour tous nos moments de partage et pour son amitié. Je tiens également à rajouter un petit mot à l'attention de Judith, qui es pour moi, et je l'espère, le restera pour longtemps, une précieuse amie que l'on ne rencontre pas tous les jours.

Je remercie également nos anciens collaborateurs d'écotoxicologie à ne pas oublier, Manuella, Juliette et plus précisément Marion. Je vous remercie pour votre bonne humeur, votre aide et pour m'avoir soutenue dans les moments difficiles de la thèse. Marion, je te remercie pour toutes nos discussions, nos rires et nos moments de partage qui ont dépassé le stade de collègues de bureau, j'espère que nous arriverons à garder ce lien qui nous a unis au cours de ces deux années.

Maintenant je remercie mes amis, Ahmed, Marina, Vincent, Paulo, Laurie,..., pour m'avoir soutenue, comprise et apporté du réconfort et du courage dans les moments difficiles.

Un grand merci à ma famille et en particulier à ma maman qui est, et sera, toujours pour moi un soutien indéfectible et comme à chaque étape de ma vie, elle a été présente et aimante à mon égard. Maman, merci pour tout ce que m'a apporté dans ma vie me permettant aujourd'hui d'avoir des bases solides pour avancer et continuer sur ce chemin. Un autre merci tout particulier à ma grand-mère, mon père et Monique.

Et je tiens avec ton mon amour à remercier, mon chéri, Laurent, tu m'auras permis de voir au-delà de la thèse, tu m'as soutenue tout au long de cette dernière année clé, sans toi, je ne l'aurais pas vécu de la même manière, merci à toi, pour ça mon chéri, et pour tout ce qui se profile devant nous.

---

# Table des matières

Remerciements .....	VI
Table des matières .....	VIII
Liste de valorisations associées .....	XIV
Liste des abréviations .....	XVI
Liste des figures et des tableaux .....	XXI
Tableaux .....	XXII
Introduction .....	1
Chapitre 1 .....	5
Etat de l'art .....	5
1 Les composés per- et poly-fluorés .....	7
1.1 Historique .....	7
1.2 Définitions- synthèse (fabrication)- classification .....	10
1.2.1 : Définitions .....	10
1.2.2 : Synthèse des PFASs .....	12
1.2.3 : Classification des composés .....	13
1.3 Propriétés physico-chimiques .....	17
1.4 Applications et usages .....	18
1.5 A retenir .....	18
2 Impacts environnementaux des PFAS .....	19
2.1 Sources et occurrences .....	19
2.2 Devenir dans l'environnement .....	22
2.2.1 Biodégradation .....	22
2.2.2 Transport à longue distance .....	23
2.2.3 Bioaccumulation .....	24
3.3 Toxicité .....	32
3.4 Risques environnementaux .....	33
3.5 A retenir .....	33
3 L'écosystème sédimentaire .....	34
3.1 Structure et composition des sédiments .....	34
3.2 La biocénose associée aux sédiments .....	36
3.4 A retenir .....	40
4 Le chironome et le gammare, modèles d'invertébrés benthiques .....	40

---

4.1 Le chironome : <i>Chironomus riparius</i> (Meigen 1804).....	40
4.1.1 Répartition géographique et importance écologique.....	40
4.1.2 Cycle de vie et biologie du chironome.....	41
4.1.3 Utilisation du chironome en écotoxicologie.....	44
4.2 Le gammare : <i>Gammarus sp.</i> (complexe <i>fossarum/ pulex</i> ) .....	45
4.2.1 Répartition géographique et importance écologique.....	45
4.2.2 Cycle de vie et biologie du gammare .....	47
4.2.3 Utilisation du gammare en écotoxicologie.....	49
4.3 A retenir .....	55
5 Conclusion – objectifs de la thèse .....	55
Chapitre 2 .....	59
Matériels et méthodes.....	59
1 Plan expérimental global, présentation du site .....	61
1.1 Plan expérimental global.....	61
1.2 Présentation du site .....	61
2 Prélèvements, stockage et préparation des sédiments avant exposition.....	62
2.1 Prélèvements, stockage et caractérisation.....	62
2.1.1 Prélèvements de sédiments homogénéisés et stockage .....	62
2.1.2 Prélèvement de carottes de sédiments .....	63
2.1.3 Caractérisation physico-chimiques des sédiments et granulométrie.....	64
2.2 Préparation des chambres d'exposition et dopage des sédiments.....	65
2.2.1 Préparation des chambres ou aquariums d'exposition .....	65
2.2.2 Dopage des sédiments naturels .....	65
3 Prélèvements et élevage des organismes d'études .....	66
3.1 Origine des organismes.....	66
3.2 Elevage des chironomes.....	66
3.3 Prélèvements des gammares et maintien au laboratoire .....	67
4 Expositions des organismes au laboratoire et sur le terrain.....	68
4.1 Chironomes .....	68
4.1.1 Mesures des traits de vie et collecte des échantillons .....	68
4.1.1 Cinétique d'accumulation des PFASs à partir de sédiment naturel au laboratoire (Chapitre 3) .....	70
4.1.1.1 Mise en place du système d'exposition .....	70
4.1.1.2 Echantillonnage, mesure des traits de vies .....	72

---

4.1.2 Accumulation et élimination des PFASs à partir de sédiments contaminés (Chapitre 4) .....	72
4.1.2.1 Tests d'accumulation et d'élimination des PFASs à partir de sédiments dopés .....	73
4.1.2.2 Cinétiques d'élimination des PFASs à partir de sédiments naturels .....	74
4.1.2.3 Echantillonnage, mesure des traits de vie.....	76
4.1.3 Cinétiques d'accumulation et d'élimination des PFASs à partir de sédiment naturel non déstructuré au laboratoire (carotte de sédiment, Chapitre 6) .....	76
4.1.4.1 Mise en place du système d'exposition .....	76
4.1.4.2 Echantillonnage, mesure des traits de vie.....	78
4.1.5 Encagement d'organismes sur le terrain (Chapitre 6).....	79
4.2 Gammares .....	80
4.2.1 Recherche d'une population de gammares non impactée par la contamination en PFASs.....	80
4.2.2 Cinétique d'accumulation et d'élimination des PFASs à partir de sédiment naturel (Chapitre 5) .....	80
4.2.1.1 Mise en place du système d'exposition .....	80
4.2.1.2 Echantillonnage, mesure des traits de vie.....	82
5 Préparation des échantillons et analyse des PFASs par LC-MS/MS.....	83
5.1 Principes de la méthode .....	83
5.1.1 Solid Phase Extraction (SPE).....	83
5.1.2 LC-MS/MS.....	83
5.1.3 Schéma général d'extraction et d'analyse des PFASs .....	84
5.2 Extractions et purifications .....	84
5.2.1 Echantillons d'eau de surface et d'eau interstitielle.....	87
5.2.1.1 Conditionnement des cartouches SPE .....	87
5.2.1.2 Passage des échantillons d'eau de surface.....	88
5.2.1.3 Passage des échantillons d'eau interstitielle.....	88
5.2.1.4 Elution des PFASs .....	88
5.2.1.5 Concentration des éluats .....	89
5.2.1.6 Transfert des échantillons dans des vials à injection.....	89
5.2.2 Echantillons de sédiment.....	89
5.2.2.1 Extraction des échantillons de sédiment.....	89
5.2.2.2 Purification des échantillons de sédiment .....	90
5.2.3 Echantillons de biote, de Tetramin® et de feuilles d'aulnes.....	91

---

5.2.3.1	Extraction des PFASs .....	91
5.2.3.2	Purification des échantillons.....	91
5.3	Analyses par LC-MS/MS.....	93
5.4	Contrôle qualité et performance de la méthode .....	94
5.4.1	Rendement de la méthode .....	94
5.4.2	Limites de détection et de quantification .....	94
5.4.3	Matériel de référence.....	95
6	Dosages biochimiques .....	95
6.1	Dosage des protéines totales .....	95
6.2	Dosage des lipides totaux.....	96
7	Analyses isotopiques du $\delta^{13}\text{C}$ et du $\delta^{15}\text{N}$ .....	97
8	Analyses statistiques et modélisation .....	97
8.1	Traitements statistiques.....	97
8.2	Modélisation .....	97
Chapitre 3	.....	101
Caractérisation du transfert des PFASs du sédiment au chironome : Cinétique d'accumulation	.....	101
1	Objectifs.....	103
2	Bioaccumulation of perfluoroalkyl compounds in midge ( <i>Chironomus riparius</i> ) larvae exposed to sediment (Publication 1).....	103
3	Synthèse et ouverture.....	130
Chapitre 4	.....	131
Détermination des constantes d'accumulation et d'élimination des PFASs chez le chironome : développement d'un modèle de bioaccumulation .....		131
1	Objectifs.....	133
2	Refining PFAS uptake and depuration constants for <i>C. riparius</i> larvae: what can be learned from a simple model accumulation? (Publication 2).....	133
3	Synthèse et ouverture.....	155
Chapitre 5	.....	157
Evaluation de la variabilité interspécifique vis-à-vis de la bioaccumulation des PFASs: utilisation d'un amphipode d'eau douce, le gammarus.....		157
1	Objectifs.....	159
2	Accumulation of poly- and per- fluororoalkyl compounds (PFAS) by a freshwater amphipod: <i>Gammarus sp.</i> (Crustacea) (Publication 3) .....	159
3	Synthèse.....	182

---

Chapitre 6 .....	185
Réalisme environnemental des données acquises au laboratoire .....	185
1 Objectifs.....	187
2 Comparaison entre organismes autochtones et organismes exposés au laboratoire.....	188
2.1 Variabilité des concentrations dans les sédiments .....	188
2.2 Organismes autochtones et organismes exposés au laboratoire .....	191
3 Influence de l'intégrité de la matrice sédimentaire sur la bioaccumulation des PFASs par les chironomes .....	192
3.1 Introduction.....	192
3.2 Matériel et Méthode .....	193
3.2.1 Echantillonnage des carottes de sédiments sur le terrain et mise en place du système d'exposition .....	193
3.2.2 Exposition des organismes au laboratoire .....	194
3.2.3 Collecte des échantillons et mesure des traits de vie .....	196
3.2.4 Dosage des PFASs .....	197
3.2.5 Traitement des données et modélisation .....	197
3.3 Résultats et discussion .....	197
3.3.1 Caractérisation physico-chimique des sédiments.....	197
3.3.2 Répartition des PFASs dans les eaux et les sédiments.....	198
3.3.3 Survie et croissance des chironomes .....	200
3.3.4 Cinétiques d'accumulation et d'élimination des PFASs .....	201
3.3.5 Comparaison entre le chironome exposé à du sédiment homogénéisé et du sédiment non déstructuré.....	204
3.4 Conclusion .....	206
4 Influence des matières en suspension (MES) et de l'eau de surface comme sources complémentaires de PFASs .....	206
4.1 Introduction.....	206
4.2 Matériel et Méthode .....	207
4.2.1 Encagement des organismes sur le terrain .....	207
4.2.2 Dosage des PFASs .....	208
4.3 Résultats et discussion .....	208
4.3.1 Survie et croissance des organismes .....	208
4.3.2 Accumulation des PFASs chez le chironome .....	208
4.3.3 Caractérisation des sources de contaminations .....	210

---

4.4 Conclusion .....	213
5 Discussion - conclusion .....	213
Chapitre 7 .....	217
Synthèse et perspectives .....	217
1 Objectifs de la thèse.....	219
2 Synthèse des résultats .....	220
2.1 Modèle conceptuel .....	220
2.2 Rôle du compartiment sédimentaire dans la bioaccumulation des PFASs chez le chironome .....	221
2.3 Influence de la variabilité interspécifique sur la bioaccumulation des PFASs : utilisation du gammare.....	222
2.4 Comparaison de la bioaccumulation en PFASs entre chironome et gammare .....	224
2.5 Réalisme environnemental des données acquises au laboratoire.....	225
2.6 Limites des techniques et méthodes utilisées.....	226
3 Conclusion générale .....	227
4 Perspectives .....	228
4.1 Ouverture de la thèse .....	228
4.2 Rôle du biofilm microbien dans la bioaccumulation des PFASs.....	230
4.3 Influence de la bioturbation sur la bioaccumulation des PFASs .....	231
4.4 Potentiel de bioamplification des PFASs le long de la chaîne trophique .....	232
Références bibliographique.....	235
ANNEXES .....	257
Annexe 1 : Matériel supplémentaire publiée 1 .....	258
Annexe 2 : Matériel supplémentaire publiée 2 .....	274
Annexe 3 : Matériel supplémentaire publiée 3 .....	289
Annexe 4 : Effet de la température sur l'accumulation des PFASs chez le chironome.....	307

# Liste de valorisations associées

## ARTICLES

### ACCEPTÉ

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

### EN COURS

- Bertin, D., Ferrari, B.J.D., Labadie, P., Sapin, A., Da Silva Avelar, D., Beaudoin, R., Péry, A., Garric, J., Budzinski, H., Babut, M. (in prep.). Refining the PFASs uptake and depuration constants for larvae *C. riparius*: what can be learn from a simple model accumulation?
- Bertin, D., Labadie, P., Ferrari, B.J.D., Sapin, A., Garric, J., Geffard, O., Budzinski, H., Babut, M. (in prep.). Accumulation of poly- and perfluoroalkyl compounds (PFAS) by a freshwater amphipod: *Gammarus* sp. (Crustacea).

## COMMUNICATION ORALE

- Bertin D., Labadie P., Ferrari B.J.D., Garric J., Budzinski H., Babut M. Accumulation and elimination of perfluoroalkyl substances (PFASs) by the insect (*Chironomus riparius*) larvae (Diptera, Chironomidae) exposed to sediment. *Présenté au congrès de la SETAC Europe 24th à Bâle (Suisse) (du 11 au 15/05/2014)*.
- Bertin D., Ferrari B.J.D., Labadie P., Garric J., Budzinski H., Babut M. Bioaccumulation de composés perfluorés (PFASs) à partir de sédiment naturel chez deux espèces d'invertébrés benthiques. *Présenté au congrès de la SEFA à Besançon (du 01 au 02/07/2014)*.

## POSTERS

- Bertin D., Labadie P., Ferrari B.J.D., Garric J., Budzinski H., Babut M. Transfert of perfluorinated compounds from the sediment to benthic invertebrates. *Présenté au congrès Environmental Health 2013, à Boston (Etats-Unis) (du 3 au 6/03/2013)*.

*Ce même poster a été également présenté à la SETAC Europe 2013 à Glasgow (Ecosse) par Marc Babut (du 12 au 16 Mai 2013).*

- Bertin D., Labadie P., Ferrari B.J.D., Garric J., Budzinski H., Babut M. Accumulation and depuration of perfluorinated compounds in Chironomus riparius larvae. *Présenté au congrès de la SETAC North America 34th à Nashville (Etats-Unis) (du 17 au 21/11/2013).*

*Ce même poster a été également présenté au Workshop Per-and Polyfluorinated Alkyl Substances – PFAS à Copenhague par Pierre Labadie (Danemark) (du 27 au 29/10/2013).*

- Bertin D., Ferrari B.J.D., Labadie P., Garric J., Budzinski H., Babut M. PFASs exposure routes for midges (Chironomus riparius): a field experiment. *Présenté au congrès de la SETAC Europe 24th à Bâle (Suisse) (du 11 au 15/05/2014).*

## Liste des abréviations

**AFFF** : Mousse filmogène aqueuse

**APPB** : Arrêté Préfectoral de Protection de Biotope

**APFO** : Sel d'ammonium perfluorooctane

**BER** : Ile du Beurre

**BAF** : Facteur de bioaccumulation eau-biote

**BSAF** : Facteur de bioaccumulation sédiment-biote

**C** : Carbone

**Ca<sup>2+</sup>** : Ion calcium

**CaCO<sub>3</sub>** : Carbonate

**Cd** : Cadmium

**CE<sub>50</sub>** : Concentration efficace médiane

**COC** : Carbone organique colloïdale

**COD** : Carbone organique dissous

**COP**: Carbone organique particulaire

**Cr** : Chrome

**Cu** : Cuivre

**DCE**: Directive cadre sur l'eau

**DDE** : Dichlorodiphényldichloroéthane

**DDT** : Dichlorodiphényltrichloroéthane

**diPAP** : Fluorotélomère diphosphate ou acide polyfluoroalkyle phosphorique diester

**ECF** : Fluorination électrochimique

**Eh**: Electron

**ENS** : Espace Naturel Sensible

**EtFASAC** : N-éthyl perfluoroalcane sulfonamidoéthyle acrylate

**EtFOSA** : N-éthyl perfluoroalcane sulfonamide

**EtFOSAA** : Acide N-éthyl perfluorooctane sulfonamidoacétique

**EtFOSE** : N-éthyl perfluorooctane sulfonamidoéthanol

**F** : Fluor

**FAEO** : Alkylpolyglycol éther non ionique partiellement fluoré

**Fe** : Fer

**FEP** : Copolymère perfluoré d'éthylène-propylène

**FOSA** : Perfluoroactane sulfonamide

**FOSAA** : Acide perfluorooctane sulfonamidoacétique

**FP** : Fluoropolymère

**FTAC** : Fluorotélomère acrylique

**FTI** : Fluorotélomère iodure

**FTMAC** : Fluorotélomère méthacrylique

**FTO** : Fluorotélomère oléfine

**FTOH** : Fluorotélomère alcool

**FTSA** : Acide fluorotélomère sulfonique

**H** : Hydrogène

**HAP** : Hydrocarbure aromatique polycyclique

**HF** : Fluorure d'hydrogène

**HPF** : Hexafluoropropylène

**HPLC-MS/MS** : Chromatographie liquide haute performance couplé à deux spectromètres de masse

**K<sub>ow</sub>** : Coefficient octanol-eau

**MeFASAC** : N-méthyl perfluoroalcane sulfonamidoéthyle acrylate

**MeFOSAA** : Acide N-méthyl perfluorooctane sulfonamidoacétique

**MeFOSE** : N-méthyl perfluorooctane sulfonamidoéthanol

**MeOH** : Méthanol

**MO** : Matière organique

**monoPAP** : Fluorotélomère monophosphate ou acide polyfluoroalkyle phosphorique monoester

**N-alkyle FASA ou FASA** : N-alkyle perfluoroalcane sulfonamide

**N-alkyle FASAC ou FASAC** : N-alkyle perfluoroalcane sulfonamidoéthyle acrylate

**N-alkyle FASMAC ou FASMAC** : N-alkyle perfluoroalcane sulfonamidoéthyle méthacrylate

**N-alkyle FOSE ou FOSE** : N-alkyle perfluorooctane sulfonamidoéthanol

**Ni** : Nickel

**NOEC** : No Observed Effect Concentration

**NQE** : Norme de qualité environnementale

**O<sub>2</sub>** : Oxygène

**OCDE ou OECD** : Organisation de coopération et de développement économiques

**OW** : Overlying water

**PASF** : Fluorure sulfonyle perfluoroalcane

**Pb** : Plomb

**PCB** : Polychlorobiphényle

**PE** : Polyéthylène

**PFA** : Polymère perfluoroalkoxy

**PFAA** : Acide perfluoroalkyle

**PFAI** : Perfluoroalkyle iodure

**PFAS** : Substances per- et poly-fluoroalkyles

**PFBA** : Acide perfluorobutanoïque

**PFBS** : Perfluorobutane sulfonate

**PFCA** : Acide perfluoroalkyle carboxylique

**PFDA** : Acide perfluorodécanoïque

**PFDoA** : Acide perfluorododécanoïque

**PFDS** : Perfluorodécane sulfonate

**PFHpA** : Acide perfluoroheptanoïque

**PFHxA** : Acide perfluorohexanoïque

**PFHxS** : Perfluorohexane sulfonate

**PFNA** : Acide perfluorononanoïque

**PFOA** : Acide perfluorooctanoïque

**PFOS** : Perfluorooctane sulfonate

**PFPA** : Acide perfluoroalkyle phosphonique

**PFPA** : Acide perfluoropentanoïque

**PFPE** : Perfluoropolyéther

**PFPeA** : Acide perfluoropentanoïque

**PFPIA** : Acide perfluoroalkyle phosphinique

**PFSA** : Perfluoroalcane sulfonate ou acide perfluoroalcane sulfonique

**PFSiA** : Acide perfluoroalcane sulfinique

**PFTeDA** : Acide perfluorotétradécanoïque

**PFTrDA** : Acide perfluorotrodécanoïque

**PFUnA** : Acide perfluoroundécanoïque

**PNEC** : Predicted No Effect Concentration

**POCF** : Fluorure de carbonyle perfluorooctane

**POSF** : Fluorure sulfonyle perfluoroalkyle

**PP** : Polypropylène

**PTFE** : Polytétrafluoroéthylène

**PVDF** : Fluorure de polyvinylidène

**PVF** : Polyfluorure de vinyle

**PW** : Pore water

**QSAR**: Quantitative structure-activity relationship

**SAmPAP** : A base de EtFOSE

**SFA** : Fluorotélomère alcane semi- fluoré

**SFAene** : Fluorotélomère alcène semi- fluoré

**SO<sub>4</sub><sup>2-</sup>** : Sulfate

**STEP** : Station d'épuration

**TCDD** : 2,3,7,8- tétrachlorodibenzo-p-dioxine

**TFE** : Tétrafluoroéthylène

**US EPA ou EPA** : US Environmental Protection Agency

**xFOSA/E** : (N-méthyle/éthyle) perfluorooctane sulfonamide/ sulfonamidoéthanol

**Zn** : Zinc

**ZNIEFF** : Zone Naturelle d'Intérêt Ecologique, Floristique et Faunistique

# Liste des figures et des tableaux

## Chapitre 1

### Figures

**Figure 1 :** Diagramme retraçant les événements majeurs de l'histoire des PFASs (Lindstrom et al., 2011). **p.9**

**Figure 2 :** Exemple de substances perfluoroalkyles présentant deux groupements terminaux différents : a) un groupement carboxylate –COOH, le PFOA et b) un groupement sulfonate –SO<sub>3</sub>H, PFOS. **p.10**

**Figure 3:** Substances per- (a) et poly-fluoroalkyles (b). **p.11**

**Figure 4:** Information générale sur la production et les usages de l'acide perfluorooctanoïque (PFOA), de l'acide perfluorononoanoïque (PFNA), du fluorure sulfonyle perfluoroalkyle (POSF) et des produits de base les fluorotélomères ainsi que leur importance dans les émissions d'acide perfluoroalkyle carboxylate (PFCA : C4-C14). **p.13**

**Figure 5:** Synthèse des dérivés sulfonamido perfluoroalcane à partir d'un fluorure sulfonyle perfluoroalcane (PASFs), exemple avec un PASF à 8 atomes de carbone (à partir de Buck et al., 2011). **p.15**

**Figure 6:** Voies de transformations chimique des dérivés sulfonamido perfluoroalcanes (à partir de Buck et al., 2011). **p.16**

**Figure 7:** Classification des substances per- et poly- fluoroalkyles (PFASs) (à partir de Buck et al., 2011). **p.17**

**Figure 8:** Diagramme schématique des émissions de PFCA quantifiées au travers du cycle de vie des produits à base de POSF, PFOA, PFNA et de fluorotélomères. (FP = fluoropolymères) (à partir de Wang et al., 2014). **p.21**

**Figure 9 :** Description du benthos présent dans les sédiments d'eau douce. Les macro-invertébrés creusant dans les couches profondes du sédiment accélèrent le cycle des nutriments. **p.37**

**Figure 10 :** Schéma illustrant la bioturbation dans les sédiments. **p.38**

**Figure 11:** Schéma du devenir d'un contaminant dans un environnement aquatique, avec les potentielles sources, voies d'expositions (d'après Power and Chapman, 1992). **p.39**

**Figure 12 :** Cycle de vie du chironome. **p.41**

**Figure 13:** Structure du système digestif du Chironome (Craig et al., 1998). **p.42**

**Figure 14:** Description des différents stades de développement du chironome: *C. riparius* (Meigen 1804), (AFNOR, 2010; Durand, 2012; Tachet et al., 2000). **p.43**

**Figure 15:** Croissance des chironomes et différenciation entre les mâles et les femelles à partir du stade 4, en condition de nourriture ad libitum et à une température donnée (Péry et al., 2002) et B. J. D Ferrari com. pers. **p.43**

**Figure 16:** Aire de répartition de *Gammarus fossarum* (Barnard and Barnard, 1983). **p.46**

**Figure 17 :** Gammare mâle et femelle en précopula (photo : Hervé Quéau). **p.47**

**Figure 18:** Vue latérale d'un gammare (adaptée d'après Roux, 1970 ; Chevreux et Fage, 1970) pc 1-7 : plaques coxales 1-7 ; Pe 1-7 : périomères 1-7 ; Pl 1-3 : pléomères 1-3 ; Ur 1-3 : uromères 1-3. **p.48**

**Figure 19:** Coupe longitudinale d'un gammare (Schmitz, 1992). **p.48**

## Tableaux

**Tableau 1:** Exemple de composés perfluorés ( $\text{ng.g}^{-1}$  poids sec) retrouvés dans des sédiments localisés dans plusieurs pays. **p.27**

**Tableau 2 :** Données de concentration en PFASs dans divers invertébrés benthiques ( $\text{ng.g}^{-1}$  poids frais). **p.29**

**Tableau 3:** Exemple d'utilisation des chironomes et des gammares dans des études de bioaccumulation. **p.51**

**Tableau 4:** Résumé des caractéristiques des deux organismes tests de cette étude. **p.53**

## Chapitre 2

### Figure

**Figure 1:** Schéma expérimental global de la thèse. **p.61**

**Figure 2:** Localisation du site d'étude, BER = île du Beurre (A. François). **p.62**

**Figure 3:** Prélèvement de sédiment et tamisage. **p.63**

**Figure 4 :** Prélèvements de carottes de sédiments, a) collecte des carottes et b) conditionnement des carottes. **p.64**

**Figure 5:** Couches oxique et anoxique des sédiments dans les aquariums après une semaine de décantation. **p.65**

**Figure 6:** Cycle de vie de *Chironomus riparius*. **p.67**

**Figure 7:** Photographie d'un lot de 10 chironomes. **p.69**

**Figure 8 :** Système Rhizon® : a) photographie du système, b) collecte de l'eau interstitielle du sédiment. **p.70**

**Figure 9:** Design expérimental des cinétiques d'accumulation des PFASs par les chironomes à partir de sédiment naturel, E1: exposition des organismes à partir du stade 2 jusqu'à la fin du stade 4, E2: exposition des chironomes du début du stade 4 jusqu'à la fin de ce même stade. **p.71**

**Figure 10:** Photographie des aquariums avec du sédiment et avec de la silice. **p.72**

**Figure 11:** Design expérimental des expérimentations E1 et E2. **p.74**

**Figure 12:** Design expérimental de l'expérimentation E3. **p.75**

**Figure 13:** Système d'exposition des chironomes à des carottes de sédiments, a) système d'exposition et b) système Rhizon® sur une carotte. **p.77**

**Figure 14:** Design expérimental des chironomes exposés à des carottes de sédiments. **p.78**

**Figure 15 :** Système d'encagement des chironomes sur le terrain : a) mis en place des chironomes dans le système et b) cages fermées avec leurs tubes flexibles permettant le nourrissage des organismes. **p.79**

**Figure 16:** Résultats de la prospection d'une population de gammare non impacté par la contamination en PFASs. **p.80**

**Figure 17:** Photographie des aquariums sédiment et témoin utilisés pour l'exposition des gammares. **p.81**

**Figure 18:** Design expérimental des cinétiques d'accumulation (E1) et d'élimination (E2) des PFASs par les gammares. **p.82**

**Figure 19:** Cartouche SPE (Phenomenex Strata-XAW). **p.83**

**Figure 20:** Préparation des échantillons avant leurs analyses par LC-MS/MS (développé par P. Labadie). **p.84**

**Figure 21:** Description du matériel nécessaire aux extractions sur cartouches SPE. **p.87**

**Figure 22:** Concentration des échantillons sous flux d'azote. **p.89**

**Figure 23:** Cartouche carbone graphite. **p.91**

**Figure 24:** Purification des échantillons de biote, de Tetramin® et de feuilles. **p.93**

**Figure 25 :** Illustration du modèle de partition à deux compartiments. **p. 98**

**Figure 26 :** Schéma de cinétiques d'accumulation et d'élimination d'une substance par un organisme utilisant un modèle de partition à deux compartiments. **p. 99**

## Tableaux

**Tableau 1 :** Détails de la méthode de dopage des sédiments. **p.73**

**Tableau 2:** Etalons internes associés à chaque molécule de PFASs dosés. **p.86**

## Chapitre 3

### *Publication 1*

## Figure

**Figure 1:** Study site of the Rhône River, France, BER = Beurre Island, Plant = PFAS production plant. The river runs from north to south. **p.108**

**Figure 2:** Kinetics of PFAS accumulation in fourth instar larvae of *Chironomus riparius*. **p.116**

**Figure 3:** PFCA accumulation in E1 (left) and E2 (right) experiments. **p.117**

**Figure 4:** Partition between different compartments. **p.119**

## Tables

**Table 1:** PFAS concentration in chironomids at the end of E1 and E2 exposures (ng.g-1ww). **p.115**

**Table 2:** BSAF<sub>ww</sub> (goc.g-1ww) for chironomids and for *Lumbriculus variegatus*. **p.117**

**Table 3:** Model parameters with ( $k_e'$ ) and without growth correction ( $k_u$ ,  $k_e$ ). **p.123**

## Chapitre 4

### *Publication 2*

## Figure

**Figure 1:** Elimination kinetics of PFASs in chironomids with field sediment for each PFASs and with spiked sediment for the PFTrDA. **p.145**

**Figure 2:** Differences between concentration of exposure (S) and concentration in organisms (Ch) after exposure for E1 at T<sub>final</sub>. **p.147**

**Figure 3:** PFTrDA modelisation with the H1 hypothesis (concentration dependency). **p.148**

## Tables

**Table 1:** BSAF<sub>exp</sub> for each PFTrDA spiked concentrations in the E1 and E2 experiments. **p.146**

**Table 2:** Results of adjusted determination coefficient (adjusted R<sup>2</sup>) and distance calculations for the two assumptions and each molecule. N correspond to the number of data, P the number of parameter. **p.149**

**Table 3:** Parameters optimized for each PFASs with model hypotheses H1 for the PFTrDA and H2 for the other molecules, and BSAF calculation ( $BSAF = k_u/k_e$ ). **p.149**

## Chapitre 5

### *Publication 3*

## Figure

**Figure 1 :** Accumulation and elimination kinetics of PFOS, 6:2 FTSA the fluorotelomer and three precursors (MeFOSAA, EtFOSAA and FOSA). **p.171**

**Figure 2:** Perfluoroalkyl carboxylate (PFCA) accumulation and elimination kinetics. **p.172**

**Figure 3:** PFAS distribution between different compartment. **p.175**

## Tables

**Table 1:** PFAS concentration in gammarids at T3 (last point of the accumulation part of experiment) and in gammarids in control aquaria (ng.g<sup>-1</sup>ww). **p.170**

**Table 2:** Bioaccumulation model outcomes,  $k_u$  and  $k_e$  optimized simultaneously, the distance,  $R^2$  and  $R^2$  adjusted, and the calculation of the BSAF with model parameters. **p.173**

**Table 3:** Uptake and elimination coefficients estimated simultaneously (least-square method) with a bioaccumulation model, and BSAF<sub>model</sub> for *Chironomus riparius* (Bertin et al., 2014a) and *Gammarus fossarum/pulex* (present study). **p.177**

## Chapitre 6

### Figure

**Figure 1:** Comparaison des concentrations en PFASs entre chironomes autochtones et chironomes exposés pendant le stade 4 à du sédiment homogénéisé au laboratoire. **p.191**

**Figure 2:** Système de collecte des carottes de sédiments (a) et d'exposition des organismes au laboratoire (b). **p.194**

**Figure 3:** Système Rhizon® installé sur une carotte de sédiments. **p.194**

**Figure 4:** Design expérimental des chironomes exposés à des carottes de sédiments. **p.196**

**Figure 5:** Caractéristiques physico- chimique de la carotte de sédiments à T0, A) perte au feu et teneur en carbonates, B) teneur en azote, C) teneur en eau et D) granulométrie. **p.198**

**Figure 6:** Concentration en PFASs dans les carottes de sédiments à T0 (A) et à T3 (B) en ng.g<sup>-1</sup>dw. **p.200**

**Figure 7:** Croissance des chironomes pendant la cinétique d'accumulation (A) et pendant la cinétique d'élimination (B), (A)  $R^2 = 0.94$ ,  $p$ -value = 0.03 et (B)  $R^2 = 0.94$ ,  $p$ -value = 0.03. **p.201**

**Figure 8:** Cinétiques d'accumulation et d'élimination du PFUnA (A) et du PFTrDA (B) par des chironomes exposés à des carottes de sédiments. Les lignes rouges correspondent aux données simulées par le modèle et les points bleus aux données observées. **p.203**

**Figure 9:** Concentrations en PFASs dans les sédiments et dans les chironomes. **p.205**

**Figure 10:** Système d'encagement des chironomes sur le terrain : a) mis en place des chironomes dans le système et b) cages fermées avec leurs tubes flexibles permettant le nourrissage des organismes. **p.207**

**Figure 11:** Concentrations en PFASs dans les chironomes encagés en juin et en octobre 2013. **p.209**

**Figure 12:** Concentrations en PFASs dans l'eau du site échantillonnée en octobre 2013, A) concentrations en PFCAs et B) concentrations en PFSAs et en 6 :2 FTSA. **p.210**

**Figure 13:** Concentrations en PFASs dans des chironomes exposés à des carottes de sédiment au laboratoire et des chironomes encagés sur le terrain en juin et en octobre 2013. **p.211**

**Figure 14:** Concentrations en PFASs dans des chironomes exposés à du sédiment homogénéisé au laboratoire et des chironomes engagés sur le terrain en juin et en octobre 2013. **p.212**

**Figure 15:** Concentrations en PFASs dans des chironomes autochtones prélevés en octobre 2012 et en juin 2013, ainsi que dans des chironomes engagés en juin et en octobre 2013. **p.213**

## Tableaux

**Tableau 1 :** Dates des expérimentations et des prélèvements de chironomes réalisés au cours de la thèse. **p.188**

**Tableau 2:** Comparaison des différents prélèvements de sédiments composites au cours de la thèse, concentrations en PFASs et en PFTrDA exprimées en  $\text{ng.g}^{-1}$  de poids secs (ps). **p.190**

**Tableau 3:** Comparaison des différents prélèvements de sédiments composites au cours de la thèse après avoir retiré un point d'échantillonnage prélevé à un endroit différent de la lône (le BER-12-04-SED-E6), concentrations en PFASs et en PFTrDA exprimées en  $\text{ng.g}^{-1}$  de poids secs (ps). **p.190**

**Tableau 4 :** Tableau explicatif de l'utilisation de chacune des carottes de sédiments avant et pendant l'expérimentation menée au laboratoire. **p.195**

**Tableau 5 :** Concentrations en PFASs exprimées en  $\text{ng.g}^{-1}\text{ps}$  au niveau des différentes couches sédimentaire de la carottes T3. **p.199**

**Tableau 6:** Paramètres de sortie du modèle avec une constante d'élimination fixée à  $0.002 \text{ h}^{-1}$ , et  $\text{BSAF}_{\text{modèle}}$  calculé à partir des constantes  $k_u$  et  $k_e$ . **p.204**

**Tableau 7:** Comparaison de différentes variables caractérisant la bioaccumulation des PFASs chez le chironome à partir de sédiment homogénéisé (chapitre 3 et 4) et à partir de carottes de sédiments. **p.206**

## Chapitre 7

### Figure

**Figure 1:** Modèle conceptuel de la contamination en PFASs du chironome. **p.221**

**Figure 2:** Modèle conceptuel de la contamination en PFASs des gammares. **p.223**

### Tableaux

**Tableau 1 :** Principales différences dans la bioaccumulation des PFASs chez le chironome et le gammare. **p.224**





## Introduction

Il existe des millions de substances chimiques connues (CAS), pouvant potentiellement se retrouver dans l'environnement. Des critères d'évaluations des dangers de ces substances chimiques susceptibles de diffuser dans l'environnement ont alors été mis en place. Parmi ces critères, nous retrouvons (i) la quantité de substances chimiques produites et commercialisées qui doit s'élever à plus d'une tonne par an (EINECS), (ii) la persistance des composés dans le milieu liée à une faible dégradabilité biotique et abiotique, (iii) la bioaccumulation voire la bioamplification des composés le long de la chaîne trophique et (iv) la capacité des composés à être transportés sur de longues distances (Jones and de Voogt, 1999).

Des outils d'évaluation des risques ont alors été développés sur plusieurs décennies, et notamment des outils de modélisation du devenir des substances chimiques à différentes échelles spatiales. Cependant les outils d'évaluation des risques de ces composés sont actuellement basés sur le comportement des composés hydrophobes qui ne représentent qu'une fraction des gros tonnages. En effet, les composés polaires, les acides et les organométalliques n'entrent pas dans la catégorie des composés hydrophobes (Howard and Muir, 2010, 2011; Muir and Howard, 2006).

Les composés per- et poly-fluorés (PFASs) illustrent bien le manque de connaissance au sujet des composés émergents. Contrairement aux composés hydrophobes, les PFASs n'auraient pas d'affinité pour les lipides mais plutôt pour les tissus riches en protéines (Kelly et al., 2009; Luebker et al., 2002). Toutefois Giesy and Kannan (2001) ont montré une distribution globale du perfluorooctane sulfonate (PFOS), puis d'autres études ont montré que cette distribution globale s'étendait également à d'autres PFASs (Houde et al., 2011; Houde et al., 2006b). Certes, le PFOS a été inscrit sur l'Annexe B concernant les polluants organiques persistants de la convention de Stockholm. Cependant cette inscription s'est réalisée sur la base de simples observations : sa présence dans tous les milieux (l'eau, l'air, les sédiments, le biote et l'homme) et sa capacité de distribution à large échelle (Dreyer et al., 2009; Houde et al., 2011; Houde et al., 2006b). A l'heure actuelle, les mécanismes de bioaccumulation, de bioamplification et de transports de ces composés sont encore mal définis. De plus, de nouveaux produits fluorés commencent à être utilisés par les industriels, en remplacement du PFOS, sur lesquels nous manquons encore d'informations (Scheringer et al., 2014).

Dans ce travail de thèse nous avons choisi de travailler sur le compartiment sédimentaire. Les sédiments constituent le réceptacle final de divers rejets de contaminants via les stations d'épuration, les évacuations dans les océans, les lacs, les rejets industriels et les dépositions atmosphériques. Les contaminants organiques et inorganiques hydrophobes comme les polluants organiques persistants (POPs) s'absorbent aux particules, aux colloïdes et se retrouvent alors piégés dans les sédiments (Fu et al., 2003; Mac and Schmitt, 1992; Yang et al., 2005). Les PFASs ont été mesurés dans de nombreux sédiments (Ahrens et al., 2009; Benskin et al., 2012; Higgins et al., 2005) et certains auteurs suggèrent que ces derniers représentent une source majeure de la contamination (Armitage et al., 2006; Martin et al., 2004b). Les sédiments font donc à la fois office de puits et de source de contaminations. Enfin, ce compartiment abrite de nombreuses espèces benthiques et épi-benthiques (Covich et al., 1999), et participe au renouvellement des nutriments (Palmer et al., 2000), il représente donc un enjeu dans la gestion des risques environnementaux. A l'heure actuelle, le rôle du sédiment, et plus généralement, les voies d'expositions et les mécanismes de transfert des PFASs aux organismes restent encore mal compris.

Ce travail de thèse se place dans un contexte régional précis celui du bassin du Rhône qui est notamment sujet à de nombreuses contaminations de par la grande activité chimique et industriel qui y règne. En 2007, McLachlan et al. ont mis en évidence la présence de PFASs dans plusieurs grands fleuves d'Europe (Rhin, Danube, Elbe, Oder, Po, Seine et Loire). En 2010, la DREAL Rhône-Alpes (Délégation de bassin Rhône-Méditerranée et Corse) a conduit des analyses de PFASs dans des filets de poissons. Ces dernières ayant révélées la présence de ces substances, le projet TSIPFC s'est alors mis en place. Il se découpe en trois axes d'étude : (i) le premier étant de documenter les cinétiques d'accumulations des PFASs dans les invertébrés, (ii) le deuxième de décrire le rôle des sédiments dans les processus d'accumulation et (iii) le troisième de retracer l'historique de la contamination. Ce travail de thèse s'inscrit dans les deux premiers axes de ce projet.

Ce manuscrit est donc divisé en différents chapitres, le **premier** concerne l'état des connaissances sur le sujet et pose les objectifs de la thèse. Le **deuxième chapitre** présente le matériel et méthodes utilisés et suivi lors de ce travail de thèse. Le **troisième chapitre** vise à décrire les cinétiques d'accumulation des PFASs chez un organisme benthique, *Chironomus riparius*, et à comprendre les voies de transferts des PFASs à partir du sédiment chez cet

organisme. Le **chapitre 4** décrit les cinétiques d'élimination des PFASs chez le chironome, traite une hypothèse de dépendance à la concentration des composés à l'accumulation et pour finir propose un modèle de bioaccumulation adapté au chironome et à ces substances. Le **cinquième chapitre** vise à décrire les cinétiques d'accumulation et d'élimination des PFASs par un amphipode d'eau douce, *Gammarus sp.*, de comprendre les voies de transfert des PFASs via les sédiments et de comparer la bioaccumulation des PFASs entre le gammare et le chironome. Le **chapitre 6**, traite du réalisme environnemental des données acquises au laboratoire par la comparaison de données d'accumulation obtenues sur le terrain et de données d'accumulation obtenues au laboratoire. Ce chapitre explore notamment l'influence de la variabilité spatio-temporelle, l'effet de l'intégrité de la structure sédimentaire et l'influence des matières en suspension et de l'eau de surface comme sources de contamination sur la bioaccumulation des PFASs par le chironome. Et pour finir le **chapitre 7**, reprend tous les résultats obtenus dans ce travail de thèse et propose de nouvelles perspectives de recherches.



# **Chapitre 1**

***Etat de l'art***



# 1 Les composés per- et poly-fluorés

## 1.1 Historique

En France, suite à l'annonce de l'existence du sodium et du potassium en 1809, découvert par le chimiste anglais Humphrey Davy (1778-1829), André Marie Ampère (1775-1836) devine l'existence du chlore et du fluor mais ne publie pas ses recherches. Ce n'est qu'en 1886, qu'Henri Moissan (1852-1907) réussit à isoler le fluor. Quant au premier polymère polyfluoré, il fait son apparition en 1938, sous la forme de polytétrafluoroéthylène (PTFE) synthétisé par Roy Plunkette, un jeune chimiste travaillant au Jackson Laboratory (New-Jersey, USA). Le PTFE est fabriqué à partir de l'acide perfluorooctanoïque (PFOA) utilisé en tant qu'adjuvant (Lehmler, 2005) et fût tout d'abord utilisé par l'armée américaine lors de la Seconde Guerre mondiale, dans le cadre du projet Manhattan, en tant que joint d'étanchéité de bombe nucléaire, il était le seul à résister aux acides corrosifs utilisés dans la production de l'uranium 235. C'est ensuite que la compagnie Dupont, en 1949, dépose la marque Téflon®. Téflon® contient du PTFE mais aussi d'autres fluoropolymères, suite à cela de nouveaux produits fluorés ont émergé ainsi que de nombreuses applications industrielles (Dupont, 2013; Lindstrom et al., 2011). La compagnie 3M se lance dans le traitement de protection des tissus par le procédé scotchgard® en 1956 dont l'ingrédient clé est le perfluorooctane sulfonate (PFOS) (Betts, 2007).

Cependant ces molécules commencent à poser des problèmes sanitaires et environnementaux. En effet, en 1978, 3M conduit des analyses sur le sang de ses travailleurs et trouve du PFOA (Lindstrom et al., 2011). Puis en 1984, ce même composé est retrouvé dans une eau de boisson locale situé près de l'usine Washington Works (usine Dupont). Mais ce n'est qu'en 2001 qu'une première étude sur la distribution du PFOS dans l'environnement est conduite et révèle une répartition globale de ce dernier ainsi qu'une bioaccumulation dans la chaîne trophique (Giesy and Kannan, 2001). En mai 2000, sous la pression de l'US EPA, 3M annonce l'arrêt de la production du PFOA, du PFOS et de ces dérivés d'ici 2002 (3M, 2000, 2014; Paul et al., 2009). A la suite de cela, 3M reformule le procédé scotchgard® et depuis 2003, le PFOS est remplacé par du perfluorobutane sulfonate (PFBS) (3M, 2000; American Chemical Society, 2006). En 2009, le PFOS et ses dérivés sont inscrits à l'Annexe B de la Convention de Stockholm pour les polluants organiques persistants. Cette Annexe B autorise seulement certains pays à produire et utiliser ces composés. La Chine par exemple

continue à émettre ces composés (Zhang et al., 2012). L'USEPA, travaillant avec les 8 principales compagnies chimiques, prévoyait de réduire de 95% les émissions et les teneurs résiduelles en PFOA et en PFAS à longue chaîne d'ici 2010, avec pour objectif à plus long terme d'essayer d'éliminer les PFASs à longue chaîne d'ici 2015 dans le cadre du programme Stewardship 2010/2015 (EPA, 2013). Le PFOS et ses dérivés sont également inscrits sur la liste des substances prioritaires de la Directive Cadre sur l'Eau (Directive 2013/39/UE). La Figure 1, tirée de la revue de Lindstrom et al. (2011), résume les événements majeurs de l'histoire des PFASs.

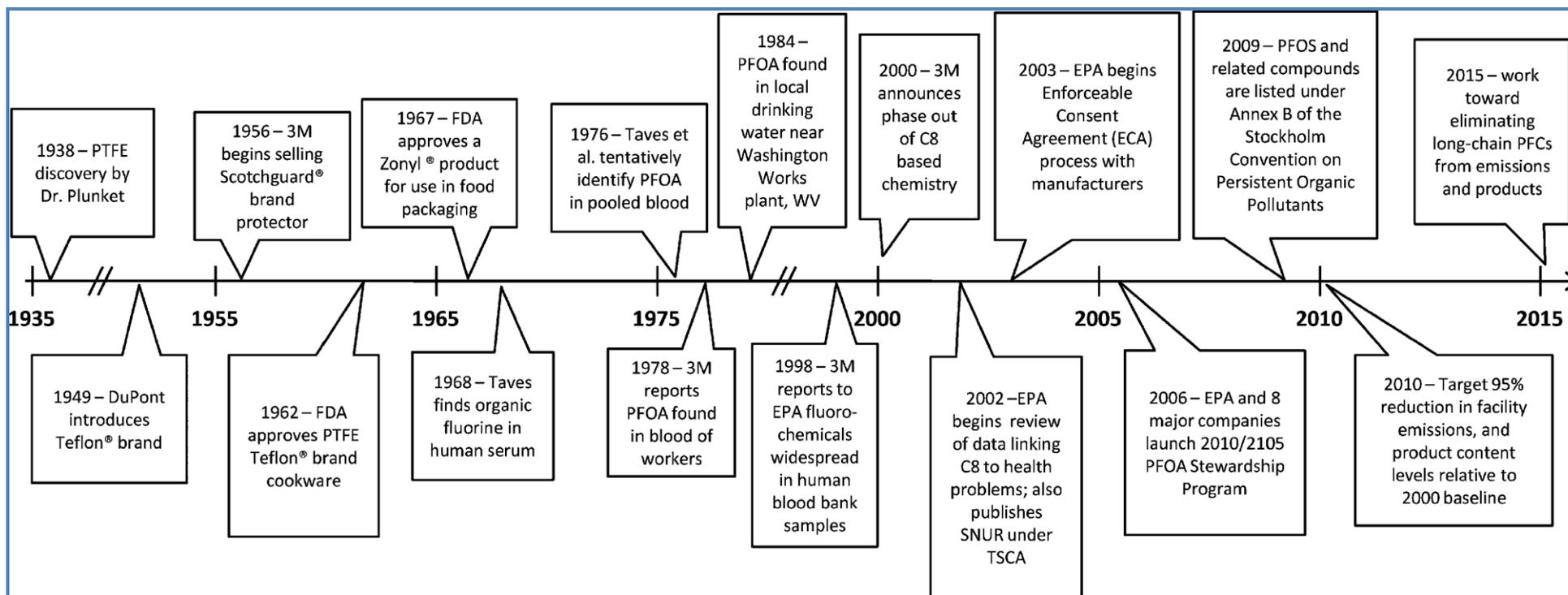


Figure 1 : Diagramme retraçant les évènements majeurs de l'histoire des PFASs (Lindstrom et al., 2011)

## 1.2 Définitions- synthèse (fabrication)- classification

Ce paragraphe a pour but de définir les termes de per- et poly-fluorés ainsi que d'illustrer la large variété de substances existantes. Les principes de synthèses sont également présentés car ces derniers ont eu un impact important dans la libération des composés dans l'environnement notamment en ce qui concerne les impuretés de fabrication.

### 1.2.1 : Définitions

Les substances per- et poly-fluoroalkyles (PFAS) constituent un ensemble complexe de molécules, où, sur un ou plusieurs atomes de carbone (C), les atomes d'hydrogène (H) ont été substitués par des atomes de fluor (F). De manière générale ces molécules contiennent un fragment perfluoroalkyle  $C_nF_{2n+1}$ .

- Les substances **perfluoroalkyles** sont des composés aliphatiques où tous les atomes de d'hydrogène présents sur **tous** les atomes de carbone de la chaîne alkyle ont été substitués par des atomes de fluor, sauf ceux présent sur le groupement terminal (exemple de deux substances perfluoroalkyles possédant deux groupements terminaux différents Figure 2). Ils sont constitués d'une chaîne alkyle hydrophobe de longueur variable (typiquement  $C_4$  à  $C_{16}$ ) et d'un groupe terminal hydrophile, ce qu'il leur confère un caractère amphiphile (Figure 3a).

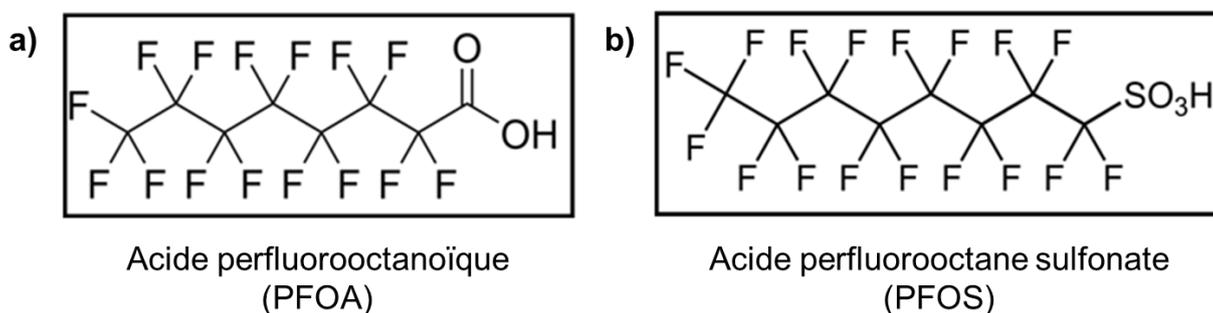


Figure 2 : Exemple de substances perfluoroalkyles présentant deux groupements terminaux différents : a) un groupement carboxylique  $-COOH$ , le PFOA et b) un groupement sulfonique  $-SO_3H$ , PFOS.

- Les substances **poly**fluoroalkyles sont définies comme étant des substances aliphatiques où tous les atomes d'hydrogène ont été substitué sur **quelques** atomes de carbone de la chaîne alkyle par des atomes de fluor. Ces molécules sont donc constituées d'un fragment perfluoroalkyl  $C_nF_{2n+1}$  - mais également d'un fragment  $CH_2-CH_2$  (comme par exemple le  $C_8F_{17}CH_2CH_2OH$  (Buck et al., 2011) (Figure 3b).

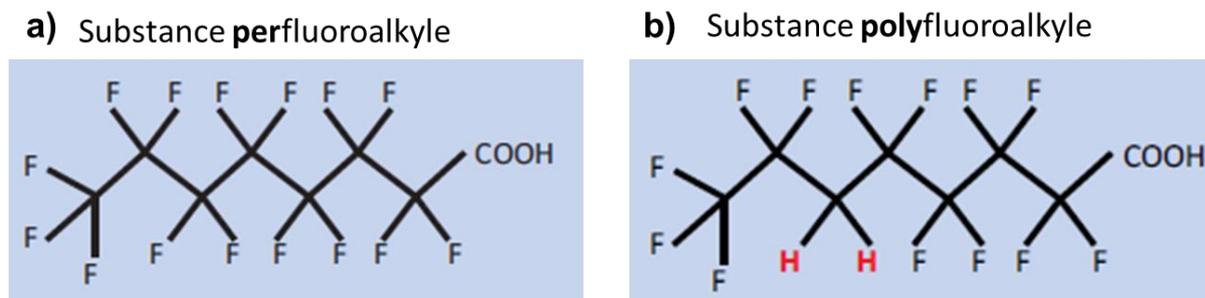


Figure 3: Substances per- (a) et poly-fluoroalkyles (b)

La longueur de la chaîne carbonée des PFASs et notamment des acides perfluoroalkyles (défini ci-après) est un paramètre important. Buck et al. (2011) dans leur revue ont défini le terme « composé à longue chaîne » en désignant :

→ les acides perfluoroalkyles carboxyliques (PFCA) avec 8 carbones et plus (ou bien 7 carbones perfluorés ou plus)

→ les perfluoroalcanes sulfonates (PFSA) avec 6 carbones et plus (ou bien 6 carbones perfluorés ou plus).

Cette définition pour les PFCA et les PFSA est différentes dans le nombre d'atome de carbone car un PFSA avec un nombre d'atome de carbone donné a tendance à être plus bioconcentré<sup>1</sup> et/ou bioaccumulé<sup>2</sup> qu'un PFCA avec le même nombre de carbone (Buck et al., 2011; Conder et al., 2008; Martin et al., 2003a, b).

<sup>1</sup>Bioconcentration : ce terme désigne la capacité des organismes à absorber un produit chimique via son système respiratoire et sa peau (sans inclure la voie trophique) (Weisbrod et al., 2007).

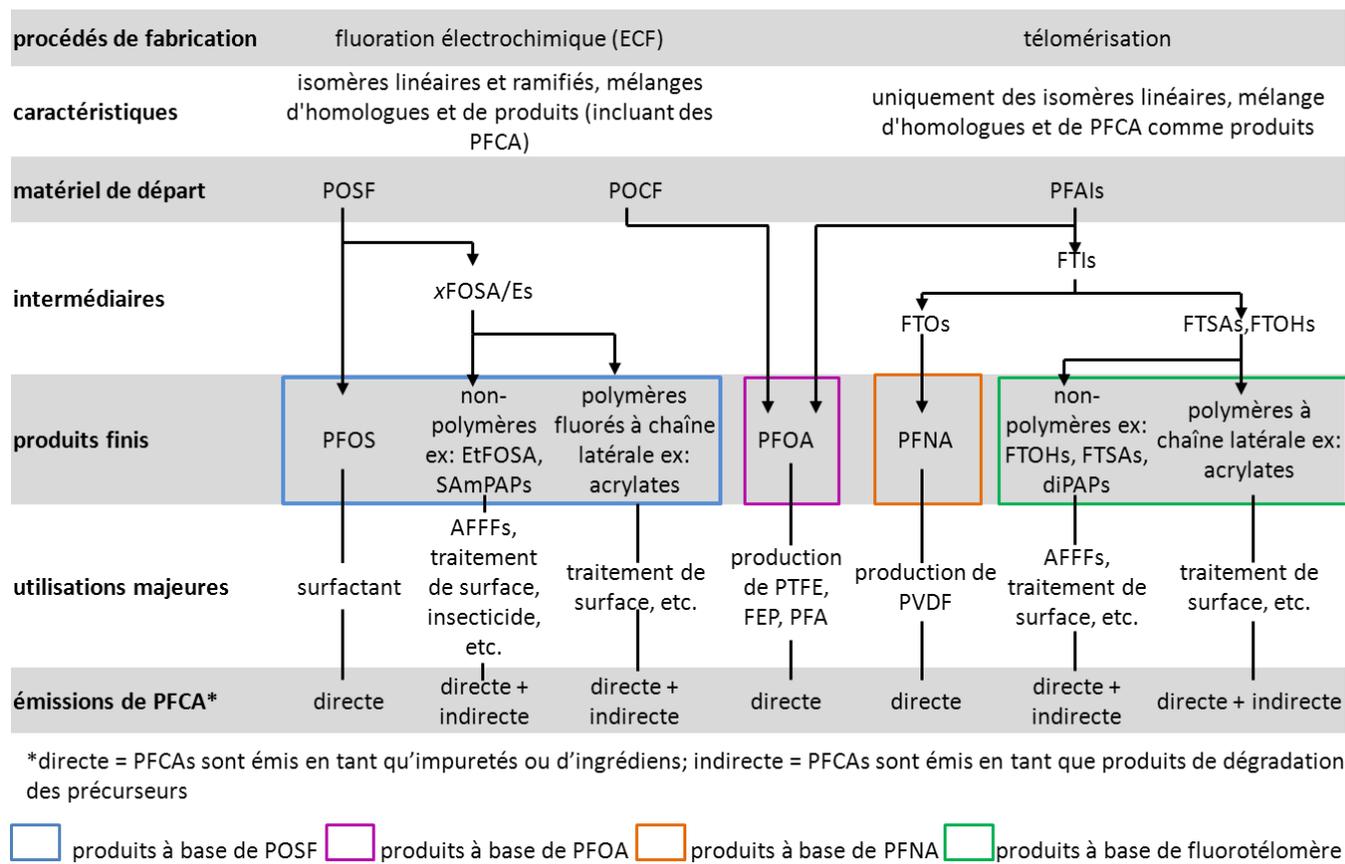
<sup>2</sup>Bioaccumulation : ce terme désigne l'accumulation nette et la rétention d'un produit chimique dans un organisme via toutes les voies d'exposition (trophique, tégumentaire et respiratoire) (Weisbrod et al., 2007).

### 1.2.2 : Synthèse des PFASs

Il existe deux voies de fabrication principale pour ces composés : la fluoration électrochimique (ou ECF) et la télomérisation (Buck et al., 2011).

L'ECF consiste en une réaction entre une chaîne hydrocarbonée et une molécule de fluorure d'hydrogène (HF) anhydre sous un courant électrique afin de remplacer les atomes d'hydrogène de la chaîne carbonée par des atomes de fluor. Cette technique est la seule à former un mélange d'isomère linéaire et ramifié (70-80% et 20-30% respectivement dans le cas de la fabrication du PFOS et du PFOA) (Arsenault et al., 2008; Buck et al., 2011; Vyas et al., 2007) (Figure 4). Cette technique a été abandonnée à l'arrêt de la production du PFOS, de ces dérivés et du PFOA, car elle était une source d'impuretés de fabrication, en Europe et en Amérique du Nord cependant certain l'utilise encore pour produire ces composés (Buck et al., 2011; J.R. Parsons et al., 2008; Olsen et al., 2009; Renner, 2006).

La télomérisation se réalise en plusieurs étapes, la première étape est celle de la rencontre entre un perfluoroalkyle iodure  $C_mF_{2m+1}I$  (PFAI) appelé « télogène » et d'un tétrafluoroéthylène  $CF_2=CF_2$  (TFE) appelé « taxogène » donnant un « télomère A »  $C_mF_{2m+1}(CF_2CF_2)I$ . La deuxième étape est une réaction entre le télomère A et une molécule d'éthylène  $CH_2=CH_2$  donnant comme produit un iodure fluorotélomère  $C_mF_{2m+1}(CF_2CF_2)_nCH_2CH_2I$  appelé « télomère B ». Ces télomères A et B sont des matériaux intermédiaires de réactions qui vont plus loin dans la transformation réagir et créer la famille des fluorotélomères appelés aussi précurseurs qui rentre dans la composition de surfactants et de produits polymères (Buck et al., 2011). Les produits de réaction fabriqués par télomérisation sont uniquement constitués d'isomères linéaires (Lindstrom et al., 2011) (Figure 4).



**Figure 4: Information générale sur la production et les usages de l'acide perfluorooctanoïque (PFOA), de l'acide perfluorononoanoïque (PFNA), du fluorure sulfonyl perfluoroalkyle (POSF) et des produits de base les fluorotélomères ainsi que leur importance dans les émissions d'acide perfluoroalkyle carboxylate (PFCA : C4-C14).**

POCF = fluorure de carbonyl perfluorooctane, xFOSEA/Es = (N-méthyle/éthyle) perfluorooctane sulfonamide/sulfonamidoéthanol, SAmPAPs = à base de EtFOSEA diphosphate, PFAI = iodure perfluoroalkyle, FTI = fluorotélomère iodure, FTO = fluorotélomère oléfine, FTSA = acide fluorotélomère sulfonique, FTOH = fluorotélomère alcool, PFOS = acide perfluorooctane sulfonique, diPAP = fluorotélomère diphosphate, AFFF = mousse filmogène aqueuse, PTFE = polytétrafluoroéthylène, FEP = copolymères perfluorés d'éthylène-propylène, PFA = polymères perfluoroalkoxy, PVDF = fluorure de polyvinylidène (à partir de Wang et al., 2014).

### 1.2.3 : Classification des composés

Parmi les substances per- et poly-fluoroalkyles (PFAS), nous pouvons distinguer deux grandes catégories de composés : les polymères et les non-polymères. Un polymère est une substance constituée d'une ou de plusieurs unités de monomère. Ensuite chaque catégorie est constituée de famille de composés. La catégorie des composés non-polymères se décompose en 4 grandes familles :

La première est (i) **la famille des acides perfluoroalkyles (PFAA)** qui regroupe les acides perfluoroalkyles carboxyliques (PFCA, groupement  $-\text{COOH}$ , ex : le PFOA), les acides

perfluoroalcanes (ou alkyle) sulfonique (PFSA, groupement  $-\text{SO}_3\text{H}$ , ex : perfluorooctane sulfonate PFOS) (Figure 2), les acides perfluoroalcanes (ou alkyle) sulfonique (PFSiAs, groupement  $-\text{SO}_2\text{H}$ ), et les acides perfluoroalkyles phosphonique et phosphinique (PFPAAs, groupement  $-\text{P}(=\text{O})(\text{OH})_2$ , et PFPiAs, groupement  $-\text{P}(=\text{O})(\text{OH})(\text{C}_m\text{F}_{2m+1})$ ).

La seconde est (ii) **la famille des produits de base : les fluorotélomères**, qui rassemblent les iodures perfluoroalkyle (PFAIs), les fluorotélomères iodure (FTIs), les fluorotélomères oléfine (FTO), les fluorotélomères alcools (FTOH) et leurs acryliques (FTAC), méthacrylique (FTMAC) et esters phosphoriques appelés aussi acides polyfluoroalkyles phosphoriques monoesters (monoPAP) et diesters (diPAP). Mais aussi les alcanes et alcènes semi-fluorés (SFA et SFAene) et les acides fluorotélomères sulfonique (FTSAs). Les fluorotélomères sont présentés sous la forme  $n : 2$  FTOH pour un fluorotélomère alcool par exemple. Le  $n$  désigne le nombre de carbone fluoré et le 2 le nombre de carbone non fluoré. Cette famille désignent la famille des produits précurseurs des surfactants et des polymères et leur dégradation est une source de PFCAs pour l'environnement (Buck et al., 2011; J.R. Parsons et al., 2008; Prevedouros et al., 2006).

Puis la troisième est (iii) **la famille des dérivés sulfonamido perfluoroalcane** qui regroupe les perfluoroalcanes sulfonamides, sulfonamidoéthanol, sulfonamidoéthyl acrylates et sulfonamidoéthyl méthacrylates. Ils jouent un rôle analogue à celui de précurseur dans la fabrication des PFSAAs (ex : PFOS), mais aussi de tous les composés ayant dans leur structure un groupe perfluoroalcane sulfonamido  $\text{C}_n\text{F}_{2n+1}\text{SO}_2\text{N}<$ . La figure 4 illustre la synthèse de plusieurs composés de la famille des dérivés sulfonamido perfluoroalcane. Le N-alkyle FASA, qui est le produit de la première réaction, est un produit commercialisable sous cette forme, dans la plupart des cas, par exemple le N-éthyl sulfonamido perfluoroalcane (EtFOSA) est un pesticide sulfluramide. Le N-alkyle FOSE (produit de la deuxième réaction) est un analogue du FTOH et peut être converti en acrylate et méthacrylate comme dans des phosphates ou d'autres dérivés. Les MeFASAC et EtFASAC sont utilisés comme les fluorotélomères acrylate et méthacrylate comme comonomères pour la synthèse des polymères acrylique utilisés dans des applications de protection de surface. Ces dérivés synthétisés de manière artificielle peuvent être biotransformés en condition aérobie comme par exemple le EtFOSE qui est ultimement dégradé en PFOS et ainsi être libéré dans l'environnement (Figure 5).

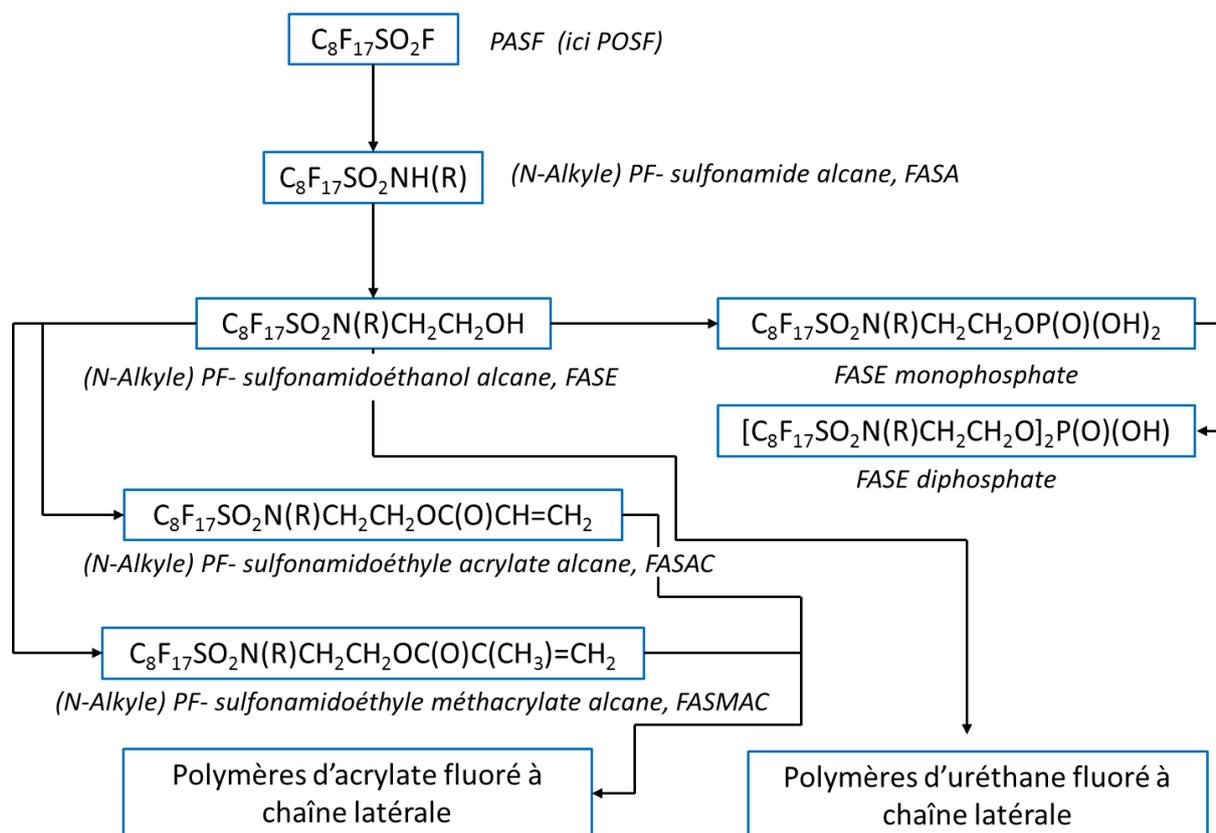


Figure 5: Synthèse des dérivés sulfonamido perfluoroalcane à partir d'un fluorure sulfonyle perfluoroalcane (PASFs), exemple avec un PASF à 8 atomes de carbone (à partir de Buck et al., 2011).

La famille suivante est la dernière famille de cette catégorie des non-polymères, il s'agit de (iv) **la famille des acides perfluoroalkyles et polyfluoroalkyles carboxylique éthers** : leurs sels sont notamment utilisés comme matériaux alternatifs dans la fabrication des fluoropolymères.

La deuxième catégorie des composés polymères regroupe trois grandes familles :

(i) **La famille des fluoropolymères**, ils sont composés d'un squelette ne contenant que des atomes de carbone avec un ou plusieurs atomes de fluor directement reliés à la chaîne carbonée. Par exemple : le polytétrafluoroéthylène (PTFE), le polyfluorure de vinylidène (PVDF), le polyfluorure de vinyle (PVF), les copolymères de tétrafluoroéthylène (TFE), l'hexafluoropropylène (HPF).

(ii) **La famille des perfluoropolyéthers (PFPEs)** sont des polymères d'unités  $-CF_2-$  ;  $-CF_2CF_2-$  ou  $-CF(CF_3)CF_2-$  séparés par des atomes d'oxygène. Les 2 ou 3 atomes de carbone perfluoré par atome d'oxygène constituant ces molécules les empêchent d'être dégradées en

PFCAs à longues chaînes ; cette famille constitue donc une alternative potentielle à la fabrication des polymères synthétisés par ECF, des polymères à base de fluorotélomère et des polymères fluorés oxétane (catégorie iii des polymères fluorés, ci- dessous).

(iii) **Et la famille des polymères à chaîne latérale fluorée** sont constitués d'un squelette sans polymère fluoré mais avec des chaînes latérales fluorées et une terminaison -  $C_nF_{2n+1}$ . Ce type de polymère est une source de PFAAs à longue chaîne, cependant les processus de dégradation peuvent avoir lieu après une longue période de résidence (estimée à plus de 1000ans), ils constituent donc une faible source de PFAAs à l'environnement. On trouve notamment des polymères fluorés acrylates, des polymères fluorés uréthanes et des polymères fluorés oxétanes (Buck et al., 2011) (Figure 6).

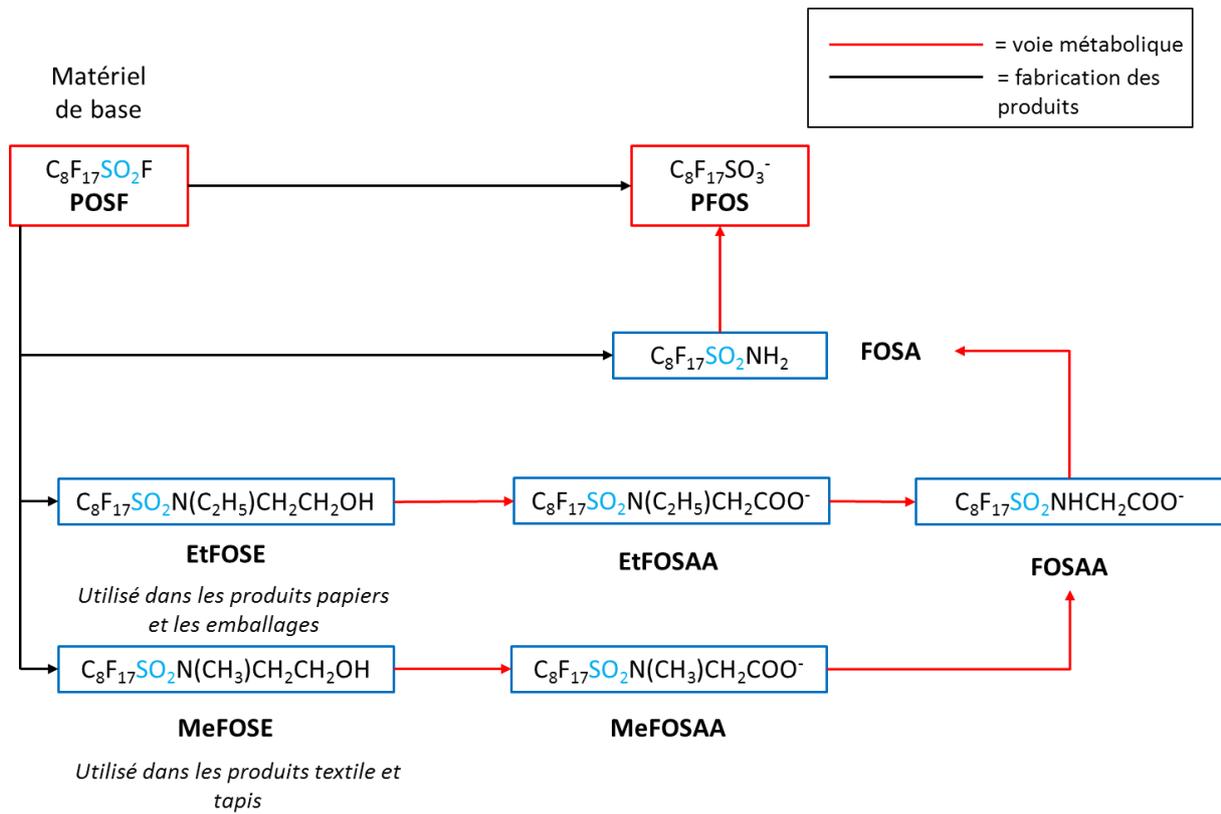


Figure 6: Voies de transformations chimique des dérivés sulfonamido pefluoroalcanes (à partir de Buck et al., 2011).

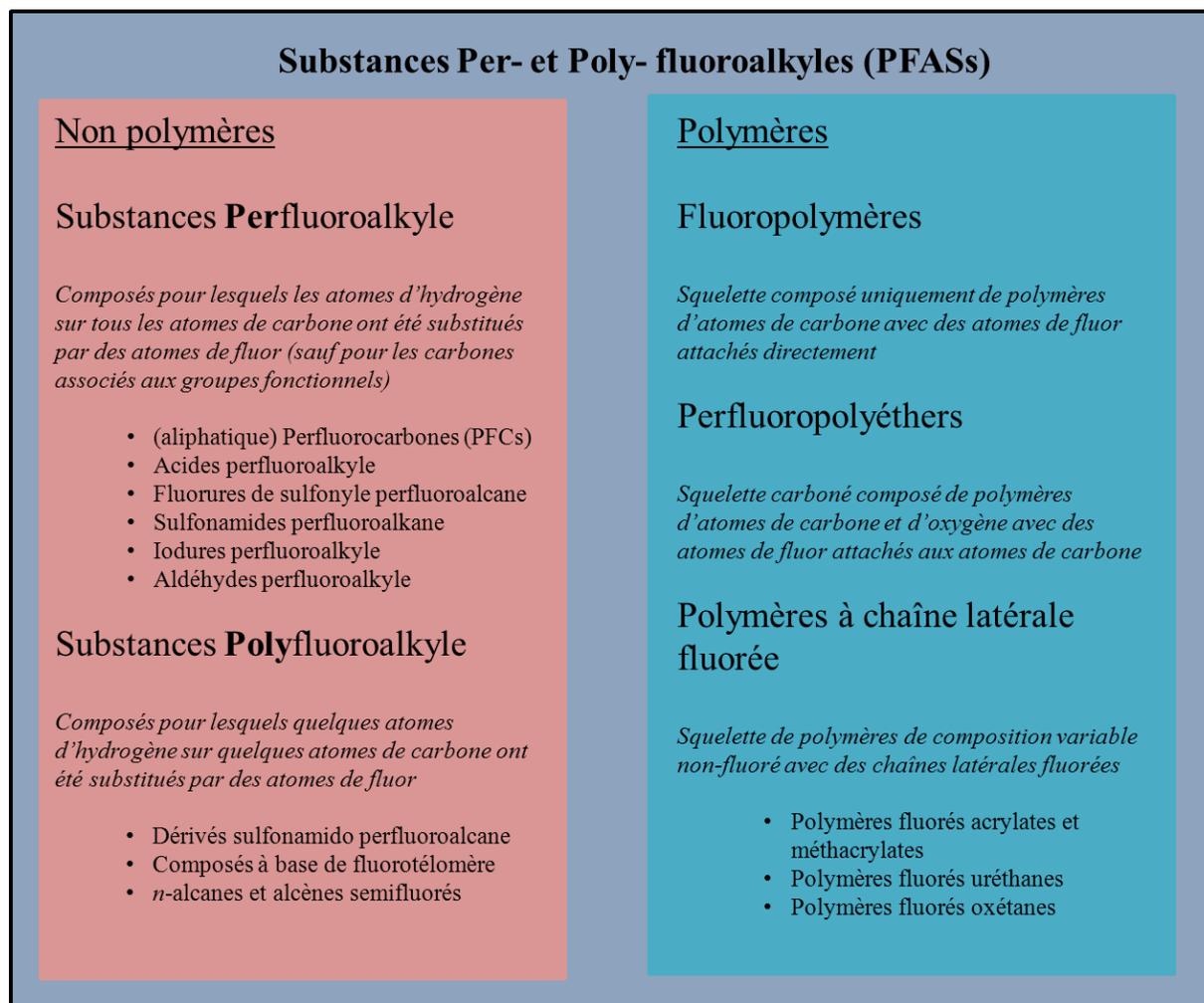


Figure 7: Classification des substances per- et poly- fluoroalkyles (PFASs) (à partir de Buck et al., 2011)

Dans ce travail de thèse nous nous concentrons sur l'étude des acides perfluoroalkyles carboxylique (PFCA) et sulfonique (PFSA), des dérivés sulfonamido perfluoroalcane et des fluorotélomères.

### 1.3 Propriétés physico-chimiques

La liaison carbone-fluor (C-F, environ  $450 \text{ kJ.mol}^{-1}$ ) est une des plus fortes liaisons existantes, elle résiste à de nombreuses attaques (acides, basiques, réductrices, oxydantes) et à de très hautes températures. Cette force confère une grande protection au carbone, et plus le nombre d'atome de fluor autour de l'atome de carbone est grand plus la liaison est forte (Kissa, 1994, 2001). Cette force de liaison rend ces substances très stables dans l'environnement. Elles peuvent être sous forme protonée ou anionique, suivant le pH, la salinité du milieu et le pKa de la substance (Goss, 2007; Jeon et al., 2010a; Jeon et al.,

2010b). La plupart de ces molécules possèdent un pôle hydrophile (groupement fonctionnel) et un pôle hydrophobe (chaîne carbonée), notamment les acides perfluoroalkyles, ce qui leurs confèrent un caractère amphiphile. Ce caractère amphiphile, la grande résistance de ces molécules, leur faible point d'ébullition et de tension de surface, leurs confèrent de nombreuses applications industrielle (Banks RE, 1994; Kissa, 1994, 2001).

#### **1.4 Applications et usages**

De par leurs propriétés physico-chimiques particulières, les PFAS sont des molécules intéressantes d'un point de vue économique. Ils sont utilisés en tant que surfactants ou en tant que polymères. Les surfactants ont pour propriété d'abaisser la tension de surface de l'eau, ils peuvent servir d'émulsifiants, de dispersant. Ils peuvent être disponibles sous la forme liquide, de pâte ou solide. Ces surfactants vont être retrouvés dans une large gamme de produits de consommation courante comme dans les papiers, à l'intérieur des boîtes de conserves, dans les cosmétiques, dans les mousses extinctrices d'incendies, en tant que revêtement imperméabilisant de chaussure, etc. Les polymères, eux, vont être utilisés en tant que retardateur de salissures, revêtement dans les poêles et autres ustensiles de cuisine, répulsifs, traitement anti tâche pour les tapis, films alimentaires et plastiques (ex : PTFE, PVDF) (Banks RE, 1994; Kissa, 1994, 2001).

#### **1.5 A retenir**

Ce qui est important à retenir dans cette première partie est :

- la différence entre composés perfluoroalkyles (où tous les atomes d'hydrogène ont été substitués par des atomes de fluor sur la chaîne carbonée) et polyfluoroalkyles (où seulement quelques atomes d'hydrogène ont été substitués par des atomes de fluors sur la chaîne carbonée) ;
- la définition de la longueur de chaîne des composés qui est différente entre un acide perfluoroalkyle carboxylique (PFCA) et un composé perfluoroalcane sulfonate (PFSA) ;
- la production d'impuretés de fabrication par la méthode de synthèse de la fluoration électrochimique (ECF) ;
- les classes de composés étudiées dans ce travail de thèse sont : les acides perfluoroalkyles carboxyliques (PFCA), les perfluoroalcanes sulfonates ou acides

perfluoroalkyles sulfonique (PFSA), les fluorotélomères et les dérivés sulfonamido perfluoroalcane ;

- ces composés sont très résistants et ont de nombreuses applications industrielles sous la forme de surfactants et de polymères.

## 2 Impacts environnementaux des PFAS

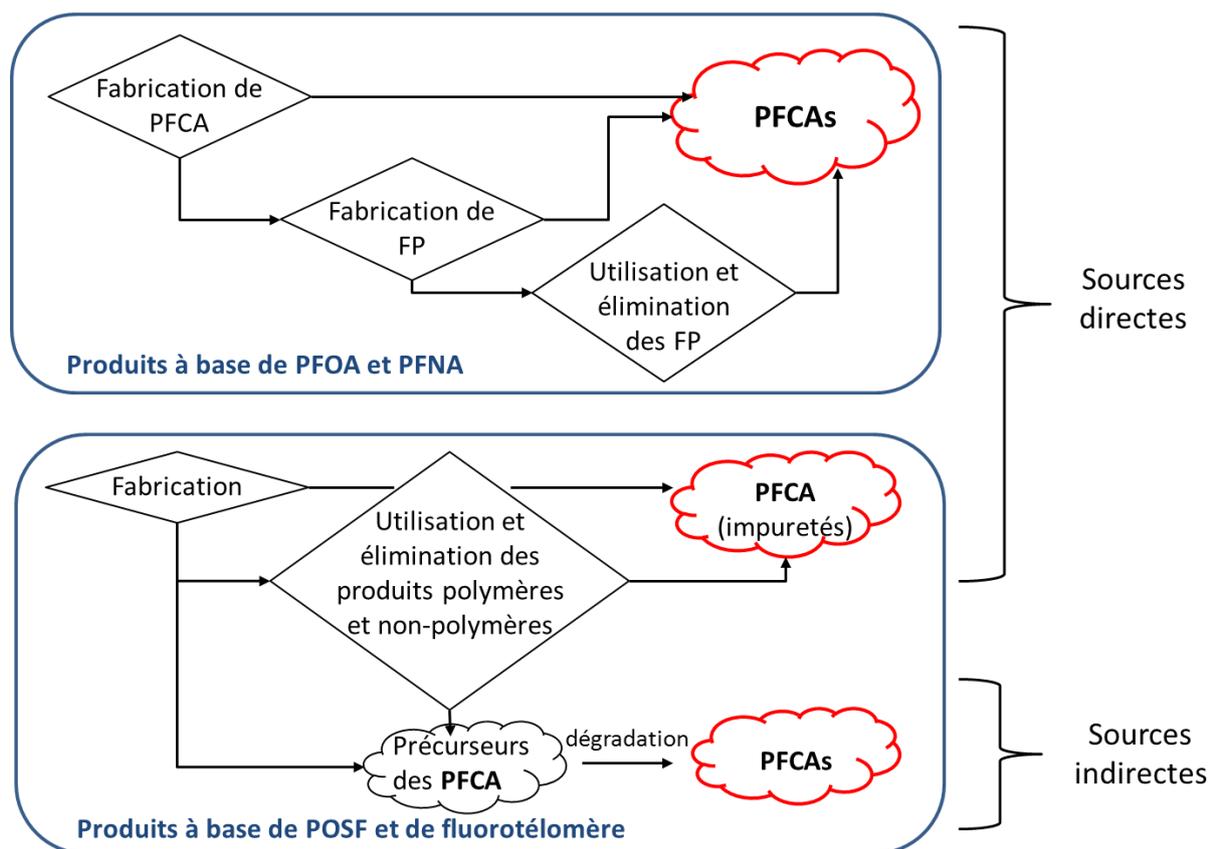
### 2.1 Sources et occurrences

La fabrication et les usages des PFASs conduisent à leur libération dans l'environnement. Ces composés ont une capacité de diffusion à grande échelle (Dreyer et al., 2009), de nombreuses études montrent leur présence dans tous les milieux, l'air, les eaux, les sédiments, les organismes vivants, y compris l'homme, et partout dans le monde, jusqu'aux pôles (Houde et al., 2011; Houde et al., 2006b). Houde et al. (2006b) dans leur revue montrent qu'entre 1980-1990 et 2005, l'exposition aux PFASs a augmenté significativement dans l'environnement (organismes et humains). Dans leur deuxième revue Houde et al. (2011) montrent que plusieurs études indiquent une diminution des concentrations en PFOS dans l'environnement mais qu'en parallèle une tendance à l'augmentation des concentrations en PFCAs a été mesurée dans des tissus d'organismes aquatiques. Ce qui coïncide avec l'arrêt de la production du PFOS dans les années 2000. De plus, la persistance de ces composés dans l'environnement est largement reconnue et il existe un consensus sur la dégradation des fluorotélomères, mais aucune preuve sur celle des PFCAs et des PFSAs (ne contenant que des atomes de fluor sur la chaîne carbonée) n'est encore connue (J.R. Parsons et al., 2008).

Buck et al. (2011) proposent d'harmoniser les différents termes utilisés (classification, terminologie et origines) concernant les PFASs et reprend l'étude de Prevedouros et al. (2006) pour définir les différentes sources existantes dans l'émission des PFASs dans l'environnement. Il existe deux types de sources d'émissions : les sources d'émissions directes et les sources d'émissions indirectes.

Les sources d'émissions directes correspondent à la fabrication des produits manufacturés (cycle de vie des produits), à l'élimination, aux usages mais aussi aux impuretés de fabrication. Les sources d'émissions indirectes représentent simplement la part de biodégradation dans l'environnement des précurseurs comme par exemple pour le PFOA, la biotransformation du 8:2 fluorotélomère alcool (8:2 FTOH) ou de la dégradation

atmosphérique du perfluorobutane sulfonamidoéthanol ( $C_4F_9COOH$ ) (Buck et al., 2011) (Figure 8). Une récente étude (Wang et al., 2014) complète une précédente (Prevedouros et al., 2006) et estime que les émissions globales (directes + indirectes) des PFCAs  $C_4$ - $C_{14}$  sont de 2610-21400 tonnes entre 1951 et 2015, et projetées d'être de 20-6420 tonnes entre 2016 et 2030. La libération des PFCAs pendant le cycle de vie des produits à base de POSF, PFOA et PFNA a le plus contribué aux émissions de PFCAs  $C_4$ - $C_{14}$  avant 2015. Mais par la suite la production et l'utilisation potentielle des produits à base de PFOA en Chine et en Russie ainsi que la dégradation des substances à base de fluorotélomères sont estimées être les émissions dominantes. Les émissions globales des homologues des PFCAs (ex : EtFOSE, sels d'ammonium APFO, 8 :2 FTOH, 6 :2 FTOH) entre 1951 et 2002 se découpent en 3 parties : (i) la majorité des PFCAs  $C_8$ ,  $C_9$ ,  $C_{11}$  et  $C_{13}$  sont émis par les produits à base de PFOA et PFNA ; (ii) plus de 50% des PFCAs  $C_5$ - $C_7$  sont libérés dans l'environnement par la dégradation des produits précurseurs à base de POSF et fluorotélomères ; et (iii) pour les PFCAs  $C_4$ ,  $C_{10}$ ,  $C_{12}$  et  $C_{14}$  la source dominante diffère suivant les scénarios (bas ou haut). Après 2002, les émissions provenant des produits à base de PFOA et de PFNA sont moins pertinentes qu'avant pour la plupart des homologues des PFCAs cependant les émissions provenant des produits à base de fluorotélomères comme les impuretés ou la dégradation de ces produits sont les sources dominantes pour beaucoup d'homologues des PFCAs (Wang et al., 2014).



**Figure 8: Diagramme schématique des émissions de PFCA quantifiées au travers du cycle de vie des produits à base de POSF, PFOA, PFNA et de fluorotélomères. (FP = fluoropolymères) (à partir de Wang et al., 2014)**

La majorité de ces émissions (>95%) a lieu dans l'environnement aquatique, tandis que les émissions ayant lieu dans l'atmosphère sont plus faibles (<5%) (Ahrens and Bundschuh, 2014; Wang et al., 2014). Les principaux contributeurs des rejets dans l'environnement aquatique sont les industries (Ahrens and Bundschuh, 2014; Wang et al., 2014) et les eaux provenant des stations d'épuration (STEP) (Ahrens and Bundschuh, 2014). Le rejet total des PFASs en provenance des STEP est compris entre 10 et 10 000 g.j<sup>-1</sup> suivant l'usage de l'eau de la commune reliée à la STEP. Cela peut être expliqué par l'inefficacité des stations à éliminer ces composés de manière générale (Ahrens and Bundschuh, 2014).

Le rejet des PFASs à longue chaîne dans l'environnement aquatique devrait continuer dans le futur, pouvant provenir de la dégradation des précurseurs, des produits encore utilisés et qui se sont déposés. Les PFASs pouvant être remobilisés à partir des sols, des sédiments et des glaces, dans la phase aqueuse (Ahrens, 2011).

## 2.2 Devenir dans l'environnement

### 2.2.1 Biodégradation

De manière générale, la dégradation des composés organiques dans l'environnement se fait par l'action des micro-organismes (biodégradation) et par des mécanismes physico-chimique (photooxydation par exemple). Les mécanismes de déhalogénéation des composés halogénés sont théoriquement des réactions thermodynamiquement favorables (J.R. Parsons et al., 2008). En condition d'aérobiose (en présence d'oxygène), les organohalogénés sont dégradés par des voies cataboliques, les enzymes catalysant ces réactions et les gènes codant pour ces enzymes ont été mis en évidence. Cependant beaucoup de ces composés organiques se retrouvent dans les sédiments de par leur hydrophobicité tandis que d'autres plus hydrophiles vont avoir tendance à être retrouvés dans les eaux souterraines. Dans ces deux milieux (sédiments et eaux souterraines) les processus de dégradation nécessitant la présence d'oxygène ne peuvent se faire. Les réactions de dégradation sont donc orchestrées par des micro-organismes utilisant des alternatives à l'oxygène en tant qu'accepteur d'électrons tels que le nitrate et le sulfate. Les réactions les plus importantes en milieu anaérobie sont des réactions de réduction conduisant à la déhalogénéation, ces réactions sont thermodynamiquement réalisables en condition anaérobie mais nécessitent plus d'énergie. Beaucoup d'informations sont disponibles sur la déhalogénéation des solvants chlorés aliphatiques mais aussi sur celle des benzènes chlorés, des phénols, des benzoates, des biphényles et des dioxines par des bactéries dans les sédiments. Malgré tout, la dégradation des chlorés est lente, voire très lente lorsqu'il y a beaucoup d'atomes de chlore. Cependant, il existe peu d'information sur la déhalogénéation des composés bromés, iodés et fluorés (J.R. Parsons et al., 2008).

Peu d'études ont été réalisées sur la dégradation des PFASs. Dans l'atmosphère les fluorotélomères alcools via les radicaux hydroxyles (OH) conduisent à la libération de PFCAs, représentant une des sources d'émissions indirecte possible de PFCAs dans les milieux polaires (Ellis 2004). Les radicaux alcools réagissent également en milieu aquatique (expérience d'irradiation avec une lumière solaire artificielle sur des échantillons d'eau du lac d'Ontario Gauthier and Mabury 2005). Un autre exemple de dégradation de surfactants (PFOS, PFOA, et des surfactants FAEO : alkylpolyglycol éther non ionique partiellement fluoré) dans des eaux usées réalisé par Schröder (2003) montre que seul les FAEO en condition d'aérobiose sont métabolisés, et en condition d'anaérobiose une élimination

efficace des surfactants anioniques PFOS et PFOA est observée. Plusieurs études ont examiné la biodégradation des fluorotélomères car ces derniers étaient soupçonnés de conduire à la formation de PFCAs. Effectivement, historiquement, le 8 :2 FTOH [ $F(CF_2)_8CH_2CH_2OH$ ] a été le produit le plus utilisé dans les années 70, rentrant dans la fabrication des produits à base de fluorotélomères alcools (Prevedouros et al., 2006). Mais récemment ce dernier a été remplacé par le 6 :2 fluorotélomère [ $F(CF_2)_6CH_2CH_2OH$ ] car le 8 :2 FTOH, qui possède deux carbones fluorés de plus que le 6 :2 FTOH, était soupçonné d'être biodégradé et de libérer des PFCAs à longue chaîne dans l'environnement (OCDE 2012). Des études ont montré que le 8 :2 FTOH se dégradait majoritairement en PFOA (Dinglasan et al., 2004; Wang et al., 2005a; Wang et al., 2005b). Tandis que, la biodégradation du 6 :2 FTOH dans les sédiments conduit à la formation de l'acide polyfluoroalkyle 5 :3, d'acide perfluoropentanoïque (PFPeA), d'acide perfluorohexanoïque (PFHxA) et d'acide perfluorobutanoïque (PFBA); les auteurs suggèrent donc que le 6 :2 FTOH conduit à la libération dans l'environnement de carboxylates per- et poly -fluorés (Zhao et al., 2013). Une autre étude compare la biodégradation du 6 :2 FTSA dans des boues de station d'épuration. Les mêmes produits de dégradation que pour le 6 :2 FTOH ont été observés mais du 5 :2 cétone et du 5 :2 FTOH ont également été retrouvés; cependant la biotransformation du 6 :2 FTOH était vraiment faible (moins de 7% de la quantité initialement ajoutée au milieu) car l'étape de désulfonation par les micro-organismes doit être limitante (Wang et al., 2011).

Sáez et al. (2008) ont étudié la biodégradation sur deux mélanges de PFASs, des carboxylates à courte et longue chaîne (PFHxA, PFOA, PFNA, PFUnA), des composés sulfonates (PFOS, PFBS), un des précurseurs du PFOS le FOSA et plusieurs fluorotélomères (6 :2 FTSA, 6 :2 FTOH et 8 :2 FTOH) sous deux conditions, en aérobiose et en anaérobiose pendant 15 semaines. Aucune diminution des concentrations n'est observée pour tous les composés testés que ce soit en aérobiose comme en anaérobiose.

L'étude de la biodégradation de ces composés nécessite donc un approfondissement du sujet, afin de mieux cibler quels sont les PFASs biodégradables, sous quelles conditions et à quelles concentrations (Sáez et al., 2008).

## 2.2.2 Transport à longue distance

Plusieurs études ont mis en évidence la présence de PFAS au niveau des pôles suggérant un transport de ces composés à longue distance. Giesy and Kannan (2001) ont

montré la présence de PFOS chez des phoques, otaries et ours polaire provenant de la Baie de Terra Nova en Antarctique, d'Alaska (USA), de l'Arctique canadien et de l'Arctique norvégien. Yamashita et al. (2005) ont également trouvé du PFOS mais surtout du PFOA dans les océans ouverts (Atlantique et Pacifique) en surface mais aussi en profondeur (1000-4400m) suggérant un rôle majeur des courants océanique dans le transport de ces composés à partir des zones côtières. Une deuxième étude montre que les acides perfluoroalkyles seraient même de bons traceurs de la circulation océanique, car ces derniers suivent le grand convoyeur qui est le courant traversant tous les océans (Yamashita et al., 2008). Une autre étude démontre la présence de fluorotélomères (6 :2 FTOH, 8 :2 FTOH et 10 :2 FTOH) et de dérivés sulfonamido perfluoroalcanes (MeFOSE et EtFOSE) dans des échantillons d'air collectés de l'Atlantique Nord jusqu'à l'archipel Canadien (Shoeib et al., 2006). La contamination en PFCA de ces régions éloignées (ex : Océan Arctique) est d'un ordre de grandeur de un à deux fois plus élevé dans la phase aqueuse que dans la phase aérienne (Ahrens and Bundschuh, 2014; Shoeib et al., 2006; Wania, 2007; Yamashita et al., 2008). Cependant le moyen de transport à longue distance de ces composés est encore en débat entre un transport via la phase aqueuse ou bien via la phase atmosphérique. La voie via la phase aqueuse est dominante pour le transport des PFASs ionisables, cependant pour les composés neutres et volatiles, ce doit être la voie aérienne (Ahrens, 2011).

### 2.2.3 Bioaccumulation

Le devenir des PFASs dans l'environnement dépend des conditions du milieu (teneur en carbone organique, température, salinité) et des propriétés physico-chimiques des molécules. Ces dernières sont principalement déterminées par la longueur de chaîne des PFASs et leurs groupements fonctionnels. Par exemple, les courtes chaînes sont surtout hydrophiles et sont généralement mobiles dans les hydrosystèmes, tandis que les composés à plus longues chaînes sont hautement hydrophobes, ils ont tendance à se lier aux particules et ont un potentiel important de bioaccumulation (Ahrens and Bundschuh, 2014). Mais contrairement à certaines molécules persistantes et bioaccumulables (ex : PCB), lipophiles, le caractère amphiphile des composés perfluorés ne permet pas la mesure du coefficient octanol-eau ( $K_{ow}$ ) en toute rigueur. Le  $K_{ow}$  rend habituellement compte du potentiel bioaccumulable des molécules lipophiles. De plus il semblerait que les PFASs aient plus d'affinités pour les tissus riches en protéines comme le sang, les muscles et le foie (Kelly et al., 2009; Luebker et

al., 2002). Toutefois Armitage et al. (2012) attirent l'attention sur le fait que la distribution des PFASs dans les tissus pourrait être fortement influencée par les phospholipides, ces derniers étant les constituants essentiels des membranes cellulaires et associés aux tissus riches en protéines.

De nombreuses études ont montré le potentiel de bioaccumulation le long des chaînes trophiques des PFASs dans divers milieux : arctique (Bossi et al., 2005; Butt et al., 2010; Kelly et al., 2009; Martin et al., 2004a; Tomy et al., 2004; Tomy et al., 2009), tropical (Loi et al., 2011), lacs (Kannan et al., 2005; Martin et al., 2004b; Xu et al., 2014), marin (Houde et al., 2006a; Nakata et al., 2006), terrestre (Müller et al., 2011). De plus la bioconcentration et la bioaccumulation des PFCAs seraient liées à la longueur de la chaîne carbonée de ces composés. Avec, pour une même longueur de chaîne, un potentiel de bioaccumulation plus élevé pour les PFASs (ex : PFOS avec 8 carbones fluorés) que pour les PFCAs (ex : PFNA avec également 8 carbones fluorés) (Conder et al., 2008; Martin et al., 2003a).

Les PFASs ont également été retrouvés dans tout type de sédiments : marins, estuariens, de rivières (Tableau 1). Les composés à longues chaînes, plus hydrophobes, vont avoir tendance à se retrouver dans le compartiment sédimentaire. Et sur la base de modélisations globales de la distribution des PFASs dans l'environnement, différentes équipes désignent les sédiments marins comme confinement ultime de ces composés (Armitage et al., 2006; Prevedouros et al., 2006). Les paramètres influençant de manière importante la sorption des composés perfluorés aux particules sédimentaires, en plus de la longueur de chaîne qui est le facteur influençant le plus cette sorption, sont également la teneur en carbone organique et la teneur en oxydes de fer des sédiments. La teneur en ion calcium ( $\text{Ca}^{2+}$ ) augmente également la sorption tandis que le pH va avoir pour effet de la diminuer (Higgins and Luthy, 2006; Higgins et al., 2007).

Dans leur étude Martin et al. (2004b) ont mesuré des concentrations importantes en PFOS et en PFCAs chez deux espèces ayant un mode de vie benthique, un invertébré *Diporeia hoyi* et un poisson, le chabot *Cottus cognatus*, ce qui a conduit les auteurs à suggérer que le sédiment est probablement une source majeure de contamination de la chaîne trophique du lac d'Ontario. Cette étude n'est pas la seule à avoir montré la présence de composés perfluorés dans des organismes à mode de vie benthique, le tableau 2 illustre les concentrations en composés perfluorés dans divers invertébrés benthiques.

Deux études ont regardé la bioaccumulation des PFASs à partir du sédiment chez un invertébré benthique, *Lumbriculus variegatus* (Higgins et al., 2007; Lasier et al., 2011). Cet oligochète est communément utilisé pour caractériser la bioaccumulation des polluants dans l'environnement (OCDE, 2008; USEPA, 2000). Ces deux études ont été conduites au laboratoire, à partir de sédiment naturel dans une étude (Lasier et al., 2011) et de sédiment naturel et dopé dans la seconde (Higgins et al., 2007). Toutes deux montrent des concentrations plus élevées dans les organismes que dans l'eau et les sédiments, cependant les tendances observées pour les facteurs de bioconcentrations (BSAF) sont opposées. En effet, Higgins et al. (2007) semblent observer une diminution des BSAFs avec l'augmentation de la longueur de chaînes des PFCA alors que Lasier et al. (2011) observent une augmentation des BSAFs en fonction de la longueur de chaînes des PFCA. Ces deux cas d'études illustrent bien le fait que la caractérisation du transfert des composés perfluorés du sédiment aux invertébrés benthiques est encore mal comprise et notamment dans le cas des composés à longues chaînes carbonées.

Tableau 1: Exemple de composés perfluorés (ng.g<sup>-1</sup> poids sec) retrouvés dans des sédiments localisés dans plusieurs pays.

Localisation	PFHxA	PFHpA	PFOA	PFNA	PFDA	PFUnA	PFDoA	PFTTrDA	PFTeDA	PFOS	FOSA	Référence
<b>Amérique</b>												
Baie de San Francisco, Californie	-	-	n.d - 0.625	n.d - < 0.12	n.d - 0.335	n.d	n.d - 0.365	-	n.d - 0.435	n.d - 3.07	-	Higgins et al., 2005
Baltimore, Maryland	-	-	0.186 - 0.390	n.d - 0.237	0.122 - 0.757	n.d - 0.396	n.d - 0.556	-	< 0.12 - 0.206	n.d - 0.846	-	Higgins et al., 2005
Corvallis, Oregon	-	-	0.184	n.d	0.144	n.d	n.d	-	n.d	0.018	-	Higgins et al., 2005
Californie	-	-	0.050 - 0.063	0.073 - 0.182	0.171 - 0.253	0.038 - 0.092	0.052 - 0.123	-	-	0.202 - 2.280	-	Higgins et al., 2007
Rivière Coosa, Alabama, Tennessee	< LD - 0.40	< LD - 0.39	0.06 - 1.97	0.03 - 0.68	0.03 - 4.66	< LD - 3.80	< LD - 4.64	0.07 - 0.99	0.05 - 1.67	< LD - 20.18	-	Lasier et al., 2011
Baie Hudson, NE Canada		<0.05	0.017 - 0.13	<0.06 - 0.14	0.01 - 0.07	0.02 - 0.12	<0.03	-	0.01 - 0.05	<0.04	< 0.01 - 0.04	Kelly et al, 2009
Port de False creek, Vancouver Canada	0.076 - 0.270	0.024 - 0.072	0.034 - 0.078	0.062 - 0.17	0.049 - 0.17	0.046 - 0.16	0.055 - 0.41	-	0.06 - 0.47	0.034 - 0.18	0.015 - 0.059	Benskin et al., 2012
<b>Australie</b>												
Port de Sydney	n.d	< LQ	0 - 0.16	<0.10 - 0.11	0 - 0.81	0.10 - 0.61	0 - 1.1	<0.10 - 0.27	n.d	0.80 - 6.2	-	Thompson et al., 2011
<b>Asie</b>												
Dalai système fluvial, Chine	-	-	<0.08 - 0.17	<0.10	n.d - 0.10	-	<0.09 - 0.14	-	n.d - <0.17	<0.12 - 0.37	-	Bao et al., 2009
Rivière Zhujiang, Guangzhou, Chine	-	-	0.09 - 0.29	-	n.d - 0.11	-	n.d - 0.10	-	-	n.d - 1.0	-	Bao et al., 2010
Rivière Huangpu, Shanghai, Chine	-	-	0.20 - 0.64	-	n.d - <0.09	-	n.d - 0.10	-	-	n.d - 0.46	-	Bao et al., 2010
Mer d'Ariake, Japon	-	-	0.84 - 1.1	<1.5	-	-	-	-	-	0.09 - 0.14	<1.5	Nakata et al., 2006
Baie de Tokyo, Japon	-	< LQ - 0.08	0.12 - 0.45	0.19 - 0.50	0.03 - 0.15	0.05 - 0.55	< LQ - 0.29	< LQ - 1.19	-	0.45 - 1.79	-	Zushi et al., 2010
<b>Europe</b>												
Rivière Orge (proche de Paris), France	0.06	0.03	<0.07	0.05	0.3	0.29	1.7	0.3	0.86	4.3	-	Labadie and Chevreuil, 2011
Parc naturel de L'Albufera, Valencia, Espagne	<0.02 - 0.10	<0.02 - 0.95	0.03 - 10.9	n.d - 1.24	n.d - 1.25	-	-	-	-	0.10 - 4.80	-	Pico et al., 2012
Lac Constance, Lac alpin, Autriche	0.27 - 1.7	0.39 - 1.3	<0.13 - 0.82	n.d - 0.53	n.d - 0.36	n.d - 0.80	n.d - 0.37	-	-	n.d - <0.94	n.d	Clara et al., 2009

**Tableau 1 (suite)**

Localisation	PFHxA	PFHpA	PFOA	PFNA	PFDA	PFUnA	PFDoA	PFTTrDA	PFTeDA	PFOS	FOSA	Reference
Berge du Danube de Aschach jusqu'à Wildungsmauer, Autriche	0.19 - 4.6	0.09 - 5.1	0.65 - 2.8	n.d - 0.69	n.d - 0.61	n.d - 0.84	n.d - 0.45	-	-	n.d - 0.91	n.d - <0.15	Clara et al., 2009
Mer du Nord	<0.03 - 0.087	<0.03 - 0.171	0.079 - 1.575	<0.03 - 0.289	<0.03 - 0.294	-	-	-	-	0.038 - 2.425	<0.005 - 0.110	Theobald et al, 2012
Mer Baltique	<0.03 - 0.049	<0.03 - 0.102	0.061 - 0.684	0.037 - 0.232	0.038 - 0.129	-	-	-	-	0.025 - 0.666	0.005 - 0.015	Theobald et al, 2012

Tableau 2 : Données de concentration en PFASs dans divers invertébrés benthiques (ng.g<sup>-1</sup> poids frais).

Espèces	nombre d'échantillons	Localisation	Année d'échantillonnage	Tissus	PFOS	PFOA	PFNA	PFDA	PFUnA	PFDaA	Références
Amphipode	3	Grands Lacs, USA	1999	corps entier	<2-2,9	<5					Kannan 2005
<i>Diporeia hoyi</i>		Lac Ontario Canada	2001	corps entier	280 ± 33	90 ± 8,5	57 ± 4,4	32 ± 1,1	41 ± 2,9	14 ± 1,5	Martin 2004
Palourde ( <i>Mya truncata</i> ; <i>Serripes groenlandica</i> )	5	E. Artique	2002	corps entier	0,3 ± 0,09	nd					Tomy 2004
<i>Asteria rubens</i>		W. Scheldt-Mer du Nord	2001	tissus mous	9-176						Van de Vijver 2003
Palourde	6	Mer Ariake, Japon	2003	tissus mous	<0,3	7.5	<1,5				Nakata et al., 2006
Arénicole	5	Mer Ariake, Japon	2003	corps entier	0.41	82	<1,5				
Mactre	7	Corée	2008	tissus mous	4.5	nd	nd	0.8	2.24	nd	Naile et al., 2010
Palourde ( <i>Venus</i> )	250	Mer Méditerranée	2009	corps entier	<2	15					Nania et al., 2009
<i>Hydropsyche exocellata</i>	18	Catalogne, NE de l'Espagne	2006-2009	corps entier	20-144	1,3-4,3	0,6-7,5				Fernandez-Sanjuan et al., 2010
Sawtooth pen clam ( <i>Atrina serrata</i> )	2	Georgie, USA	2006-2007	tissus mous	33	11	16		2	0.4	Senthil Kumar et al., 2009
Crabe bleu	12	Shihwa Lac, Korea	2006	tissus mous	4.6 - 11	0.3 - 0.8	<LQ - 0.6	0.6 - 0.9	1.4 - 2.6	1.3 - 2.0	Yoo et al., 2009
Moule		Shihwa Lac, Korea	2006	tissus mous	0.6	nd	nd	nd	nd	nd	Yoo et al., 2009
Huitre		Shihwa Lac, Korea	2006	tissus mous	1.1	0.3	nd	nd	nd	nd	Yoo et al., 2009
<i>Themisto libellula</i>	2	Est de la mer de Beaufort	2005	corps entier	2.12 - 3.19	1.44 - 2.50	0.67 - 3.49	0.2 - 3.83	0.05 - 0.23	0.08	Tomy et al., 2009
<i>Calanus hyperboreus</i>	5	Est de la mer de Beaufort	2004	corps entier	0.06 - 1.51	0.59 - 9.9	0.67	0.2 - 1.57	0.05 - 0.95	0.08	Tomy et al., 2009
Crevette ( <i>Penaeus monodon</i> )	2	Réserve naturelle des marais, Hong Kong	2008-2010		1.35 - 1.46			0.35-0.37	0.46-0.50	0.47-0.51	Loi et al., 2011
Crevette ( <i>Metapenaeus ensis</i> )	3	Réserve naturelle des marais, Hong Kong	2008-2010		1.58-1.98			0.20-0.42	0.31-0.56	0.32-0.56	Loi et al., 2011
Ver (Capitellidae)	3	Réserve naturelle des marais, Hong Kong	2008-2010		0.82-12.6			<0.03-0.29	<0.03-0.34	0.20-0.60	Loi et al., 2011
Ver (Nereidae)	3	Réserve naturelle des marais, Hong Kong	2008-2010		0.26-0.67	<0.03-0.35		<0.03-0.13	0.03-0.13	<0.18-0.05	Loi et al., 2011
Ver (Sabellidae)	2	Réserve naturelle des marais, Hong Kong	2008-2010		0.71-3.94	0.31-0.37	<0.24	<0.24	<0.24		Loi et al., 2011
Gastéropode	3	Réserve naturelle des marais, Hong Kong	2008-2010		0.11-1.54				<0.18		Loi et al., 2011

Tableau 2 (suite)

Espèces	nombre d'échantillons	Localisation	Année d'échantillonnage	Tissus	PFTTrDA	PFTeDA	PFPA	PFHxS	FOSA	PFDS	N-EtFOSAA	Références
Amphipode	3	Grands Lacs, USA	1999	corps entier				<1	<2			Kannan 2005
<i>Diporeia hoyi</i>		Lac Ontario Canada	2001	corps entier	15 ± 0,8	7,3 ± 0,6	1,9 ± 1,4					Martin 2004
Palourde ( <i>Mya truncata</i> ; <i>Serripes groenlandica</i> )	5	E. Artique	2002	corps entier					nd			Tomy 2004
<i>Asteria rubens</i>		W. Scheldt-Mer du Nord	2001	tissus mous								Van de Vijver 2003
Palourde	6	Mer Ariake, Japon	2003	tissus mous				<1,5	<1,5			Nakata et al., 2006
Arénicole	5	Mer Ariake, Japon	2003	corps entier				<1,5	<1,5			
Mactre	7	Corée	2008	tissus mous						0.14		Naile et al., 2010
Palourde ( <i>Venus</i> )	250	Mer Méditerranée	2009	corps entier								Nania et al., 2009
<i>Hydropsyche exocellata</i>	18	Catalogne, NE de l'Espagne	2006-2009	corps entier				0,2-0,8				Fernandez-Sanjuan et al., 2010
Sawtooth pen clam ( <i>Atrina serrata</i> )	2	Georgie, USA	2006-2007	tissus mous				1.7		0.7		Senthil Kumar et al., 2009
Crabe bleu	12	Shihwa Lac, Korea	2006	tissus mous				nd				Yoo et al., 2009
Moule		Shihwa Lac, Korea	2006	tissus mous				nd				Yoo et al., 2009
Huitre		Shihwa Lac, Korea	2006	tissus mous				nd				Yoo et al., 2009
<i>Themisto libellula</i>	2	Est de la mer de Beaufort	2005	corps entier					0.1 - 0.64			Tomy et al., 2009
<i>Calanus hyperboreus</i>	5	Est de la mer de Beaufort	2004	corps entier					0.33 - 0.75			Tomy et al., 2009
Crevette ( <i>Penaeus monodon</i> )	2	Réserve naturelle des marais, Hong Kong	2008-2010			0.77-0.84						Loi et al., 2011
Crevette ( <i>Metapenaeus ensis</i> )	3	Réserve naturelle des marais, Hong Kong	2008-2010			0.58-1.03					<0.05-0.38	Loi et al., 2011
Ver ( <i>Capitellidae</i> )	3	Réserve naturelle des marais, Hong Kong	2008-2010			0.22-0.79					0.30-0.79	Loi et al., 2011
Ver ( <i>Nereidae</i> )	3	Réserve naturelle des marais, Hong Kong	2008-2010			<0.04-0.07					<0.03-0.22	Loi et al., 2011

Tableau 2 (suite bis)

Espèces	nombre d'échantillons	Localisation	Année d'échantillonnage	Tissus	PFTrDA	PFTeDA	PFPA	PFHxS	FOSA	PFDS	N-EtFOSAA	Références
Ver (Sabellidae)	2	Réserve naturelle des marais, Hong Kong	2008-2010			<0.05-0.09					0.38-0.39	Loi et al., 2011
Gastéropode	3	Réserve naturelle des marais, Hong Kong	2008-2010			0.14-0.28						Loi et al., 2011

### 3.3 Toxicité

A partir de 1975-1978, plusieurs études portant sur le dosage des PFASs dans le sang humain ont révélé la présence de ces composés à des concentrations de l'ordre de plusieurs  $\text{ng.mL}^{-1}$  (Houde et al., 2006b; Kannan et al., 2004; Lindstrom et al., 2011; Yeung et al., 2006). A l'heure actuelle, la plupart des études portant sur la toxicité de ces composés est essentiellement centré sur celles du PFOS et du PFOA pour l'homme (Lau et al., 2007). Peu d'études portent sur l'impact toxique de ces molécules sur les écosystèmes.

Des études sur la toxicité du PFOS chez les rats et les singes ont montré une diminution du poids du corps, une augmentation du poids du foie et une forte pente de la courbe dose-réponse pour la mortalité (Goldenthal, 1978a; Goldenthal, 1978b; Seacat et al., 2003). Chez les rongeurs, le PFOA a été associé à l'augmentation de la fréquence de tumeurs du foie, du pancréas et des testicules ainsi qu'une perte de poids des organismes, un élargissement du foie et un changement dans le métabolisme des lipides (Biegel et al., 2001; Cook et al., 1992; Sibinski et al., 1987). De plus lorsque le PFOS ou le PFOA est administré à une souris gestante, une mortalité des nouveau-nés et une diminution de la croissance est observé pour les survivants (Lau et al., 2007). Cependant l'utilisation des organismes de laboratoire pour essayer d'estimer le potentiel toxique de ces composés sur la santé humaine est difficile et d'autant plus avec ces composés car leurs toxico-cinétiques diffèrent beaucoup entre les espèces (Lau et al., 2007).

L'étude de la toxicité du PFOS et du PFOA chez des micro-crustacés, *Daphnia magna* et *Moina macrocopa* montre une  $\text{CE}_{50}$  à court terme pour le PFOA 10 fois plus élevée que pour le PFOS (Ji et al., 2008), la même chose est observée pour des NOEC reproduction 21 ou 7 jours selon l'espèce considérée. Ces deux composés provoquent également une diminution de la survie et de l'indice gonado-somatique chez le medaka (*Oryzias latipes*) ainsi que le développement embryonnaire, la viabilité et le temps nécessaire à l'éclosion (Ji et al., 2008). Les effets sur les crustacés ont fait l'objet de quelques rares publications : effets à court terme de 7 acides poly- et perfluoro-carboxyliques ou alcools sur 2 cladocères, *Daphnia magna* et *Chydorus sphaericus* (Ding et al., 2012), à des concentrations très au-dessus des concentrations environnementales ; effets aigus sur *D. magna*, ainsi que sur des larves d'insecte *Chironomus tentans*, et le végétal *Lemna gibba*, d'une gamme de précurseurs et fluorotélomères (Phillips et al., 2007) ; effets à long terme des mêmes composés sur *D. magna*

(Phillips et al., 2010). Les connaissances de la toxicité des PFASs vis-à-vis des organismes aquatiques restent encore limitées, portant essentiellement sur l'étude du PFOS et du PFOA qui à l'heure actuelle, ne sont plus utilisés dans l'industrie et les produits domestiques en Europe et en Amérique du Nord.

### 3.4 Risques environnementaux

L'état des connaissances actuelles sur les PFASs nous démontre un caractère persistant dans les milieux, une distribution globale ainsi qu'un caractère bioaccumulable le long de la chaîne trophique. Cependant le risque lié à ces composés pour l'environnement reste encore mal défini. En effet, l'une des premières tentatives de dériver une concentration probablement sans effet (PNEC) pour le PFOS dans les milieux aquatiques (Qi et al., 2011) a fait appel à des tests conventionnels, et des prédictions à l'aide de modèles de relation structure-activité (QSAR) pour les données manquantes ; ces auteurs concluent que la PNEC du PFOS est comprise entre 0.61 et 6.6  $\mu\text{g.L}^{-1}$ . Une étude similaire a porté sur 8 PFASs et 4 organismes (algue unicellulaire *Pseudokirchneriella subcapitata*, crustacé *Daphnia magna*, et poissons *Onchorynchus mykiss* et *Pimephales promelas*), chez lesquels seuls les effets à court terme ont été étudiés (Hoke et al., 2012). Les PNEC dérivées à partir de ces données valent de 11 à 100  $\mu\text{g.L}^{-1}$ , la plus basse étant celle de l'acide perfluorodécanoïque (PFDA). Ces PNEC sont dans l'ensemble supérieures aux concentrations relevées dans l'environnement aquatique. Cela est donc très largement insuffisant pour qualifier le risque que posent ces composés aux écosystèmes aquatiques. De plus, le PFOS est la seule molécule ayant une valeur de Norme de la Qualité Environnementale (NQE-MA, moyenne annuelle) dans l'eau et le biote bien définie dans la Directive Cadre sur l'Eau (DCE) (NQE-MA eau de surface intérieure =  $6.5 \times 10^{-4} \mu\text{g.L}^{-1}$  ; NQE-MA autres eaux de surface =  $1.3 \times 10^{-4} \mu\text{g.L}^{-1}$  ; NQE biote =  $9.1 \mu\text{g.kg}^{-1}$  de poids humide) (DCE, 2013).

### 3.5 A retenir

Ce qui est important à retenir dans cette deuxième partie est :

- les PFASs sont présents dans tous les milieux et ont une capacité de diffusion à grande échelle ;
- seuls les composés contenant des atomes d'hydrogène sur leur chaîne carbonée sont biodégradés, notamment les fluorotélomères biodégradés en PFCA ;

- les PFASs ont un potentiel de bioaccumulation lié à la longueur de la chaîne carbonée des composés et plusieurs études ont montré leur bioaccumulation le long de la chaîne trophique ;

- les affinités de ces molécules se porteraient plus pour les tissus riches en protéines et leur caractéristique amphiphile rend la mesure du  $K_{ow}$  non réalisable en toute rigueur ;

- les sédiments ont été désignés comme source majeure de la contamination par certains auteurs ;

- il existe encore des lacunes dans la compréhension des voies de transferts des PFASs et des facteurs qui les contrôlent.

### 3 L'écosystème sédimentaire

#### 3.1 Structure et composition des sédiments

Les sédiments constituent une matrice complexe, hétérogène et de composition très variable suivant l'origine des apports du milieu. En effet, la nature des sédiments est étroitement liée au fond géochimique local et à la nature du bassin versant. Les apports peuvent être d'origine « naturelle » d'une part allochtone lorsque la matière organique et les nutriments sont apportés par les bassins versants, et d'autre part autochtone lorsqu'il s'agit de la matière organique provenant de la production algale (producteurs primaire). D'autres apports d'origine anthropique se retrouvent aussi dans les sédiments comme du carbone, de l'azote, du phosphore, mais aussi des polluants inorganiques et organiques (Montuelle, 2003; Ramade, 1998). La complexité du sédiment se traduit par une variabilité dans la granulométrie, la teneur en matière organique (MO), la teneur en carbonate ( $CO_3^{2-}$ ), la teneur en sulfate ( $SO_4^{2-}$ ), la teneur en oxygène ( $O_2$ ), les potentiels d'oxydo-réduction (accepteur d'électrons Eh) et le pH.

Trois principales fractions constituent les sédiments :

- **l'eau interstitielle**, qui occupe le plus grand volume, elle remplit les espaces entre les particules et représente environ 50% du volume des sédiments de surface (Förstner, 1987) ;

- **la phase inorganique**, comprenant des fragments de coquilles, de roche, de minéraux sous la forme de grains, qui résultent de l'érosion naturelle des matériaux terrestres. On va retrouver des minéraux argileux, des carbonates, du quartz et des feldspaths. Ces composés sont habituellement recouverts de manganèse, d'oxyde de fer et de substances organiques (Förstner, 1987);

- **la phase organique**, qui occupe un faible volume mais qui représente une part importante des sédiments, car elle joue le rôle de source trophique pour tous les microorganismes (boucle microbienne) et les invertébrés mais aussi car cette phase va réguler la sorption et la biodisponibilité de nombreux contaminants. La matière organique est classée suivant sa taille, en carbone organique particulaire (COP > 0.22 µm), colloïdale (COC < 1kDa) et dissous (COD < 1kDa). Elle est constituée d'une centaine de composés comme des protéines, des polysaccharides, des lipides, des acides humiques et fulviques. Une des plus grandes propriétés de la matière organique est l'existence de pôles hydrophiles et de pôles hydrophobes conférant un caractère amphiphile à cette matière, ce qui affecte fortement les comportements de sorption et de complexation des molécules traces chargées, des molécules non chargées et des molécules inorganiques comme par exemple les métaux et les composés organiques hydrophobes (Santschi et al., 1999). La matière organique évolue au cours du temps (humification), ses propriétés de sorption également, et par voie de conséquence la mobilité des composés sorbés.

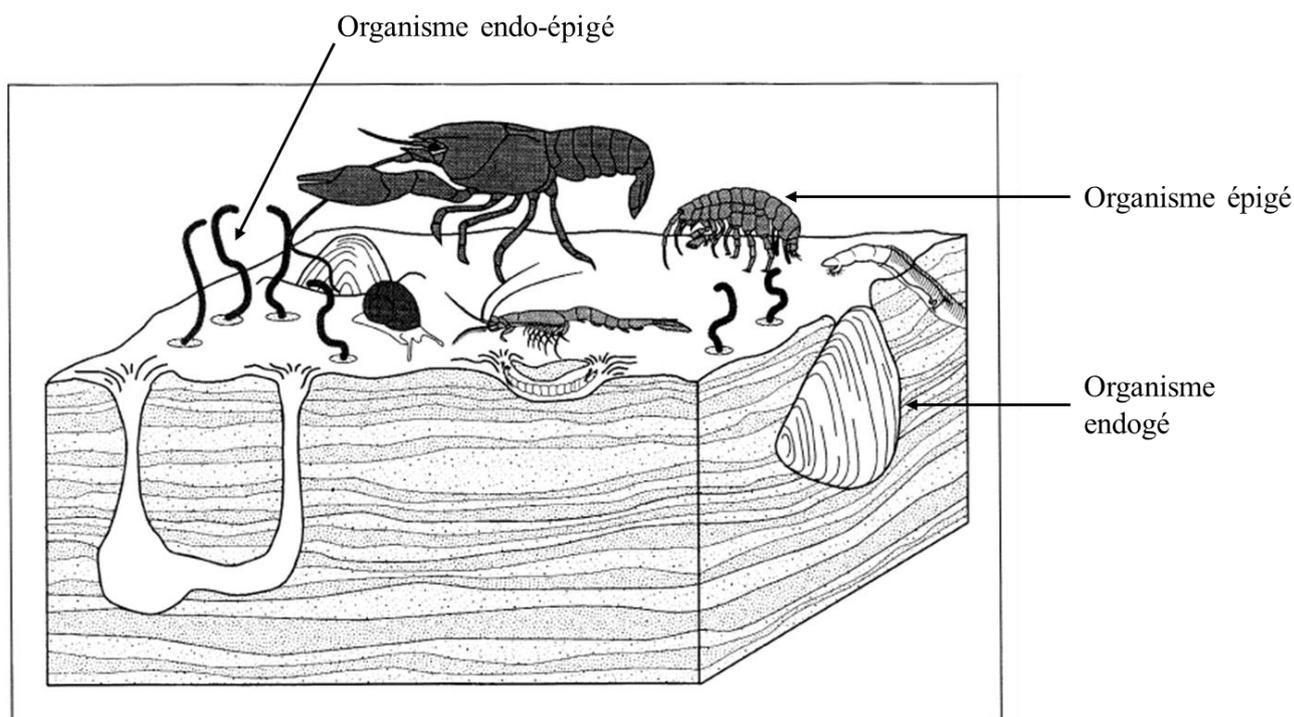
Les mouvements de différentes phases organiques, inorganique et de l'eau interstitielle, à l'intérieur et à l'extérieur des sédiments, sont contrôlés par des processus chimique, biologique et physique. La porosité (l'espace entre les particules) et la perméabilité (la capacité de l'eau à bouger entre, à l'intérieur et à l'extérieur des espaces) des sédiments font partie des paramètres physiques pouvant influencer ces flux. La granulométrie des sédiments (la structure) joue un rôle dans cette capacité de perméabilité des sédiments, par exemple, les graviers et les sables sont plus perméable que les vases (Chapman, 1981).

La granulométrie des sédiments (texture) va classer les particules sédimentaires par taille et par fractions minérales: les argiles pour les tailles inférieures à 2 µm, les limons de 2 à 50 µm et les sables de 50 µm à 2 mm (Shepard, 1954). En fonction de la proportion de chaque fraction les sédiments vont appartenir à un type particulier. Les sédiments sont également structurés par leur stratification verticale, qui va être déterminés par la teneur en

oxygène et qui va conditionner la dégradation de la matière organique et les échanges électroniques (zonation géochimique et consommation des oxydants).

### **3.2 La biocénose associée aux sédiments**

En milieu dulçaquicole, les sédiments renferment une grande biodiversité, environ 175 000 espèces sont associées à ces sédiments (plus de 100 000 espèces d'invertébrés, 10 000 espèces d'algues et plus de 20 000 espèces de protozoaires et de bactéries) (Palmer, 1997; Palmer et al., 2000). Le benthos désigne les organismes se développant en rapport avec le fond soit directement en contact avec le sédiment comme le chironome (organismes endogés et endo-épigés) soit à son voisinage immédiat, c'est à dire ayant un contact ponctuel avec ce dernier comme le gammare (organismes épigés). Ces organismes constituent un ensemble complexe et dynamique (Figure 9). Tous ces organismes sont essentiels au maintien de l'équilibre et au fonctionnement des écosystèmes aquatiques de par leurs rôles dans la dégradation de la matière organique et dans le recyclage des nutriments. Le benthos va transformer les détritiques organiques du sédiment en nutriments sous forme dissoute, ces derniers vont ensuite être mélangés via l'eau de surface et utilisés par les racines des plantes et par le phytoplancton afin d'augmenter la production primaire (Covich et al., 1999). Les sédiments abritent notamment le premier maillon de la chaîne trophique, la boucle microbienne (microbial loop), qui est constituée d'un ensemble de micro-organismes aérobies (bactéries, micro-algues, champignons) et anaérobies (bactéries, protozoaires) nécessaires au maintien des cycles biogéochimiques (azote, carbone et soufre) par le recyclage de la matière organique.



**Figure 9 : Description du benthos présent dans les sédiments d'eau douce. Les macro-invertébrés creusant dans les couches profondes du sédiment accélèrent le cycle des nutriments.**

Les bivalves fouisseurs, les écrevisses, les vers tubificidés et les larves d'insectes mélangent les sédiments, aèrent les couches profondes et augmentent les taux de recyclage des macronutriments (azote, phosphore, et carbone organique) et des micronutriments (éléments traces) par la bioturbation et par la production de fèces. Les amphipodes et les gastéropodes améliorent la croissance des microorganismes et le cycle des nutriments à travers le mélange du sédiment de surface et la dégradation des débris organiques (adapté de Covich et al., 1999).

Le macro-benthos de par son rôle bioturbateur<sup>3</sup> va avoir plusieurs impacts sur le sédiment :

- un impact physique par la modification de la distribution des particules, de la granulométrie, de la porosité ;
- un impact chimique par la modification de la distribution des accepteurs d'électrons, du potentiel d'oxydo-réduction et du pH ;
- et un impact biologique des sédiments par la mise en place d'hot-spots microbien (densité, structure et activités bactérienne) (Figure 10).

<sup>3</sup>Bioturbation : elle correspond à tout type de déplacements au sein de sédiments non consolidés (ou de sols) résultant de l'activité des organismes.

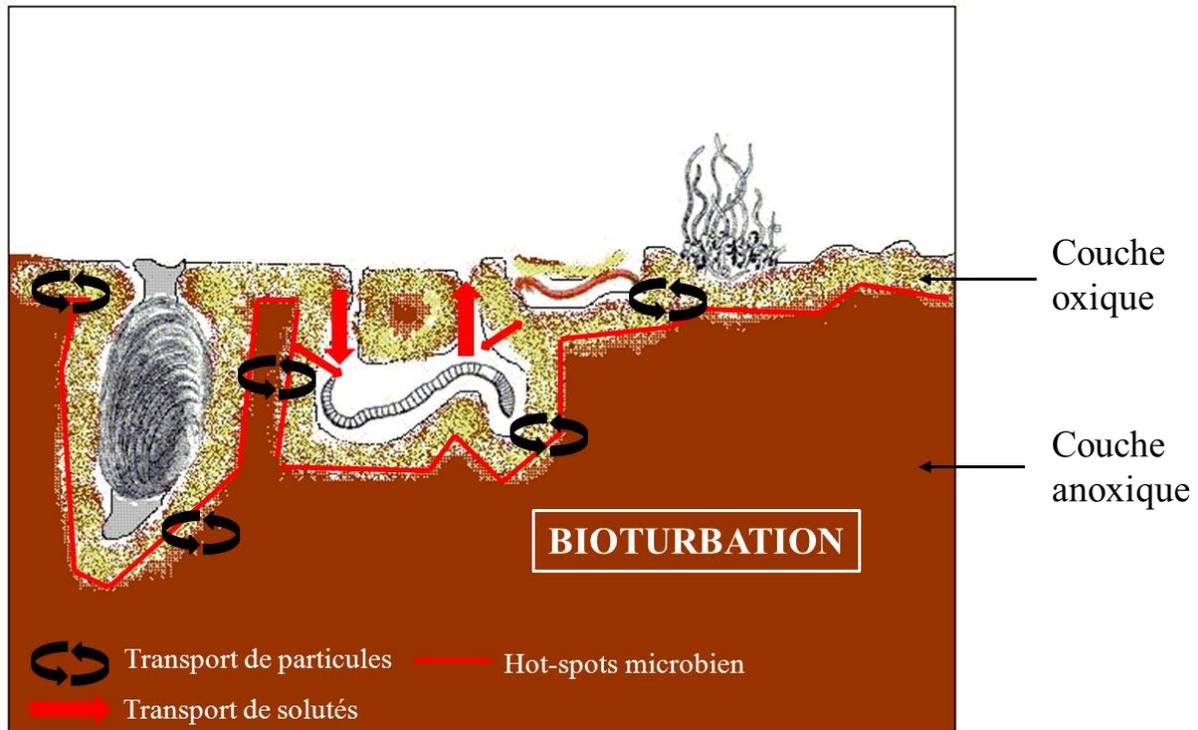


Figure 10 : Schéma illustrant la bioturbation dans les sédiments.

Les sédiments ont une grande importance écologique à la fois pour leur grande biodiversité, le bon fonctionnement du recyclage et de la recirculation des nutriments (dans le sédiment, à l'interface eau/sédiment et dans l'eau de surface), mais aussi pour leur rôle d'habitat des premiers maillons de la chaîne trophique (Palmer et al., 2000).

### 3.3 Implications des sédiments dans le transfert des contaminants aux organismes

Les sédiments ont un rôle de puits mais aussi de source pour tous les composés organiques et inorganiques s'adsorbant aux particules, colloïdaux ou bien hydrophobe de par leurs mises en suspension (Mac and Schmitt, 1992; Montuelle, 2003). Ces contaminants sont apportés aux sédiments via diverses sources (rejet de station d'épuration, évacuation dans les océans et dans les lacs, les sources diffuses, les déversements de contaminants, la déposition atmosphérique) (Figure 11). Cependant la biodisponibilité des contaminants contrôle le rôle clé des sédiments dans le transfert de ces derniers. D'une manière générale, la biodisponibilité des contaminants désigne leur capacité à interagir avec les organismes vivants et à exercer leur action xénobiotique<sup>4</sup> voire à s'accumuler dans les organismes pour les substances sujettes à la bioaccumulation/ bioamplification<sup>5</sup>. Dans le cas des sédiments, les voies d'entrées dans des contaminants dans les organismes vont être via leur adsorption aux particules

sédimentaires et/ou via leur présence dans l'eau interstitielle pouvant ainsi interagir avec les organismes en fonction de leur physiologie, de leur mode de vie (voie trophique, respiration, voie tégumentaire).

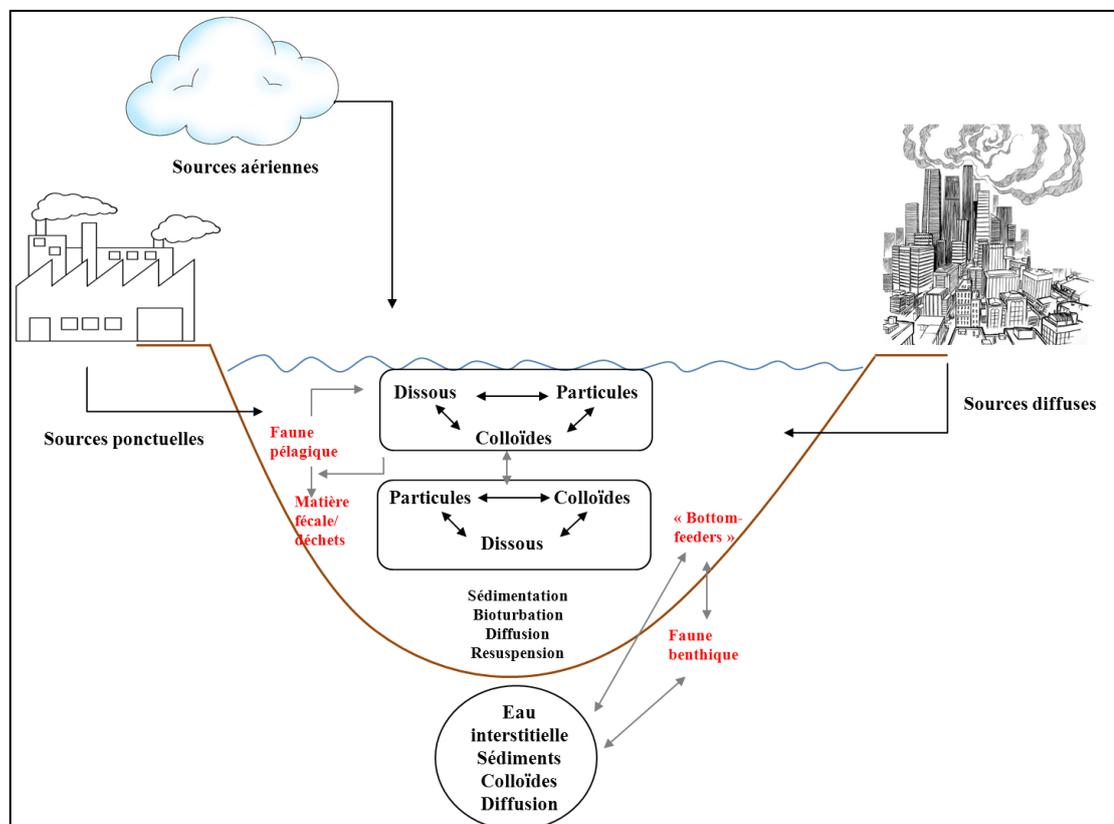


Figure 11: Schéma du devenir d'un contaminant dans un environnement aquatique, avec les potentielles sources, voies d'expositions (d'après Power and Chapman, 1992).

La bioaccumulation des composés à partir du sédiment soulève deux principales questions : (i) quels sont les contaminants biodisponibles dans les sédiments pour les organismes ? Et (ii) à quelles concentrations ces contaminants peuvent être accumulés par les organismes aux différents niveaux de la chaîne trophique ? Ces questions sont importantes pour les composés chimiques persistants comme les polychlorobiphényles (PCB) par exemple (Mac and Schmitt, 1992).

<sup>4</sup>Xénobiotique : ce terme désigne une substance fabriquée par l'homme qui n'existe pas naturellement dans l'environnement. Il désigne également une substance qui possède des propriétés toxiques, même à très faible concentration (Recyconsult, 2010).

<sup>5</sup>Bioamplification : ces termes désignent l'augmentation cumulative des concentrations d'une substance persistante à mesure que l'on progresse dans la chaîne trophique (Recyconsult, 2010).

### 3.4 A retenir

Ce qui est important de souligner dans cette partie :

- les sédiments ont une grande importance écologique de par leur richesse en terme d'organismes et leur rôle dans le recyclage et la recirculation des nutriments ;
- ils représentent un puits et une source de contamination des polluants inorganiques et des polluants organiques persistants comme les PFASs.

## 4 Le chironome et le gammare, modèles d'invertébrés benthiques

### 4.1 Le chironome : *Chironomus riparius* (Meigen 1804)

De par leur large distribution les chironomes, adultes et larves, ont, historiquement, été utilisés en tant que source de nourriture pour la population près des lacs d'Afrique centrale et d'Afrique de l'Est. Plus récemment avec le développement des élevages de poissons, ces larves de chironomes ont également été, et le sont toujours, largement utilisées, en tant que nourriture pour les poissons (Armitage et al., 1995).

#### 4.1.1 Répartition géographique et importance écologique

Cet organisme fait partie de l'Ordre des Diptères, de la famille des Chironomidae, de la sous-famille des Chironominae et de la tribu des Chiromini (Tachet et al., 2010). Le chironome est un « moustique non-piqueur », il s'agit d'un organisme holarctique, ayant une aire de répartition vaste, c'est à dire qui est présent dans les régions arctiques et dans les zones tempérées de l'hémisphère Nord. *C. riparius* a été observé au Canada et aux États-Unis, il est également largement présent en Europe, notamment en Autriche, en Belgique, en France, en Grande-Bretagne, en Allemagne, en Italie et en Scandinavie (Credland, 1973; Curry, 1962; Rasmussen, 1984; Townes, 1945). Les larves tubicoles du chironome sont présentes dans les lacs, les étang, les rivières (Rasmussen, 1984) et se nourrissent de la matière organique présente dans les sédiments (limivore).

*C. riparius* résiste bien à l'eutrophisation et est donc un bon indicateur de pollution organique (Gower and Buckland, 1978; Townes, 1945). Le chironome peut tolérer des environnements extrêmes avec des gammes de température et de pH larges et de très faible niveau en oxygène dissous dans le milieu (Armitage et al., 1995). Cet organisme est d'une grande importance

écologique puisque qu'il représente une source de nourriture importante pour les poissons et pour les oiseaux.

#### 4.1.2 Cycle de vie et biologie du chironome

Cet organisme à un cycle de vie cours (21 jours) qui se divise en quatre étapes : œuf, larve planctonique et benthique, nymphe et adulte aérien appelé imago. L'imago femelle pond une masse gélatineuse, comprenant environ 150 œufs (pour *C. riparius* Ingersoll and Nelson, 1990), à la surface de l'eau, cette masse éclot et donne naissance au premier stade larvaire planctonique du chironome (le stade L1), ensuite la larve va s'enfouir dans le sédiment et construire un fourreau (premier stade larvaire benthique L2). Cette dernière va grandir dans le sédiment jusqu'à la fin du stade 4 (L4) qui correspond au dernier stade larvaire benthique. Puis la larve de chironome passe en phase nymphale aquatique afin de se métamorphoser en imago, l'adulte aérien (Figure 12).

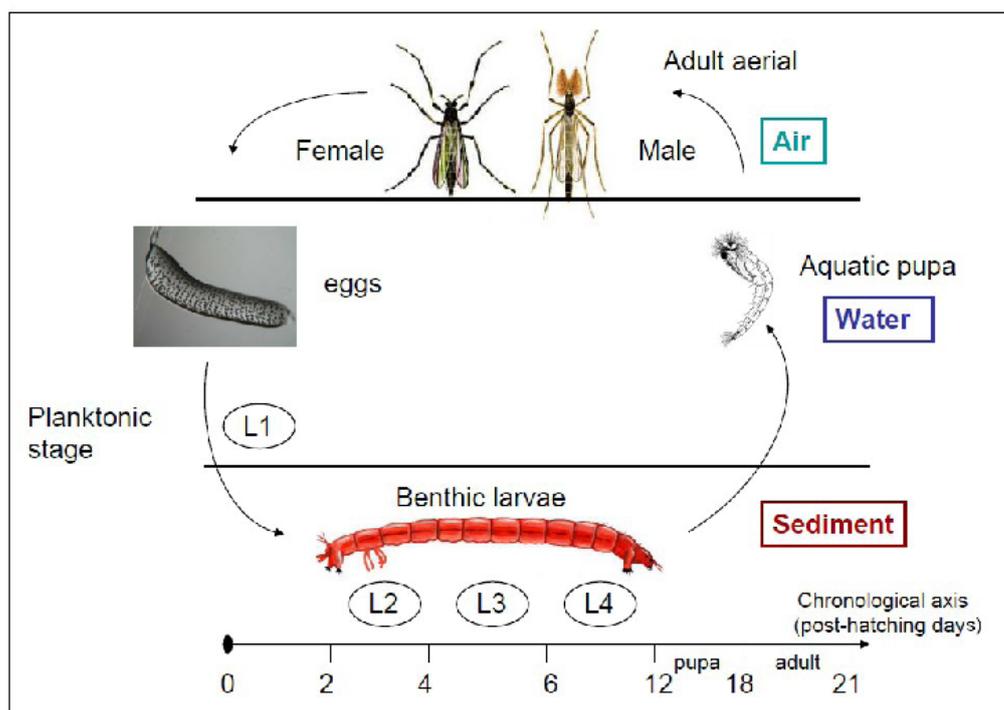


Figure 12 : Cycle de vie du chironome.

Parmi les insectes aquatiques, le chironome est le seul ayant une phase larvaire possédant de l'hémoglobine (couleur rouge des chironomes), cette dernière contrairement à

celle des vertébrés à une très haute affinité pour l'oxygène, donnant la possibilité à cet organisme de supporter de très faible niveau en oxygène dissous dans l'eau. En effet la larve de chironome peut saturer son hémoglobine en ondulant son corps à l'intérieur de son fourreau pour permettre au flux d'eau de s'oxygéner. L'oxygène est alors déchargé lorsque la larve stoppe les ondulations de son corps. Les pigments de respiration conduisent à une libération plus rapide de l'oxygène que celui disponible par simple diffusion (Armitage et al., 1995). La respiration du chironome se fait par le tégument et par les branchies ventrales situées sur le 8<sup>ème</sup> segment. Son système digestif, lui, se découpe en 4 parties, l'« esophagus » correspond à l'œsophage, l'« anterior mesenteron » environ à l'estomac, le « posterior mesenteron » au tube digestif, le « malpighian tubule » environ aux reins où l'excrétion de l'urine a lieu et le « proctodeum » à l'anus (Craig et al., 1998) (Figure 13).

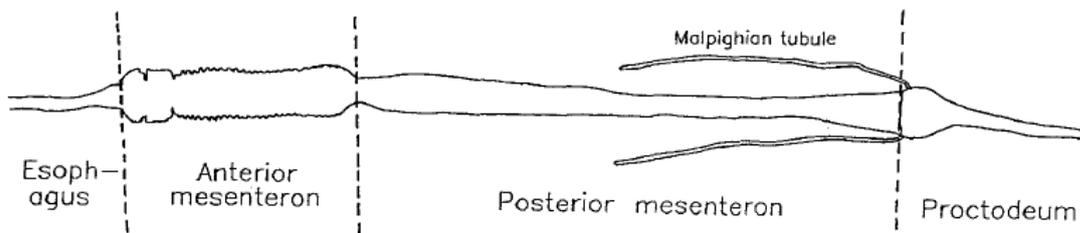


Figure 13: Structure du système digestif du Chironome (Craig et al., 1998)

Tandis que les papilles annales permettent les échanges avec le milieu (Figure 14b). La taille de la capsule céphalique rend directement compte du stade auquel se situe l'organisme, en effet le passage d'un stade à l'autre se fait par mue successive. Il existe une relation linéaire de la croissance du chironome entre la taille et le temps (et hyperbolique entre le poids et le temps), c'est au niveau du 4<sup>ème</sup> stade que l'on va remarquer une différenciation entre les mâles et les femelles, les grandes larves correspondant aux femelles et les plus petites aux mâles (Ineichen et al., 1979; Péry et al., 2002) (Figure 15). Il est également possible de distinguer le mâle de la femelle au stade adulte, le mâle ayant de grandes antennes plumeuses (Figure 14d).

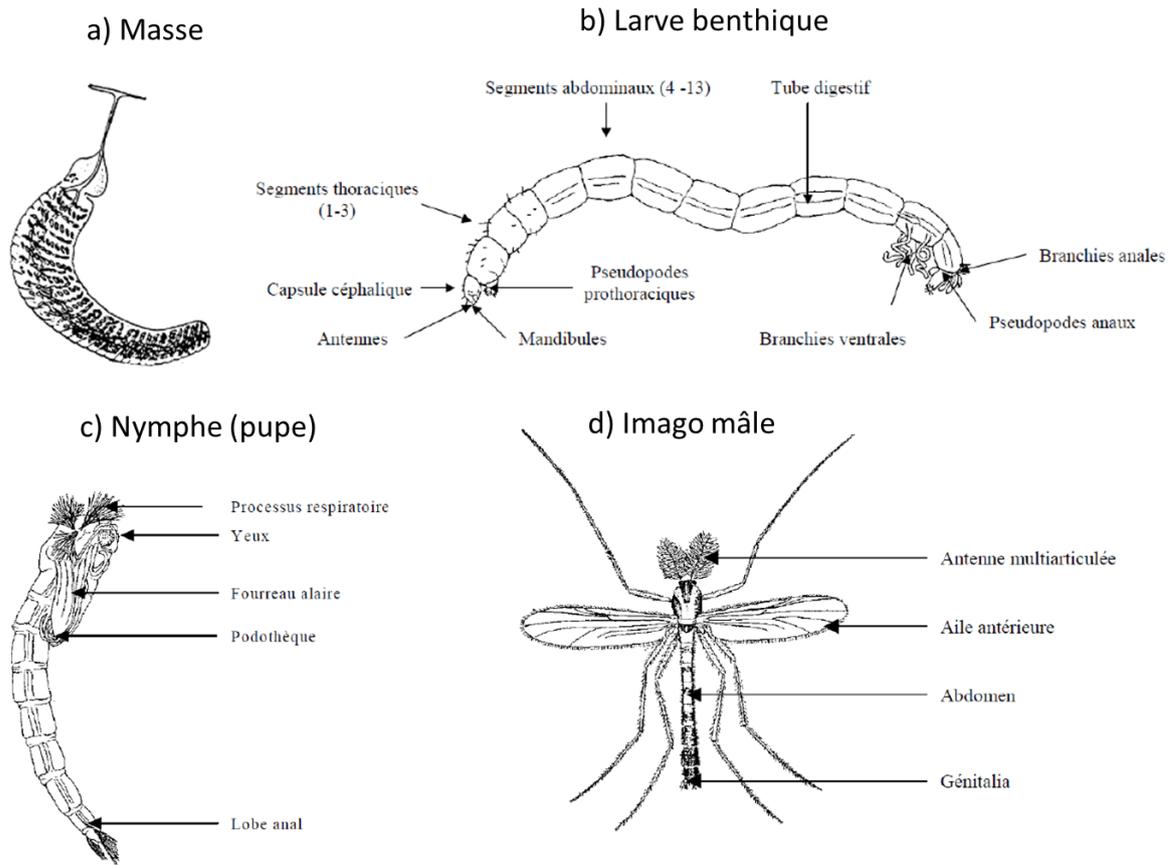


Figure 14: Description des différents stades de développement du chironome: *C. riparius* (Meigen 1804), (AFNOR, 2010; Durand, 2012; Tachet et al., 2000)

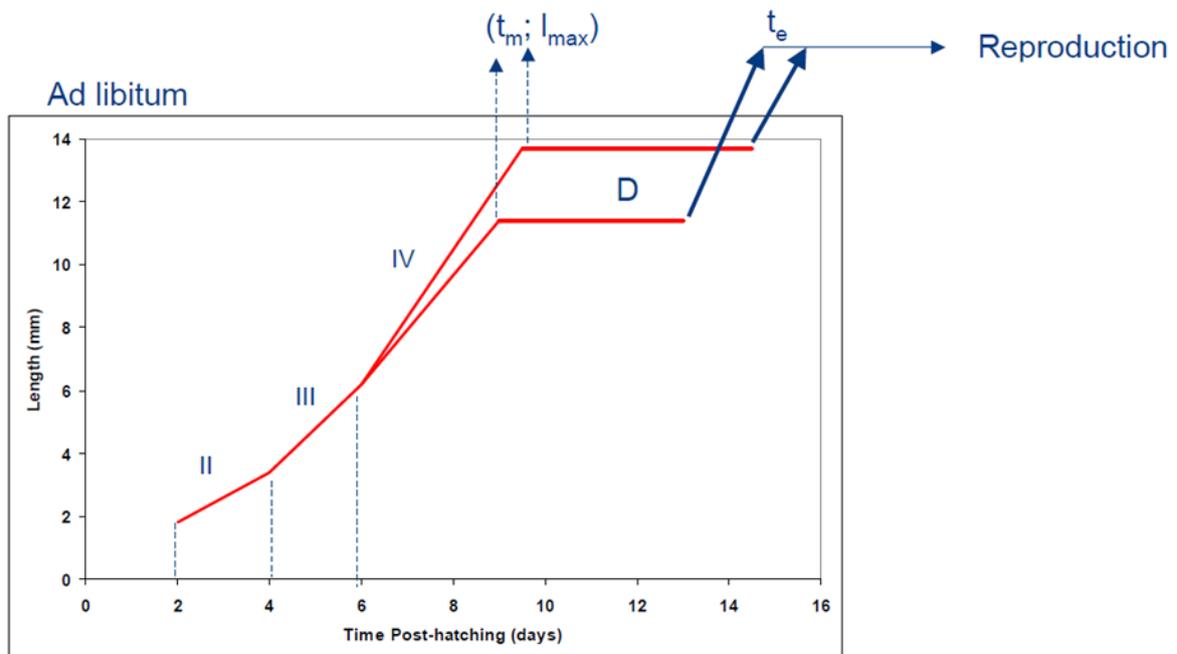


Figure 15: Croissance des chironomes et différenciation entre les mâles et les femelles à partir du stade 4, en condition de nourriture ad libitum et à une température donnée (Péry et al., 2002) et B. J. D Ferrari com. pers.

Entre le stade 2 et le stade 4, toute l'énergie du chironome est concentrée sur sa croissance, c'est à dire que l'énergie qu'il acquière par sa nourriture va être directement allouée à sa fonction de croissance jusqu'à arriver à un pallier au moment du stade 4. A ce niveau, le chironome va prendre du poids afin de stocker suffisamment d'énergie pour se préparer aux phases de pupe et d'émergence, de plus jusqu'à la phase adulte, l'énergie va être allouée à la fonction de reproduction (ovogénèse, constitution des tissus) malgré la métamorphose en pupe (Péry et al., 2002). Quand l'émergence a lieu, le mâle émerge avant la femelle (protandrie) (Taenzler et al., 2007).

### 4.1.3 Utilisation du chironome en écotoxicologie

Le chironome est un organisme largement utilisé en écotoxicologie de par sa facilité d'élevage au laboratoire, son cycle de vie court, sa croissance rapide et sa sensibilité aux sédiments contaminés. De plus, son cycle de vie et les effets toxiques sur cet organisme (échelle de l'individu et de la population) ont été modélisés et sont donc bien connus (Péry, 2003). Cet organisme est utilisé pour évaluer la toxicité aigüe et chronique des produits chimiques contenus dans les sédiments mais aussi dans l'eau de surface à partir de sédiment et/ou d'eau dopé (EPA, 2000a, b; OCDE, 2004a, b, 2010). Ces tests visent à regarder différents traits de vie reflétant la « bonne santé » de l'organisme comme le nombre total d'adultes émergés, le temps pour arriver à cette émergence, la survie et la croissance des larves à 10 jours après l'éclosion (post-éclosion) pour la toxicité aigüe (OCDE, 2004b). Des tests permettent également de mesurer les effets à plus long terme (toxicité chronique) des produits chimiques en observant différents traits de vie sur deux générations de chironome : le nombre total d'adultes émergés (1<sup>ère</sup> et 2<sup>ème</sup> génération), le taux de développement (1<sup>ère</sup> et 2<sup>ème</sup> génération), le sex-ratio des adultes émergés et vivants (1<sup>ère</sup> et 2<sup>ème</sup> génération), le nombre de masses pondues par femelle (1<sup>ère</sup> génération uniquement) et la fertilité des masses pondues (1<sup>ère</sup> génération uniquement) (OCDE, 2010).

Les chironomes sont également des organismes bioaccumulateurs et peuvent être exposés au laboratoire mais aussi directement sur le terrain (Bervoets et al., 2004; Burton Jr et al., 2005; Ferrari et al., 2014; Sibley et al., 1999). Ils accumulent aussi bien des composés métalliques (Bervoets et al., 1994; Besser et al., 1996; Besser and Rabeni, 1987; Craig et al., 1998; Gillis and Wood, 2008; Harrahy and Clements, 1997; Warren et al., 1998) que des

composés organiques (Belden et al., 2005; Clements et al., 1994; Gaskell et al., 2007; Harkey et al., 1994; Hwang et al., 2004; Leppänen et al., 2003; Leslie et al., 2002; West et al., 1997; Wood et al., 1997) (Tableau 3).

Tous ces points :

- large répartition géographique;
- importance écologique pour les échelons trophiques supérieurs ;
- élevage au laboratoire bien maîtrisé ;
- bonne connaissance de son cycle de vie.
- largement utilisé en écotoxicologie ;
- et organisme bioaccumulateur ;

en font un organisme de choix pour étudier la bioaccumulation des composés perfluorés (Tableau 3).

#### **4.2 Le gammare : *Gammarus sp.* (complexe *fossarum/ pulex*)**

##### **4.2.1 Répartition géographique et importance écologique**

Il existe plus de 4500 espèces parmi le sous-ordre des Gammaridea (Ordre des Amphipodes), il est largement répandu dans les habitats marin et d'eau douce et un peu moins répandu dans les habitats terrestres (Bousfield, 1973; Lincoln, 1979; Lincoln and Boxshall, 1987). De tous les habitats le genre *Gammarus* prédomine dans les eaux douces, en effet il existe 120 espèces dont 105 dans les eaux douces et 15 dans les eaux saumâtres ou marines. Ce genre est largement présent dans les écosystèmes aquatiques de l'hémisphère Nord (Hynes, 1956; Karaman and Pinkster, 1977a, b). Les facteurs abiotiques comme la salinité, la température, la conductivité et la pollution influencent la distribution de *Gammarus* (Fenchel and Kolding, 1979; Hynes, 1956; Jeffries and Mills, 1990; MacNeil et al., 2001; Whitehurst and Lindsey, 1990). Dans de nombreuses communautés d'eau douce, des espèces comme *Gammarus pulex* (Linnaeus) peuvent représenter le macro-invertébré dominant en terme de biomasse (Shaw, 1979) et en terme d'abondance (MacNeil et al., 1997). En effet les gammares vivent en populations de forte densité pouvant atteindre plusieurs milliers d'organismes au m<sup>2</sup> (Felten,

2003). Dans les cours d'eau d'Europe centrale, les 3 espèces de gammares les plus abondantes sont : *G. fossarum* Koch, 1835, *G. pulex* Linnaeus, 1758 et *G. roeseli* Gervais, 1835. Ces 3 espèces occupent souvent la même zone géographique, bien que *G. fossarum* habite principalement dans les aires montagneuses d'Europe centrale et d'Europe de l'Est (Figure 17), *G. roeseli* dans les plaines du Sud de l'Europe et en Asie Mineur et *G. pulex* est principalement retrouvé dans les parties de l'Europe du Nord (Illies, 1978; Karaman and Pinkster, 1977a, b). Le rôle des gammares dans les écosystèmes est d'une grande importance car ils représentent une ressource de nourriture précieuse pour les poissons, puisque ces derniers sont présents dans les milieux tout au long de l'année en dépit des changements de saisons et peuvent ainsi pallier au manque d'insecte lorsque ces derniers ne sont plus présents (Hynes, 1956; MacNeil et al., 1999). Mais aussi de par leur rôle détritivore permettant de redistribuer la matière organique dans le milieu (Felten, 2003; Fielding et al., 2003; MacNeil et al., 1997).



Figure 16: Aire de répartition de *Gammarus fossarum* (Barnard and Barnard, 1983)

#### 4.2.2 Cycle de vie et biologie du gammare

Le gammare est un organisme itéropare à reproduction sexuée (Figure 18), grandissant par mues successives. La durée de vie est d'environ 2 ans. Les embryons se forment dans la poche marsupiale de la femelle après fécondation par le mâle, leur naissance se fait suite à la mue de la femelle qui les expulse. Le cycle de mue dure environ 30 jours chez la femelle *G. fossarum* à 12°C (Geffard et al., 2010). Les nouveau-nés grandissent et deviennent mature à partir d'un certain nombre de mues (10 pour *G. pulex*), le temps de celle-ci varie suivant la température et le sexe de l'organisme (Welton and Clarke, 1980).



Figure 17 : Gammares mâle et femelle en précopula (photo : Hervé Quéau)

Le gammare possède un système circulatoire, la circulation sanguine ou hémolympatique se fait par l'intermédiaire d'un cœur mais peut aussi s'effectuer via des mouvements corporels, squelettomusculaire et par des contractions stomacales. Il est également doté d'un système nerveux comprenant un cerveau ou protocérébrum. Ce dernier est relié à une chaîne ganglionnaire située en position ventrale le long de l'intestin. Son système digestif est constitué d'un simple tube, presque entièrement rectiligne s'élargissant dans sa partie antérieure pour former un sac ovoïde représentant l'estomac. La respiration du gammare se fait par le battement des pléopodes situés au niveau du métasoma, car ce mouvement crée une circulation d'eau sur la surface branchiale (Grassé et al., 1961; Hervant, 1996). La figure 19 représente une vue latérale du gammare et la figure 20 représente une coupe longitudinale localisant les principaux organes de cet organisme.

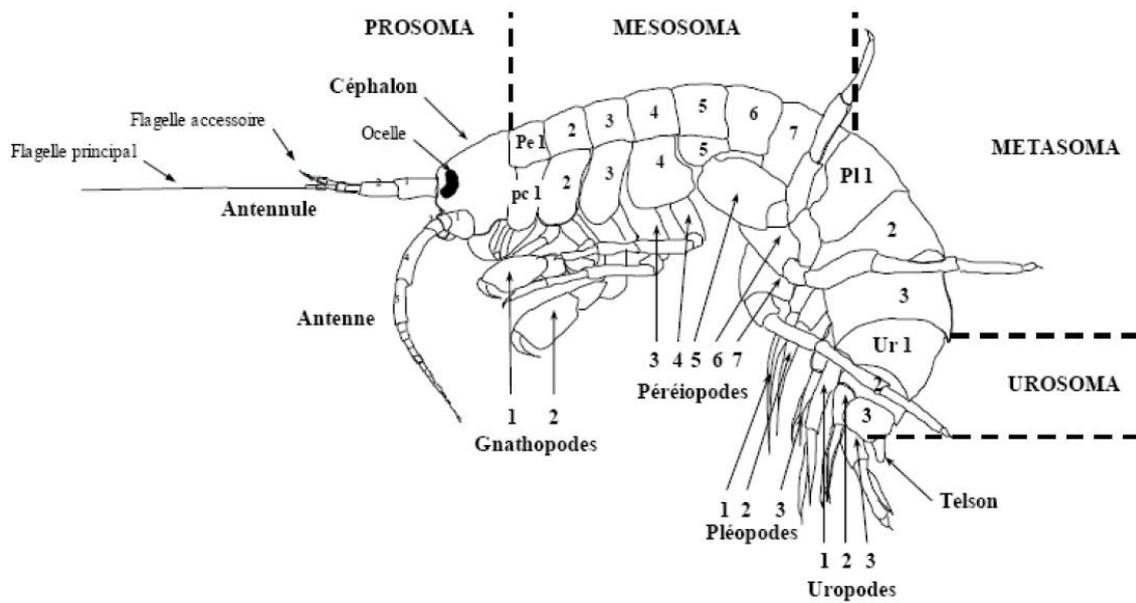


Figure 18: Vue latérale d'un gammare (adaptée d'après Roux, 1970 ; Chevreux et Fage, 1970) pc 1-7 : plaques coxales 1-7 ; Pe 1-7 : périomères 1-7 ; Pl 1-3 : pléomères 1-3 ; Ur 1-3 : uromères 1-3.

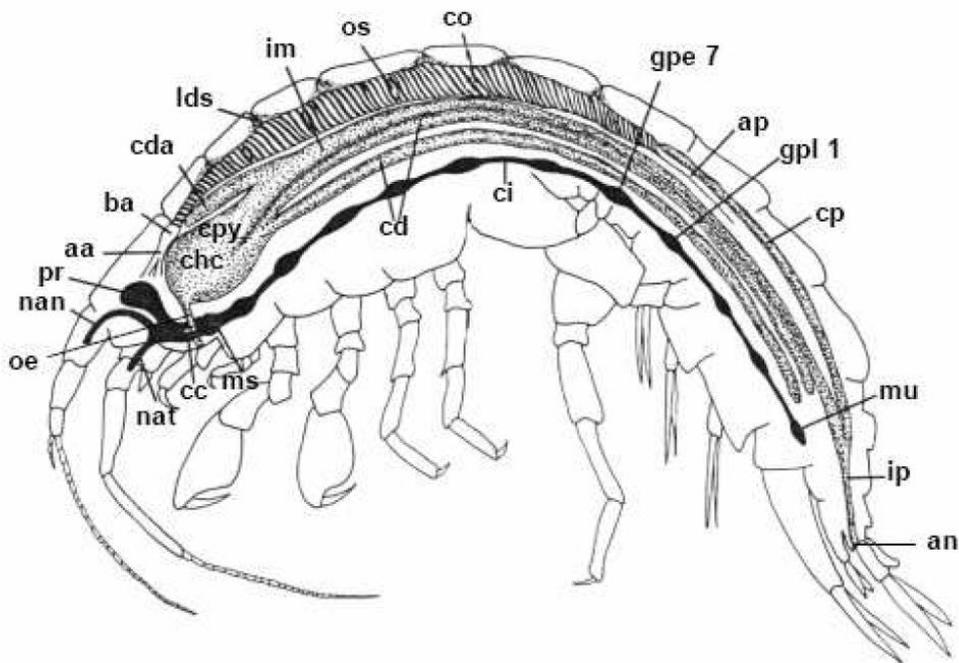


Figure 19: Coupe longitudinale d'un gammare (Schmitz, 1992)

aa, aorte antérieure ; an, anus ; ap, aorte postérieure ; ba, bulbe artériel ; cc, connexion circumoesophagiale ; cd, caecum digestifs ; cda, caecum dorsal antérieur ; chc, chambre cardiaque ; ci, gpe 7 et gpl 1, chaîne ganglionnaire, connexion intersegmentaire ; co, cœur ; cp, caecum postérieur ; cpy, chambre pylorique ; im, intestin moyen ; ip, intestin postérieur ; lds, ligament dorsal suspendu ; mu, masse urosomique (fusion des ganglions abdominaux 4-6) ; ms, masse suboesophagique ; nan, nerf antennulaire ; nat, nerf antennaire ; oe, œsophage ; pr, protocérèbrum.

### 4.2.3 Utilisation du gammare en écotoxicologie

Les gammares sont des organismes très étudiés, et notamment les espèces *G. pulex* et *G. fossarum*, de par leur grande importance dans les écosystèmes d'eau douce. Ces organismes sont sensibles aux polluants et aux perturbations, ce qui en fait de bons indicateurs écotoxicologiques, et de bons révélateurs de la santé des écosystèmes dulçaquicoles. En effet, les polluants peuvent réduire l'activité détritivore des gammares en modifiant et/ou en diminuant les communautés microbiennes présentes à la surface des feuilles (Forrow and Maltby, 2000; Webster and Benfield, 1986). Des diminutions dans l'abondance des gammares (mort de ces organismes) ont également été observées sur des gammares exposés à des lixiviats de décharges (Bloor et al., 2005). Les toxiques peuvent donc induire chez le gammare des diminutions du taux d'alimentation pouvant entraîner une diminution de la croissance, de la fécondité et de la survie des organismes (Anderson and Cummins, 1979; Maltby and Naylor, 1990), ce qui peut à une autre échelle, affaiblir et modifier les communautés de gammares dans les écosystèmes (Sutcliffe and Hildrew, 1989). Néanmoins, à l'heure actuelle, les gammares ne font pas partie des espèces proposées dans les tests OCDE. Mais ils sont fréquemment utilisés dans le cadre de l'évaluation des risques et de la qualité des écosystèmes aquatiques (Rinderhagen et al.). En effet ces derniers peuvent être utilisés dans diverses conditions, pour des études en conditions contrôlées au laboratoire (exposition à un toxique via l'eau de surface ou via le sédiment) mais aussi pour des études directement menées sur le terrain (*in situ*) (Kunz et al., 2010).

Les paramètres mesurés peuvent se situer à différents niveaux d'organisation, de l'individu à la population mais aussi à différents niveaux biologiques (enzymatique, énergétique, équilibre physiologique, reproduction). Au niveau de l'individu, ces paramètres peuvent être multiples, comme le taux d'alimentation qui est le paramètre le plus étudié (Blockwell et al., 1998; Bundschuh et al., 2009; Dangles and Guérold, 2000; Maltby and Crane, 1994; Taylor et al., 1993), mais aussi, la survie, le comportement (locomotion, ventilation, repos, endurance de nage, fuite face à un contaminant) (De Lange et al., 2006; Felten and Guérold, 2006; Gerhardt et al., 1998; J. Lawrence and Poulter, 1998; Lauridsen and Friberg, 2005), la reproduction (cycle de mue, développement ovocytaire et embryonnaire, anomalies gonadiques, fécondité, maintien du précopula) (Bloor et al., 2005; Geffard et al., 2010; Gross et al., 2001; Watts et al., 2001), la respiration (Kedwards et al., 1996), l'allocation d'énergie (Maltby and Naylor, 1990), le maintien de l'homéostasie (Felten

and Guéroid, 2006), les biomarqueurs (métallothionéine, acétylcholinestérase, heat shock protéine, enzymes digestives, génotoxicité) (Charron et al., 2014; Dedourge-Geffard et al., 2009; Geffard et al., 2010; Lacaze et al., 2010; Schirling et al., 2005; Xuereb et al., 2007). Au niveau de la population, les paramètres mesurés vont être la répartition des classes d'âge, le sexe ratio ou l'occurrence de l'intersexualité (Ford et al., 2004; Watts et al., 2002; Yang et al., 2008).

Les gammares sont également reconnus pour être des organismes bioaccumulateurs, notamment des composés métalliques (Amiard et al., 1987; Fialkowski et al., 2003; Lebrun et al., 2011; Plenet, 1995) mais aussi de contaminants organiques (Ashauer et al., 2006; Ashauer et al., 2010; Gaskell et al., 2007; Richter and Nagel, 2007; Viganò et al., 2007) (Tableau 3).

De même que pour les chironomes, les gammares ont/ sont :

- une large aire de répartition géographique ;
- une grande importance écologique ;
- un cycle de vie bien connu ;
- largement utilisés en écotoxicologie ;
- et sont des organismes bioaccumulateurs.

Ce qui en fait des organismes de choix pour l'étude de la bioaccumulation des composés perfluorés (Tableau 4).

Tableau 3: Exemple d'utilisation des chironomes et des gammarés dans des études de bioaccumulation.

Organismes	Laboratoire ou terrain	mode de contamination	Composés accumulés	Références
<i>Chironomus gr. thummi</i>	biomonitoring (organismes autochtones)	terrain	Cd, Pb, Cu, Zn	Bervoet et al., 1994
<i>Chironomus riparius</i>	laboratoire	lixiviat	Cd, Pb	Besser et al., 1987
<i>Chironomus tentans</i>	laboratoire	sédiment naturel (carotte)	Cu, Zn	Besser et al., 1996
<i>Chironomus staegeri</i>	laboratoire	sédiment naturel dopé et eau de surface dopée	Cd	Craig et al., 1998
<i>Chironomus riparius</i>	laboratoire	eau de surface dopée au Cd et au Ca, pas de substrat	Cd	Gillis et Wood, 2008
<i>Chironomus tentans</i>	laboratoire	sédiment synthétique dopé	Cd, Pb, Cu, Zn	Harraty et Clements, 1997
<i>Chironomus stuegeri</i>	terrain	terrain (eau de surface et sédiment)	Cd	Warren et al., 1998
<i>Chironomus riparius et Chironomus gr. Thummi</i>	biomonitoring et encagement	cage avec sédiment du terrain et passage de l'eau de surface	Cd, Cr, Cu, Pb, Ni, Zn	Bervoet et al., 2004
<i>Chironomus tentans</i>	laboratoire	eau de surface dopée	trinitrotoluène	Belden et al., 2005
<i>Chironomus riparius</i>	laboratoire	sédiment naturel dopé	Fluoranthène et Benzo[a]pyrène	Clements et al., 1994
<i>Chironomus riparius</i>	laboratoire	sédiment dopé	chlorure de dioctadécyl-diméthyl ammonium	Gaskell et al., 2007
<i>Chironomus riparius</i>	laboratoire	Chlorella vulgaris dopées	résidus de DDE et congénères de PCB	Hwang et al., 2004
<i>Chironomus tentans</i>	laboratoire	sédiment dopé	3,4,3',4'-tétrachlorobiphényl (PCB)	Leppänen et al., 2003
<i>Chironomus riparius</i>	laboratoire	eau de surface dopée	composés narcotiques ( $K_{ow}$ de 3 à 6)	Leslie et al., 2002
<i>Chironomus tentans</i>	laboratoire	nourriture dopée (Tetrafin®)	2,3,7,8- tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD)	West et al., 1997
<i>Chironomus tentans</i>	laboratoire	sédiment naturel	HAP et PCB	Wood et al., 1997

Tableau 3 (suite)

Organismes	Laboratoire ou terrain	mode de contamination	Composés accumulés	Références
<i>Gammarus pulex</i>	laboratoire	sédiment dopé	chlorure de dioctadécyl-diméthyl ammonium	Gaskell et al., 2007
<i>Gammarus zaddachi</i>	laboratoire	eau de surface dopée	Cu, Zn, Cd, Pb	Amiard et al., 1987
<i>Gammarus fossarum</i>	biomonitoring	terrain	Cd, Cu, Pb, Zn, Fe	Fialkowski et al., 2003
<i>Gammarus pulex</i>	laboratoire	eau de surface dopée	Ni	Lebrun et al., 2011
<i>Gammarus fossarum</i>	biomonitoring	terrain	Zn, Cu	Plenet, 1995
<i>Gammarus pulex</i>	laboratoire	eau de surface dopée	Chlorpyrifos et Pentachlorophénol	Ashauer et al., 2006
<i>Gammarus pulex</i>	laboratoire	eau de surface dopée	14 micropolluants organiques	Ashauer et al., 2010
<i>Gammarus fossarum</i>	laboratoire	eau de surface dopée et feuilles dopées	<sup>14</sup> C-terbutryn et <sup>14</sup> C-benzo[a]pyrène	Richter et Nagel, 2006
<i>Echinogammarus stammeri</i>	biomonitoring	calcul d'un facteur de bioconcentration biote-sédiment	HAP, PCB et DDT	Vigano et al., 2007

Tableau 4: Résumé des caractéristiques des deux organismes tests de cette étude

	<b>CHIRONOME</b>	<b>GAMMARE</b>
<b>Répartition géographique</b>	Zones tempérées de l'hémisphère Nord	Largement présent dans l'hémisphère Nord
<b>Importance écologique</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Forte densité mais variable en fonction de la saison (ex: Nord de l'Indiana, USA, 7500 larves.m<sup>-2</sup> en Octobre et jusqu'à 90 000 larves.m<sup>-2</sup> en Mai);</li> <li>- Source de nourriture pour les poissons (larves) et les oiseaux (adultes émergés);</li> <li>- Organisme bioturbateur.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Forte densité (plusieurs milliers d'organisme au m<sup>2</sup>)</li> <li>- Source de nourriture pour les poissons présente toute l'année;</li> <li>- Organisme détritivore, importance dans le recyclage des nutriments.</li> </ul>
<b>Cycle de vie</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- 4 étapes: œuf, larve planctonique et benthique, nymphe et imago (adulte aérien);</li> <li>- Sexe discriminé à partir du stade 4 de l'organisme, reproduction sexuée des adultes;</li> <li>- Cycle de vie court: 21 jours à 21°C et bien connu (modèle).</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Organisme itéropare à reproduction sexuée;</li> <li>- Embryons dans la poche marsupiale de la femelle, expulsés suite à la mue de cette dernière. Croissance des individus par mues successives (durée d'un cycle de mue chez la femelle à 12°C de 30 jours);</li> <li>- Sexe facilement discriminable;</li> <li>- Durée de vie: environ 2 ans.</li> </ul>
<b>Mode de vie en rapport avec le sédiment et mode de nutrition</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Une phase de vie larvaire en contact direct avec le sédiment (larve benthique);</li> <li>- Mode de nutrition: limivore c'est à dire qu'il se nourrit de la matière organique présente dans les sédiments.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Contact ponctuel avec le sédiment: organisme épibenthique;</li> <li>- Mode de nutrition: détritivore essentiellement c'est à dire qu'il se nourrit des débris de végétaux, il peut également se nourrir de petits invertébrés benthiques et de gammare (cannibalisme).</li> </ul>

Tableau 4 (suite)

	<b>CHIRONOME</b>	<b>GAMMARE</b>
<b>Utilisation en écotoxicologie</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Organisme test (OCDE, US EPA): test de toxicité aiguë et chronique à partir de l'eau de surface dopée et/ou du sédiment dopé;</li> <li>- Expositions au laboratoire ou bien engagées sur le terrain;</li> <li>- Organisme bioaccumulateur.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Organisme sensible à la pollution et aux perturbations;</li> <li>- Fréquemment utilisé dans le cadre de l'évaluation du risque et de la qualité des écosystèmes;      - Etude à différentes échelles: de l'individu à la population et à différents niveaux biologiques;</li> <li>- Expositions au laboratoire ou bien engagées sur le terrain;</li> <li>- Organisme bioaccumulateur.</li> </ul>

### 4.3 A retenir

Le choix de ces organismes comme organisme d'étude de la bioaccumulation des PFASs s'est fait sur :

- leurs différences de comportements trophiques, l'un se nourrit de la matière organique contenue dans les sédiments (le chironome), l'autre est un organisme détritivore (le gammare) ;

- leur capacité de bioaccumulation des polluants du milieu ;

- leur grande importance écologique en tant que source de nourriture pour les échelons trophiques supérieurs ;

- le maintien des organismes au laboratoire : le chironome est élevé au laboratoire et pour le gammare, nous avons la capacité de le maintenir en stabulation au laboratoire.

## 5 Conclusion – objectifs de la thèse

Les études s'intéressant au devenir des composés perfluorés dans l'environnement et notamment dans le biote sont récentes, la première concernant la distribution globale du PFOS ne date que de 2001 (Giesy and Kannan, 2001).

La complexité physico-chimique de ces molécules rend la compréhension de leur devenir dans l'environnement difficile :

- caractère amphiphile des PFASs;

- coefficient octanol-eau ( $K_{ow}$ ) non mesurable en toute rigueur pour ces composés ;

- affinité pour les protéines des PFASs (retrouvés dans les tissus riches en protéines comme le sang, le foie et les muscles) contrairement à certaines molécules persistantes et bioaccumulables comme les PCB par exemple, qui ont une affinité pour les lipides ;

- influence de la longueur de la chaîne carbonée sur la bioaccumulation.

Ces molécules organiques ont des propriétés physico-chimiques différentes par rapport à la plupart des polluants organiques persistants, ce qui rend l'appréciation de leur devenir dans l'environnement plus difficile. A l'heure actuelle, de nombreuses études de biomonitoring caractérisant la répartition des PFASs dans l'environnement ont été menées mais très peu concernent l'aspect mécanistique du transfert des perfluorés vers les organismes (Houde et al., 2011; Houde et al., 2006b) ; notamment la répartition des PFASs entre l'eau et les sédiments, et leur transfert au biote, surtout pour les composés à longues chaînes. De plus, les deux études menées sur la bioaccumulation des PFASs à partir du sédiment chez *Lumbriculus variegatus* ont observé des résultats contradictoires (Higgins et al., 2007; Lasier et al., 2011), ce qui illustre le fait que la caractérisation de ce transfert est encore mal connue.

Le but de ce travail de thèse est donc de caractériser le transfert des composés perfluorés du sédiment aux invertébrés benthiques. Il se réalise dans un contexte bien précis qui est celui d'utiliser des sédiments naturels locaux impactés par une source de contamination aux PFASs ; afin d'être au plus près de la réalité environnementale. Deux grandes questions sont traitées dans ce manuscrit.

La **première** concerne le rôle du compartiment sédimentaire dans les processus d'accumulation des PFASs dans le biote et est traitée dans les chapitres 3 et 4. Le chapitre 3 décrit les cinétiques d'accumulation des PFASs chez le chironome et retrace les voies de contaminations de ce dernier. Le chapitre 4 décrit les cinétiques d'élimination des PFASs chez ce même organisme et propose un modèle de bioaccumulation adapté à cet organisme et à la physico-chimie de ces molécules. La **deuxième** question vise à comprendre un des facteurs pouvant contrôler cette bioaccumulation. Le chapitre 5 traite donc de l'effet du mode de vie des organismes sur la bioaccumulation des PFASs. Il décrit les cinétiques d'accumulation et d'élimination des PFASs chez le gammaré. Cet organisme est épibenthique et a un comportement très différent de celui du chironome. Ce chapitre va donc permettre de comparer la bioaccumulation des PFASs entre ces deux organismes.

La dernière partie de la thèse, qui fait l'objet du chapitre 6, concerne l'évaluation des différences observées entre des organismes exposés au laboratoire et des organismes provenant du milieu. Ce chapitre évalue la variabilité spatio-temporelle de la contamination, l'influence de l'intégrité du sédiment sur la bioaccumulation des PFASs chez le chironome et l'effet des matières en suspension et de l'eau de surface du milieu sur la bioaccumulation des PFASs chez le chironome.

*Synthèse des questions de la thèse :*

- ✓ Quel est le rôle du compartiment sédimentaire dans les processus d'accumulation des PFASs dans le biote ?
- ✓ Quel va être l'effet du mode de vie des organismes sur la bioaccumulation des PFASs ?



## **Chapitre 2**

### ***Matériels et méthodes***



# 1 Plan expérimental global, présentation du site

## 1.1 Plan expérimental global

Dans ce travail de thèse nous avons suivi un schéma expérimental global (Figure 1) :

- utilisation d'un site impacté par une pollution anthropique aux PFASs ;
- prélèvements de sédiments (tamisés/ homogénéisés, carottes) ramenés au laboratoire ;
- expositions d'organismes à ces mêmes sédiments en conditions contrôlées ;
- prélèvements des différents compartiments dans les chambres d'exposition ;
- dosage des composés perfluorés par HPLC-MS/MS.

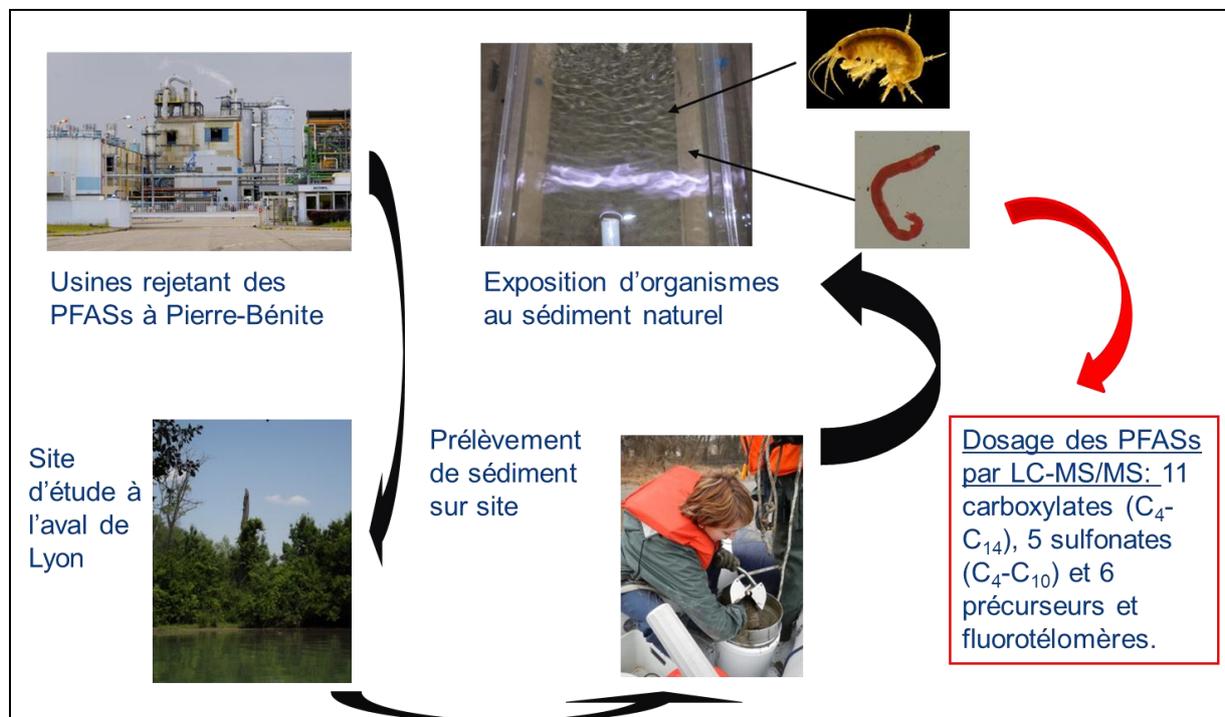


Figure 1: Schéma expérimental global de la thèse.

## 1.2 Présentation du site

Notre site est situé en aval de Lyon à une quarantaine de kilomètre, sur la lône de l'île du Beurre (à Condrieu, N45°28'17,0" E4°46'43,4"). La lône correspond à un bras mort du Rhône, il s'agit d'un terme typiquement lié à ce fleuve. Elle a une longueur totale de 950 m pour un débit moyen d'environ 0.34 m<sup>3</sup>.s<sup>-1</sup> (Plan de gestion du site de l'île du Beurre de 2006-2010, 2007). Le site de l'île du Beurre est composé en rive droite de l'île du Beurre et en rive

gauche de l'île de la Chèvre, au pied des vignobles des Côtes-Rôties. Ces deux îles se trouvent dans le Parc naturel régional du Pilat. L'île du Beurre est un refuge important pour la faune (237 espèces d'invertébrés, sédentaires et migratrices) et pour la flore (390 espèces végétales). Ce site est protégé par 3 mesures : (i) par un Arrêté Préfectoral de Protection de Biotope (APPB), (ii) il s'agit d'un Espace Naturel Sensible (ENS) et (iii) il s'agit également d'une Zone Naturelle d'Intérêt Ecologique, Floristique et Faunistique (ZNIEFF). L'île du Beurre est également une réserve de pêche, de chasse et de faune sauvage (site web île du Beurre).

Cependant, ce site est en aval d'une plateforme industrielle située à Pierre-Bénite fabriquant des élastomères fluorés et du polyfluorure de vinylidène (PVDF) (Dauchy et al., 2012). Des composés perfluorés sont donc rejetés directement dans le Rhône (Figure 2).

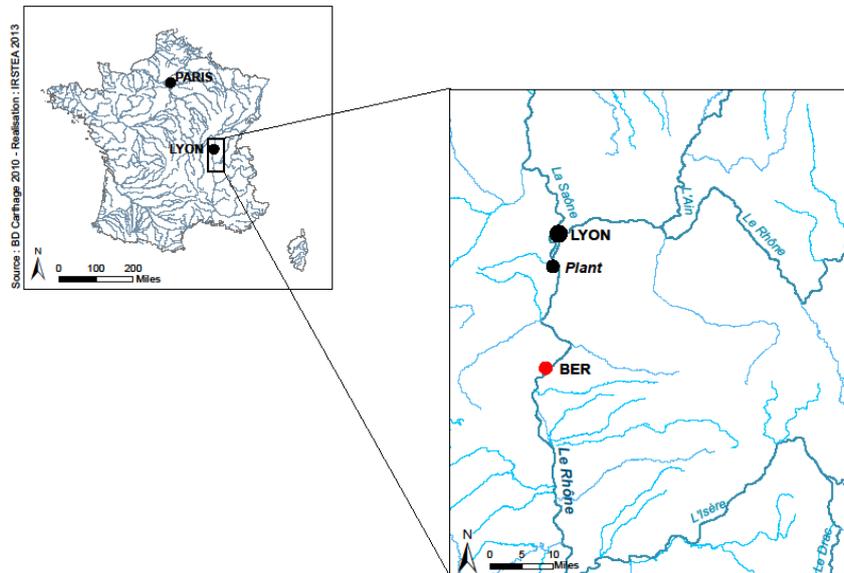


Figure 2: Localisation du site d'étude, BER = île du Beurre (A. François).

## 2 Prélèvements, stockage et préparation des sédiments avant exposition

### 2.1 Prélèvements, stockage et caractérisation

#### 2.1.1 Prélèvements de sédiments homogénéisés et stockage

Les sédiments ont été prélevés sur le site en rive gauche de la lône à l'aide d'une benne Van-Veen. Cette benne permet le prélèvement des 10 premiers centimètres du sédiment

de surface. Ces sédiments ont ensuite été tamisés à 2 mm afin de retirer les organismes autochtones, au dessus d'un seau de récolte, puis transférés dans un contenant en polypropylène (PP) (Figure 3). Les prélèvements sont conservés dans une glacière à 4°C puis ramenés au laboratoire où ils sont entreposés dans une chambre froide à 4°C jusqu'à leurs utilisations. Afin de respecter les règles de stockage des sédiments, ces derniers sont conservés au maximum pendant 8 semaines (ASTM, 2004).



Figure 3: Prélèvement de sédiment et tamisage

### 2.1.2 Prélèvement de carottes de sédiments

Les systèmes d'échantillonnage des carottes de sédiments servent également pour l'exposition des organismes. Ils sont constitués de tubes cylindriques en polychlorure de vinyle (PVC) (hauteur: 35 cm, diamètre externe 90 mm, diamètre interne: 81 mm) et de bouchons en polyéthylène (PE). Les carottes de sédiments de 22 cm ont été collectées puis conservées à 4°C dans une glacière et rapportées au laboratoire (Fig. 4). La quantité d'organismes autochtones présents dans les carottes a été estimée par le tamisage à 2 mm d'une carotte directement sur le terrain.

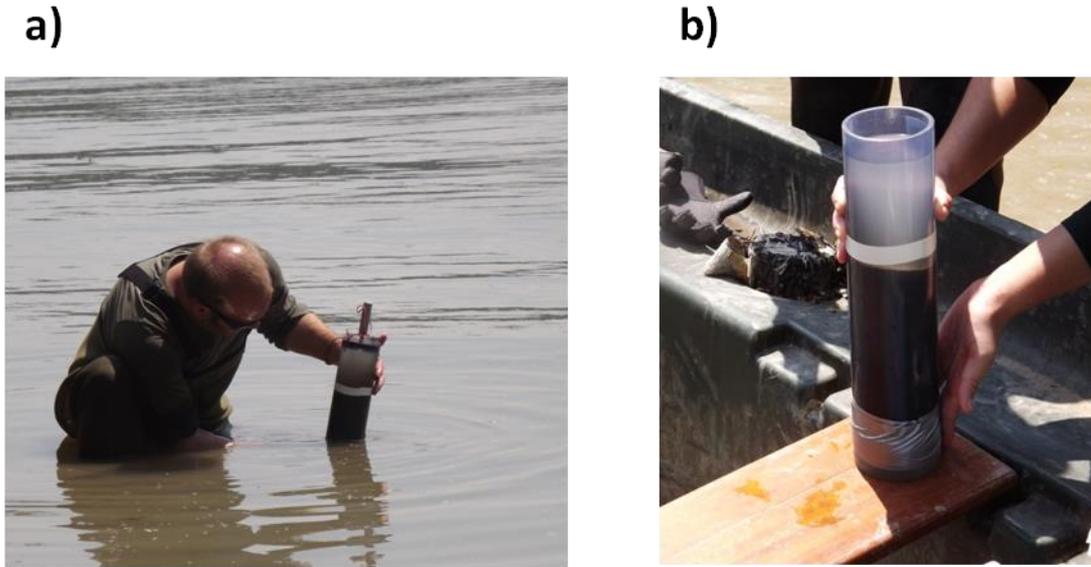


Figure 4: Prélèvements de carottes de sédiments, a) collecte des carottes et b) conditionnement des carottes.

### 2.1.3 Caractérisation physico-chimiques des sédiments et granulométrie

Chaque prélèvement de sédiment est suivi de sa caractérisation physico-chimique, la teneur en eau, les pertes au feu (proxy de la teneur en carbone organique, Heiri et al. (2001)), la teneur en carbonate ( $\text{CO}_3^{2-}$ ) et la teneur en azote sont mesurées. La distribution granulométrique est également suivie.

La teneur en eau est la première mesure à être réalisée, car cette dernière permet d'obtenir un sédiment sec utilisable pour réaliser les autres mesures. Pour cela, 100 g de sédiment humide sont placés dans une coupelle en verre préalablement pesée, puis séchés à l'étuve à  $50^\circ\text{C}$  pendant 48h. La coupelle contenant les sédiments secs est alors pesée. La teneur en eau est calculée comme suit (Eq. 1):

$$\text{Teneur en eau (\%)} = \left( \frac{msh - mss}{mss} \right) \times 100 \quad \text{Eq. (1)}$$

Avec  $msh$ , la masse de sédiment humide en g et  $mss$  la masse de sédiment sec en g. Le sédiment sec est ensuite broyé à l'aide d'un broyeur à agate.

A partir de ce sédiment sec et broyé, les pertes au feu, la teneur en azote et la teneur en carbonate sont mesurées en suivant des protocoles standardisés (AFNOR, 1994, 2000, 2007; Vatan 1967). La méthode du calcimètre de Bernard est utilisée pour la mesure de la teneur en

carbonate. Ces trois mesures ont été réalisées par le laboratoire d'analyses chimique d'IRSTEA Lyon-Villeurbanne (UR MALY).

La granulométrie des sédiments s'est faite à partir d'un échantillon de sédiment humide et homogène par diffractométrie laser (Cilas 1190, France).

## 2.2 Préparation des chambres d'exposition et dopage des sédiments

### 2.2.1 Préparation des chambres ou aquariums d'exposition

Les aquariums tests (38 x 20 x 24.5 cm en polystyrène) sont préparés avec 4L de sédiment (naturel ou dopé) préalablement homogénéisé et 15L d'eau souterraine (seule ou mélangée à de l'eau osmosée afin d'obtenir une conductivité constante). Les sédiments décantent pendant une semaine, dans un bain thermostaté à la température d'exposition, avant l'introduction des organismes afin que les couches oxiques et anoxiques puissent se reformer (Figure 5).

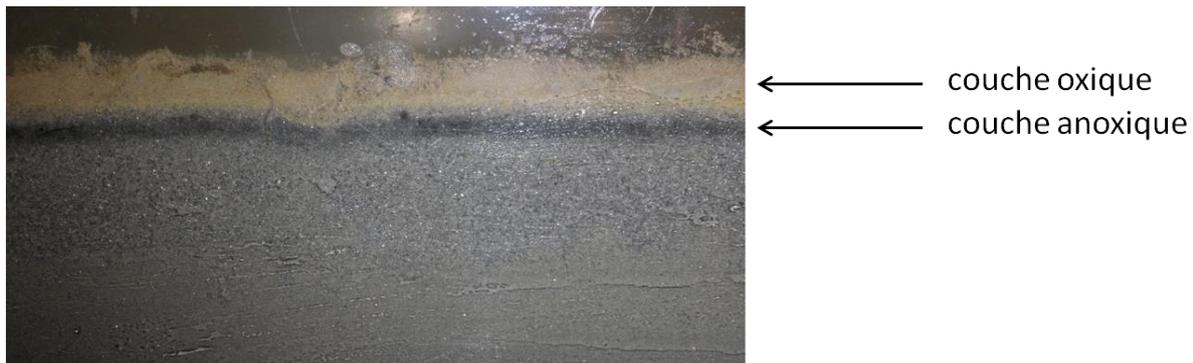


Figure 5: Couches oxique et anoxique des sédiments dans les aquariums après une semaine de décantation

### 2.2.2 Dopage des sédiments naturels

La méthode de dopage des sédiments utilisée dans ce manuscrit correspond à celle conduite dans l'étude de Dabrin et al. (2012).

Pour cela, 1.2L de sédiment naturel, préalablement homogénéisé, est ajouté dans des bouteilles en verre de 2L, auquel 200mL d'eau sont rajoutés. L'eau utilisée pour le dopage des sédiments correspond à celle utilisée dans les chambres d'exposition des organismes. La solution de PFASs (PFTTrDA, PFUnA, PFOS et FOSA suivant le dopage réalisé) est ensuite

ajoutée à l'aide d'une micro-pipette. 200mL d'eau sont ensuite rajoutés puis chaque bouteille est mélangée par retournements successifs. Les bouteilles sont disposées sur un système d'agitateur rotatif (Heidolph REAX20) à 6 tours/ min. Après 6h d'agitation le contenu des bouteilles est transféré dans un contenant en PP. Puis, après 48h de décantation, l'eau de surface est retirée et le sédiment est homogénéisé afin d'être introduit dans les chambres d'exposition des organismes.

### 3 Prélèvements et élevage des organismes d'études

#### 3.1 Origine des organismes

Les chironomes sont produits au laboratoire suivant un protocole standardisé de culture (AFNOR, 2010; OCDE, 2004b), tandis que les gammares sont directement prélevés dans le milieu.

#### 3.2 Elevage des chironomes

Avant chaque expérimentation, des chironomes de stade 2 à 4 (Figure 6), suivant les besoins, sont produits. Des masses sont alors récupérées, dans des piluliers contenant de l'eau, à partir des systèmes de culture des chironomes. Ces masses peuvent se conserver à 4°C pendant 10 jours. Elles sont ensuite mises à éclore dans une étuve à 21°C pendant deux jours et demi. Une fois que les larves ont éclos (ces dernières sont au stade 1, le seul stade planctonique) elles sont placées dans un plat à gratin préalablement préparé avec une couche de silice sur le fond et 50 mg de nourriture commerciale (Tetramin®) par masse éclore à déposer dans le plat. Ces plats sont sous une constante aération avec une photopériode de 16 :8h jour : nuit. Deux jours après l'éclosion (J2 post-éclosion) les larves ont atteint le deuxième stade qui correspond au premier stade benthique. Les plats à gratins sont alors sortis de l'étuve puis par une agitation de la couche de silice et transvasement de l'eau de surface contenant les larves dans un second plat à gratin. Ces dernières sont comptées, à l'aide d'une table lumineuse et d'une pipette pasteur. A partir de ce stade, les larves peuvent être directement transvasées dans une chambre d'exposition, ou bien afin d'atteindre le stade 4, transférées dans de grands seaux contenant 3-4 cm de silice, de l'eau et une aération constante, avec une photopériode de 16 :8h jour : nuit, à 21°C. Les larves sont alors nourries quotidiennement avec 1mg de Tetramin® par larve. Après 5 jours (J7 post-éclosion), les

larves ont alors atteint le début du stade 4 et peuvent être transférées dans les chambres d'exposition. Pour cela, la silice contenue dans les seaux est tamisée à 500 $\mu$ m, à l'aide d'un jet d'eau sous une légère pression. Les larves restantes sur le tamis sont alors transférées dans un plat à gratin contenant de l'eau puis elles sont comptées à l'aide d'une table lumineuse et d'une pipette pasteur dont l'extrémité a été sectionnée.

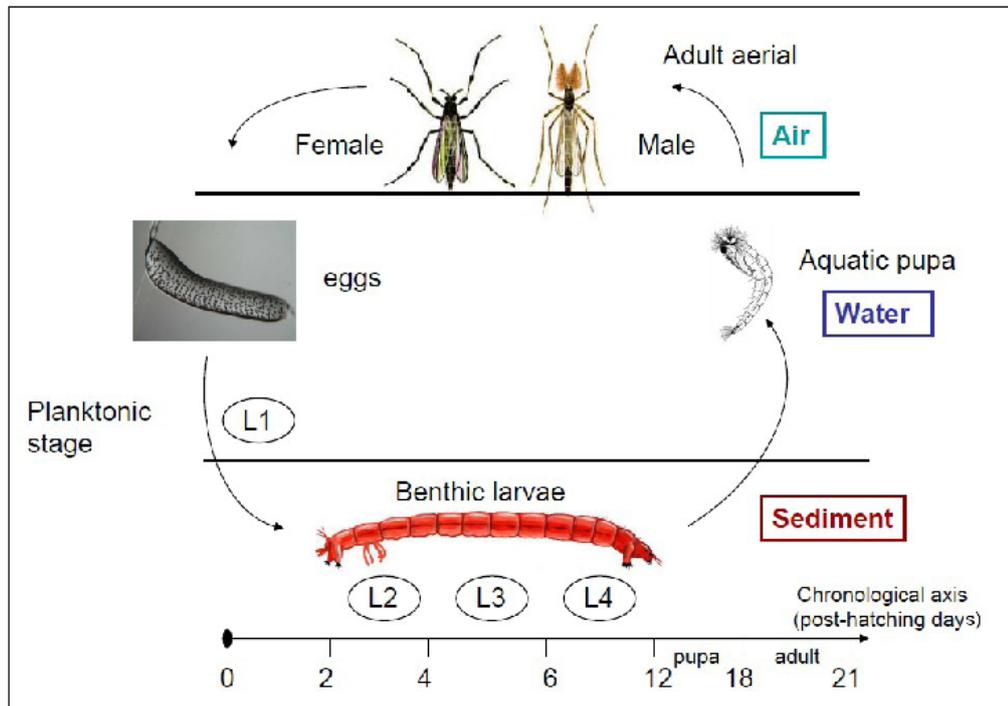


Figure 6: Cycle de vie de *Chironomus riparius*

### 3.3 Prélèvements des gammares et maintien au laboratoire

Les gammares n'étant pas élevés au laboratoire, nous devons les prélever dans le milieu naturel. Pour cela, à l'aide d'un troubleau, correspondant à un filet accroché à un manche en inox, les gammares sont récupérés et déposés dans une colonne de tamis. Cette colonne est composée d'un dégrilleur à grosses mailles, d'un tamis de 2.5 mm et d'un tamis de 2 mm. Par agitation, les gammares sont alors répartis par taille au niveau des tamis, pour obtenir des gammares adultes (d'environ 10 mm), nous récupérons les organismes déposés sur le tamis de 2 mm dans un seau contenant l'eau du milieu. Le seau est alors placé dans une

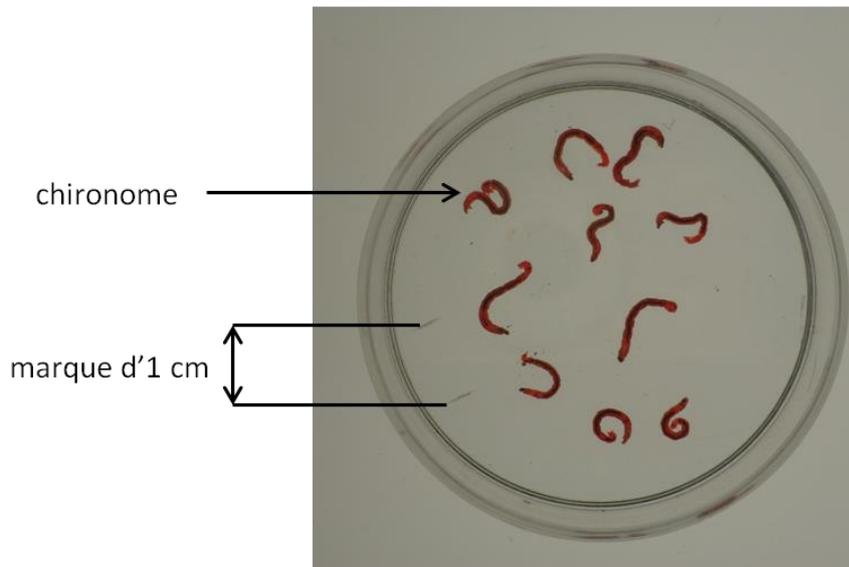
glacière à 4°C jusqu'au retour au laboratoire. Les débris végétaux et les organismes autres que les gammares sont retirés à l'aide d'un plat à gratin contenant l'eau du milieu, d'une table lumineuse et d'une maille fine en plastique. Les organismes ainsi triés sont transvasés dans un aquarium à 12°C, préalablement préparé, sous une constante aération, un renouvellement en eau continu et une photopériode de 16 :8h jour : nuit. Les gammares sont ainsi acclimatés aux conditions du laboratoire pendant deux à trois semaines avant leur exposition, ils sont nourris de manière *ad libitum* avec des feuilles d'aulnes (*Alnus glutinosa*). Avant leur introduction dans les aquariums contenant les gammares, les feuilles ont été conditionnées, c'est-à-dire qu'elles ont été plongées dans de l'eau pendant un à deux jours, afin qu'un biofilm microbien s'y développe. Quelques jours avant l'exposition des organismes, ces derniers sont triés par sexe et par taille, seuls les gammares mâles ayant une taille homogène sont utilisés dans nos expérimentations.

## 4 Expositions des organismes au laboratoire et sur le terrain

### 4.1 Chironomes

#### 4.1.1 Mesures des traits de vie et collecte des échantillons

Les traits de vie mesurés sont la taille et le poids des organismes au cours du temps afin de suivre leur croissance durant les tests mais aussi leur survie. Pour mesurer la taille et le poids moyen, les organismes sont photographiés et pesés par lots de 10. La taille est ensuite mesurée à l'aide d'un logiciel de photographie (Jmicrovision, disponible gratuitement via <http://www.jmicrovision.com/>) (Figure 7).



**Figure 7: Photographie d'un lot de 10 chironomes**

Dans chaque expérimentation, les eaux de surface et interstitielle, le sédiment et les organismes sont échantillonnés. La collecte de l'eau de surface se fait directement dans une bouteille d'un litre en polyéthylène (PE), celle de l'eau interstitielle se fait via un système Rhizon® (SDEC, Reignac-sur-Indre, France) qui consiste en une fibre en verre à l'intérieur d'un polymère poreux (Figure 8). Les sédiments sont collectés directement dans des flacons en PE à l'aide d'une cuillère en acier inoxydable. Les organismes sont collectés en tamisant les premiers centimètres du sédiment et/ou de la silice avec un tamis de 500  $\mu\text{m}$ . Les échantillons de biote sont divisés en différentes fractions, une pour les analyses des PFASs (environ 800 mg de poids frais, ce qui représente environ 200 larves), une pour les analyses des isotopes du  $^{13}\text{C}$  et de  $^{15}\text{N}$  (environ 5mg de poids sec), une pour les analyses des lipides totaux (environ 100 mg de poids frais) et une pour les analyses des protéines totales (environ 40 mg de poids frais). Les PFASs sont mesurés dans chaque échantillon biotique et abiotique. Les échantillons de biote sont cryogénisés à l'azote liquide puis conservés à  $-21^\circ\text{C}$ . Les autres échantillons sont conservés à  $-21^\circ\text{C}$ .

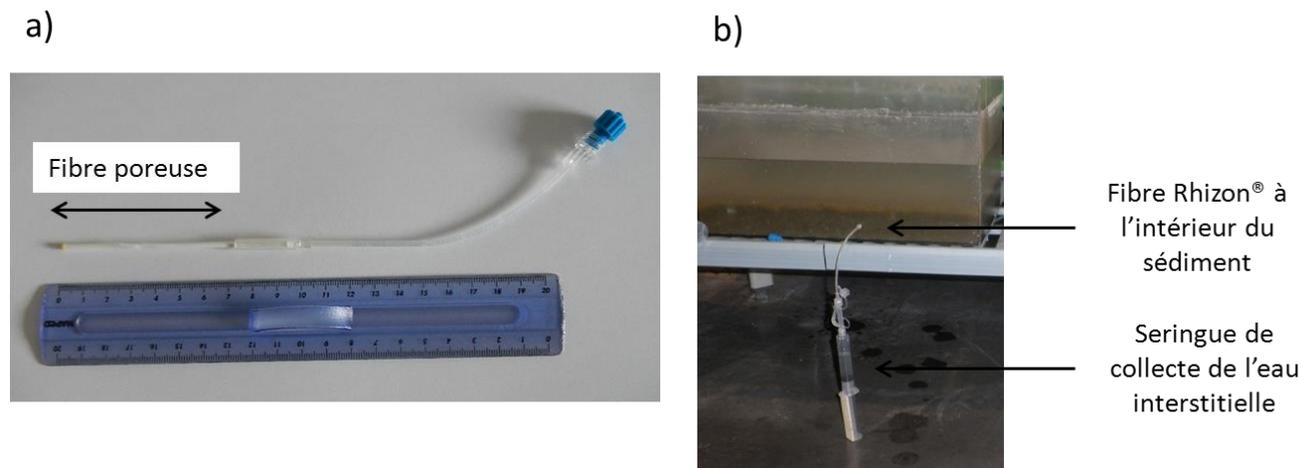


Figure 8 : Système Rhizon® : a) photographie du système, b) collecte de l'eau interstitielle du sédiment.

#### 4.1.1 Cinétique d'accumulation des PFASs à partir de sédiment naturel au laboratoire (Chapitre 3)

##### 4.1.1.1 Mise en place du système d'exposition

Deux expérimentations ont été conduites, la première (E1) consistant à exposer des chironomes du stade 2 jusqu'à la fin du stade 4 à du sédiment naturel, la deuxième (E2) à réaliser une cinétique d'accumulation des PFASs avec des chironomes exposés du début jusqu'à la fin du stade 4 (Figure 9).

Pour l'expérimentation E1, 3 aquariums tests ont été préparés avec du sédiment naturel (comme décrit au paragraphe 2.2.1). 1200 larves de chironomes de stade 2 (2 jours post-éclosion) ont été ajoutées aux aquariums tests (400/ aquarium). Les larves de chironomes ont ainsi été exposées pendant 9 jours (Tf) à 21°C, nourries quotidiennement *ad libitum* à raison de 1 mg de Tetramin® par larve, sous constante aération, avec un renouvellement en eau continu (4 fois par jour) et une photopériode de 16 :8h jour : nuit.

Pour l'expérimentation E2, de la même manière que pour l'expérimentation E1, 3 aquariums tests ont été préparés, puis 1200 larves de chironomes en début de stade 4 (7 jours post-éclosion) ont été ajoutées aux aquariums (400/aquarium). Les larves ont été exposées pendant 2 (T1), 3 (T2) et 4 (T3) jours à 21°C, nourries quotidiennement *ad libitum* à raison de

1 mg de Tetramin® par larve, sous constante aération, avec un renouvellement en eau continu (4 fois par jour) et une photopériode de 16 :8h jour : nuit.

En parallèle de ces deux expérimentations, 3 aquariums témoins contenant de la silice ont été préparés de la même manière que les aquariums tests. 1200 larves de stade 2 (2 jours post-éclosion) ont été ajoutées à raison de 400 larves par aquarium. Les larves ont été sacrifiées au bout de 9 jours d'expérimentation (Te) (Figure 10).

Les paramètres de qualité de l'eau (pH, concentration en oxygène dissous, conductivité, température, nitrites  $[\text{NO}_2^-]$  et ammonium  $[\text{NH}_4^+]$ ) ont été contrôlés une fois dans la semaine d'expérimentation, au début et à la fin des expérimentations.

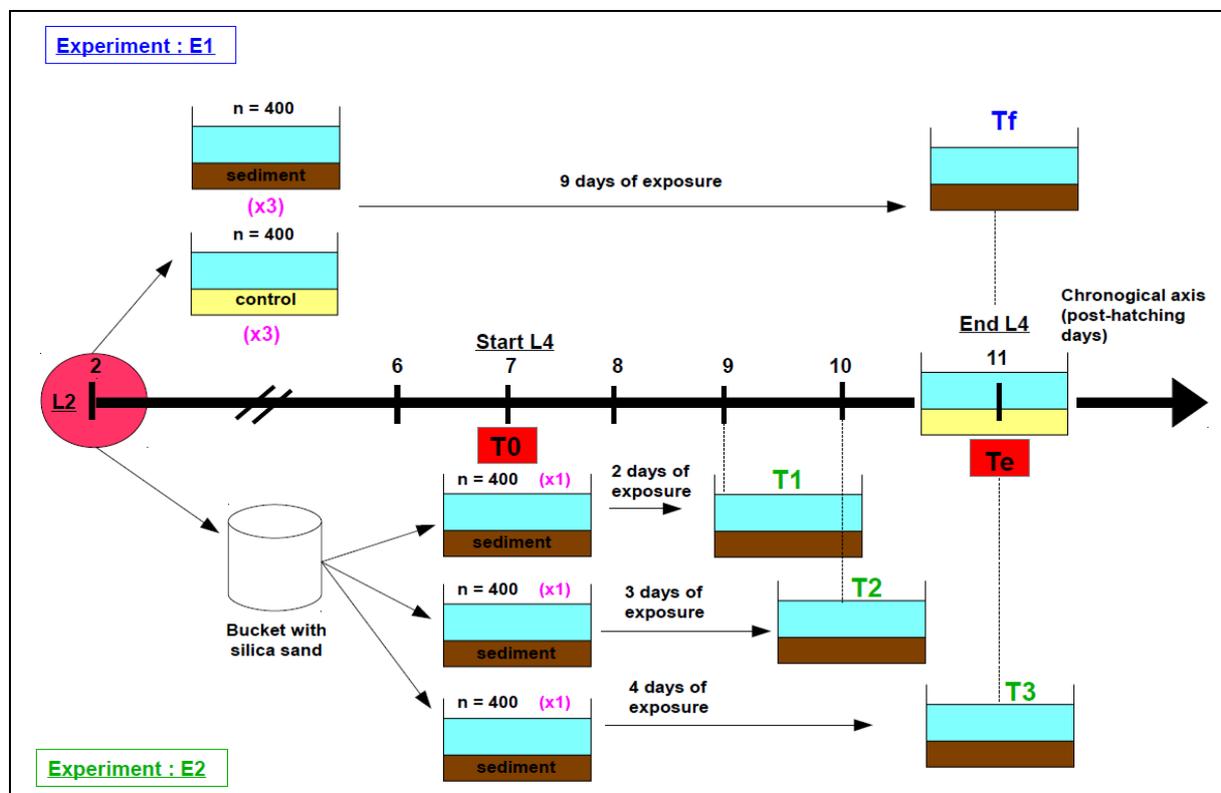


Figure 9: Design expérimental des cinétiques d'accumulation des PFASs par les chironomes à partir de sédiment naturel, E1: exposition des organismes à partir du stade 2 jusqu'à la fin du stade 4, E2: exposition des chironomes du début du stade 4 jusqu'à la fin de ce même stade.



Aquarium sédiment  
(test)



Aquarium silice  
(témoin)

**Figure 10: Photographie des aquariums avec du sédiment et avec de la silice**

#### *4.1.1.2 Echantillonnage, mesure des traits de vies*

Dans l'expérimentation E1, les organismes ont été sacrifiés à  $T_{final}$ , dans l'expérimentation E2, ils ont été sacrifiés à T1, T2 et T3 et pour les témoins à  $T_e$ . Des organismes en début de stade 4 (7 jours post-éclosion), avant leur introduction dans les aquariums ont été également sacrifiés, il s'agit du point T0. L'eau de surface, l'eau interstitielle et les sédiments ont été échantillonnés à T1, T2, T3 et  $T_{final}$ .

A chaque temps d'échantillonnage, la survie, la taille et le poids des organismes ont été relevés sur 4 lots de 10 chironomes. La taille et le poids des organismes ont également été réalisés à T0.

#### **4.1.2 Accumulation et élimination des PFASs à partir de sédiments contaminés (Chapitre 4)**

Trois expérimentations ont été conduites, la première (E1) consistant à un test d'accumulation des PFASs chez des chironomes en début de stade 4 (7 jours post-éclosion) pendant 4 jours à du sédiment naturel (concentration C01) et à du sédiment dopé en PFOS, FOSA, PFUnA et en PFTrDA à deux concentrations (C1 et C2). La deuxième (E2) consistant à l'exposition de larves en début de stade 4 pendant 2 jours à du sédiment naturel dopé en PFTrDA (concentration C3) puis à leur transfert dans un milieu propre afin de décrire la cinétique d'élimination du PFTrDA. La troisième expérimentation (E3) consistant à la description des cinétiques d'élimination des PFASs à partir de sédiment naturel chez le chironome.

#### 4.1.2.1 Tests d'accumulation et d'élimination des PFASs à partir de sédiments dopés

Afin de mener l'expérimentation E1, du sédiment naturel (C01) a été dopé avec du PFOS, du FOSA, du PFUnA et du PFTrDA à deux concentrations (C1 et C2). Pour l'expérimentation E2, du sédiment naturel (C02) a été dopé avec une solution unique de PFTrDA à une concentration C3 (Tableau 1).

**Tableau 1 : Détails de la méthode de dopage des sédiments, chaque concentration en PFASs contenue dans les sédiments naturels a été multipliée par 2, 5, 10, 20 et 25 fois suivant les molécules et les concentrations. Les concentrations initiales en FOSA présentaient des niveaux faibles dans les sédiments ce qui explique des facteurs de dopage plus élevés que pour les autres molécules.**

	PFUnA/PFOS	PFTrDA	FOSA
C01	-	-	-
C02	-	-	-
C1	x5	x5	x20
C2	x10	x10	x25
C3	-	x2	-

Pour le test d'accumulation des PFASs (E1), 3 aquariums ont été préparés, un avec du sédiment naturel (concentration C01), un autre avec du sédiment dopé à la concentration C1 et un dernier avec du sédiment dopé à la concentration C2. En parallèle, trois aquariums témoins ont été préparés avec de la silice. 2800 larves en début de stade 4 (7 jours post-éclosion) ont été ajoutées dans les aquariums contenant du sédiment et dans les aquariums témoins à raison de 400 larves par aquarium. Après 4 jours d'exposition, tous les organismes ont été sacrifiés (T<sub>final</sub> pour les aquariums contenant du sédiment et T<sub>c</sub> pour les aquariums témoins) (Figure 11).

Pour l'expérimentation E2, 2 aquariums ont été préparés avec le sédiment dopé en PFTrDA à la concentration C3 et, de la même manière, un aquarium témoin a été préparé avec de la silice. 2000 larves en début de stade 4 (7 jours post-éclosion) ont été ajoutées dans les deux aquariums contenant du sédiment dopé à raison de 1000 larves par aquarium et 400 larves ont été ajoutées dans l'aquarium témoin. Après deux jours d'exposition au sédiment, 400 larves ont été sacrifiées (T<sub>1</sub>, correspondant au point d'accumulation), tandis que les autres larves exposées au sédiment ont été transférées dans 3 aquariums contenant de la silice

afin de les faire dépurier. Les organismes ont été ensuite sacrifiés au bout de 6 h (T2), 18 h (T3) et 42 h (T4) d'élimination. En parallèle du sacrifice des larves à T4, les chironomes contenus dans les aquariums témoins ont également été sacrifiés (T4 control) (Figure 11).

Dans les expérimentations E1 et E2, tous les organismes ont été exposés à 21°C, sous une constante aération, avec un renouvellement continu de l'eau souterraine et une photopériode de 16 :8h jour : nuit. Les larves ont été nourries *ad libitum* quotidiennement à raison de 1 mg de Tetramin® par larve. Les paramètres de qualité de l'eau (pH, concentration en oxygène dissous, conductivité, température, NO<sub>2</sub><sup>-</sup> et NH<sub>4</sub><sup>+</sup>) ont été contrôlés une fois dans la semaine.

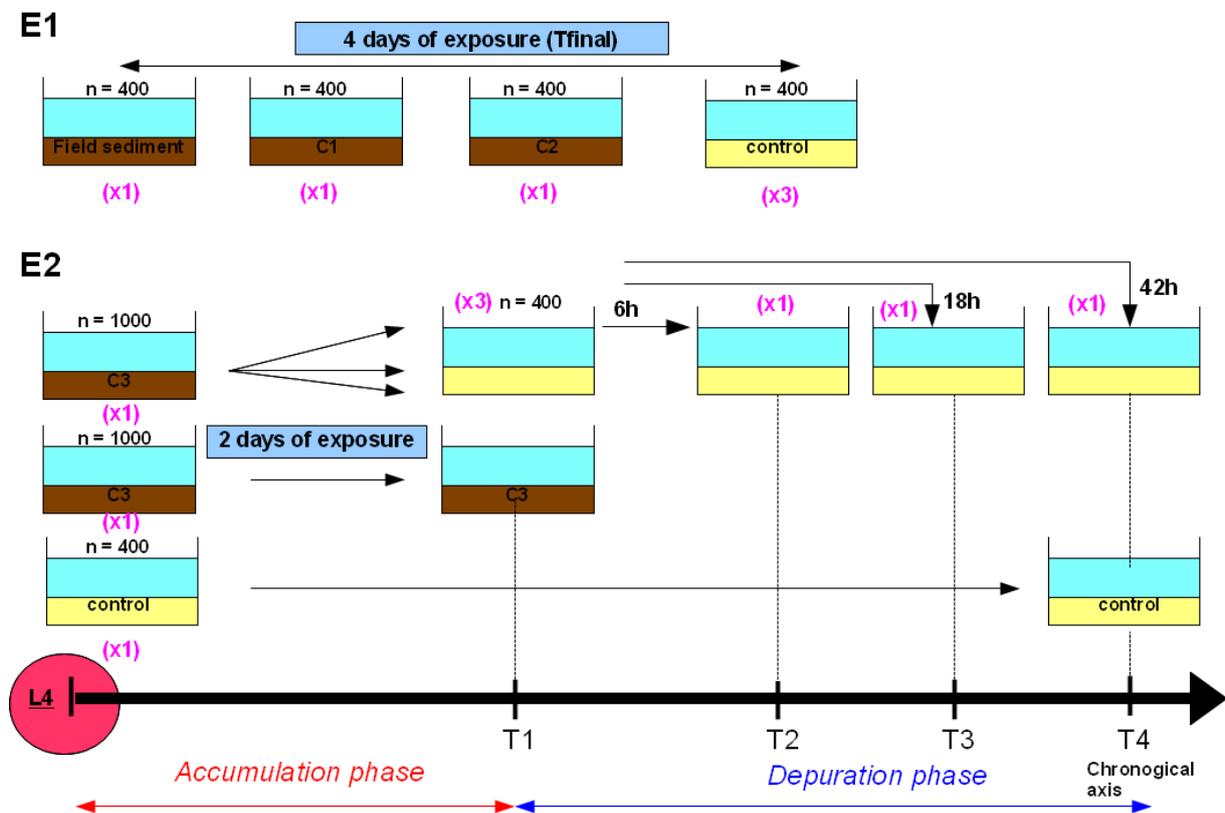


Figure 11: Design expérimental des expérimentations E1 et E2

#### 4.1.2.2 Cinétiques d'élimination des PFASs à partir de sédiments naturels

Afin de décrire les cinétiques d'élimination des PFASs, une expérimentation E3 a été mise en place. Pour cela, 4 aquariums ont été préparés avec du sédiment naturel (à une concentration C02, tableau 1) et, de la même manière, 3 aquariums témoins ont également été

préparés avec de la silice. 2800 larves ont été ajoutées dans les aquariums contenant du sédiment et de la silice à raison de 400 larves par aquarium. Après 2 jours d'exposition, les organismes contenus dans un aquarium sédiment ont été sacrifiés (T1 correspondant au point d'accumulation), tandis que les autres larves ont été transférées dans 3 aquariums contenant de la silice pour la phase de dépuración. Les organismes ont ensuite été sacrifiés après 6 h (T2), 18 h (T3) et 42 h (T4) de dépuración. En parallèle du sacrifice des larves à T4, les organismes contenus dans les aquariums témoins ont également été sacrifiés (T4 control) (Figure 12).

Dans cette expérimentation, la température d'exposition a été de 21°C, avec une constante aération, un renouvellement continu de l'eau de surface et une photopériode de 16 :8h jour : nuit. Les larves ont été nourries *ad libitum* quotidiennement à raison de 1 mg de Tetramin® par larve. Les paramètres de qualité de l'eau (pH, concentration en oxygène dissous, conductivité, température,  $\text{NO}_2^-$  et  $\text{NH}_4^+$ ) ont été contrôlés une fois dans la semaine d'expérimentation.

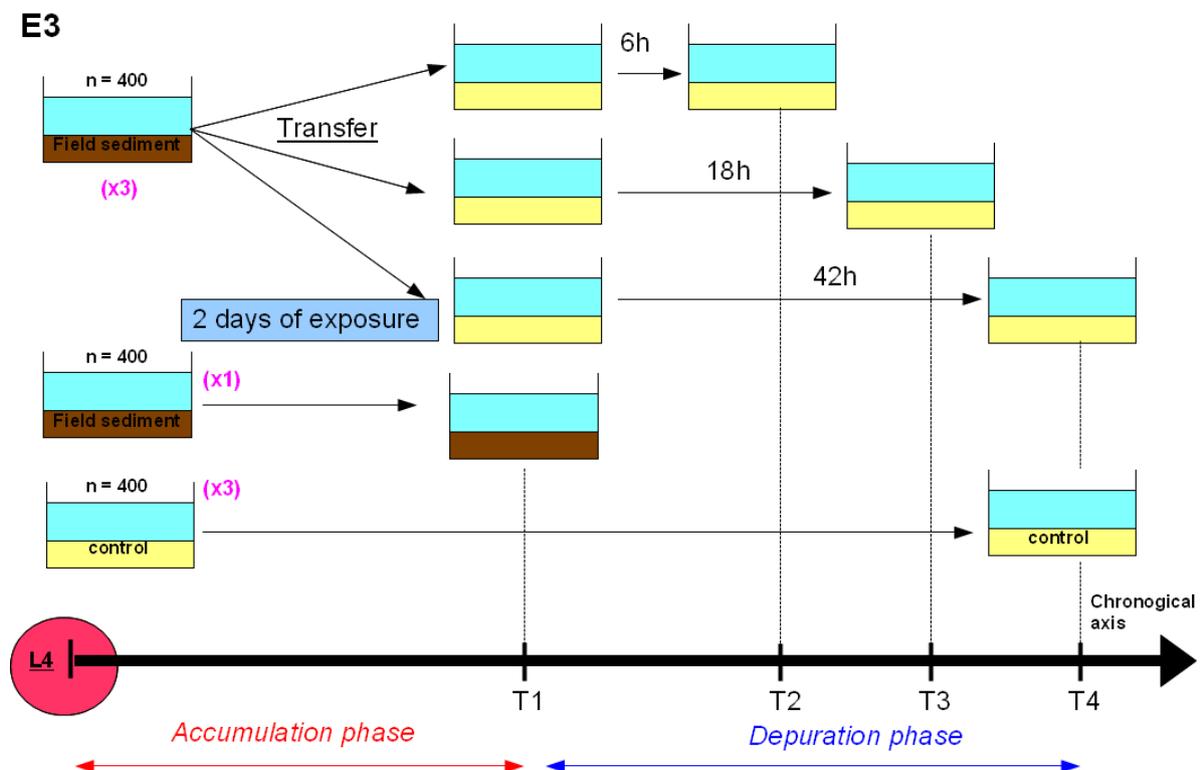


Figure 12: Design expérimental de l'expérimentation E3

#### 4.1.2.3 Echantillonnage, mesure des traits de vie

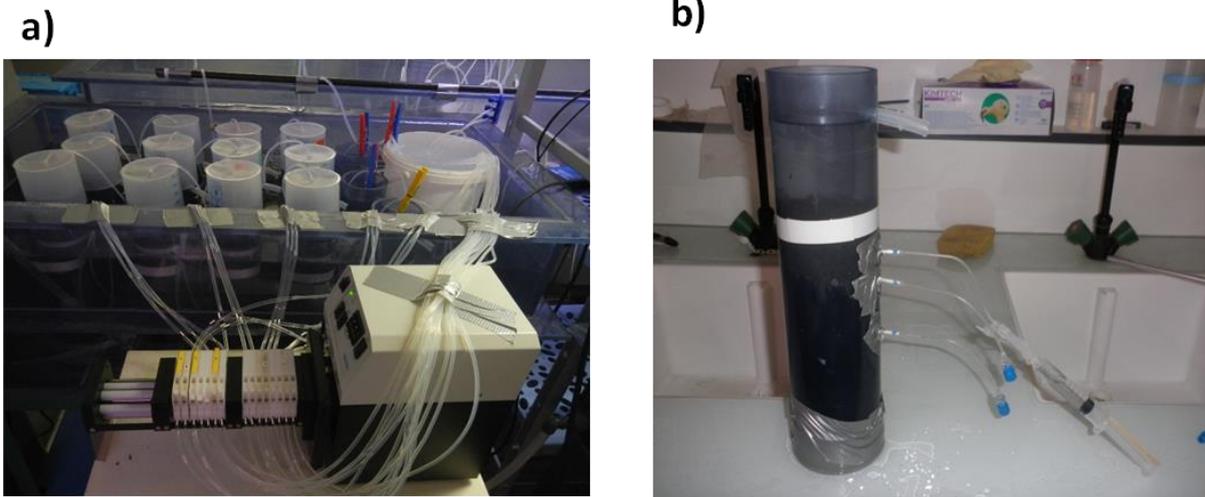
Dans les expérimentations E2 et E3, les sédiments ont été échantillonnés avant leur mise en aquarium (T0) et à T1. Les organismes ont été échantillonnés à T0 et à chaque temps (T1, T2, T3, T4 et dans les témoins). L'eau de surface a été échantillonnée à chaque temps (T1, T2, T3, T4 et dans les témoins) et l'eau interstitielle à T1 et dans les témoins. Pour l'expérimentation E1, les sédiments et les organismes ont été échantillonnés à T0, Tfinal et à dans les témoins. Les eaux de surface et interstitielle ont été échantillonnées à Tfinal et dans les témoins.

A chaque temps, avant (excepté pour la survie) et pendant les tests, pour chaque expérimentation, la survie, la taille et le poids sur 4 lots de 10 chironomes ont été réalisés.

#### **4.1.3 Cinétiques d'accumulation et d'élimination des PFASs à partir de sédiment naturel non déstructuré au laboratoire (carotte de sédiment, Chapitre 6)**

##### 4.1.4.1 Mise en place du système d'exposition

Après leurs collectes, les carottes de sédiments ont été placées dans un bain-thermostaté à 21°C, correspondant à la température d'exposition des organismes, pendant une semaine. Des systèmes de cages ont été placés au dessus des carottes afin de pouvoir récupérer les organismes autochtones émergents (Figure 13a). Trois systèmes d'exposition ont été utilisés pour les témoins. Pour cela de la silice a été ajoutée jusqu'à une hauteur de 22 cm dans chaque système. Et afin de récupérer de l'eau interstitielle, 3 systèmes Rhizon® ont été ajoutés à trois carottes de sédiments et aux trois carottes témoins à -2 cm, -4.5 cm et à -9.5 cm (Figure 13b).



**Figure 13:** Système d'exposition des chironomes à des carottes de sédiments, a) système d'exposition et b) système Rhizon® sur une carotte.

1200 larves de chironome de stade 4 (7 jours post-éclosion) sont ajoutées à 12 carottes de sédiments (100 larves par carotte). En parallèle, 300 larves sont ajoutées à 3 carottes de silice (100 larves par carotte : témoins). Les chironomes sont exposés à 21°C, l'eau de surface est continuellement renouvelée (4 fois par jour) grâce à l'utilisation d'une pompe péristaltique afin de maintenir une qualité de l'eau et une oxygénation adéquate, avec une photopériode de 16 :8h jour : nuit pendant l'expérimentation. Les paramètres garantissant une bonne qualité de l'eau ( $\text{NH}_4^+$ ,  $\text{NO}_2^-$ , pH, température et conductivité) sont mesurés en début et fin d'exposition. Les larves sont nourries *ad libitum* avec 1mg de Tetramin® par jour et par organisme. Deux cinétiques sont réalisées, une d'accumulation (E1) où les organismes sont sacrifiés au bout de 2 (T1), 3 (T2) et 4 (T3) jours d'accumulation, 2 carottes de sédiments contenant chacune 100 organismes sont sacrifiées par temps d'échantillonnage. Et une autre cinétique d'élimination (E2), après deux jours d'exposition, les organismes présents dans 6 carottes de sédiments sont transférés dans 3 aquariums de silice (environ 200 larves par aquarium). Les organismes sont alors sacrifiés après 6 (Ta), 18 (Tb) et 42 (Tc) heures de déuration. Les organismes témoins sont sacrifiés 4 jours après leur introduction dans les carottes de silice (Te) (Figure 14).

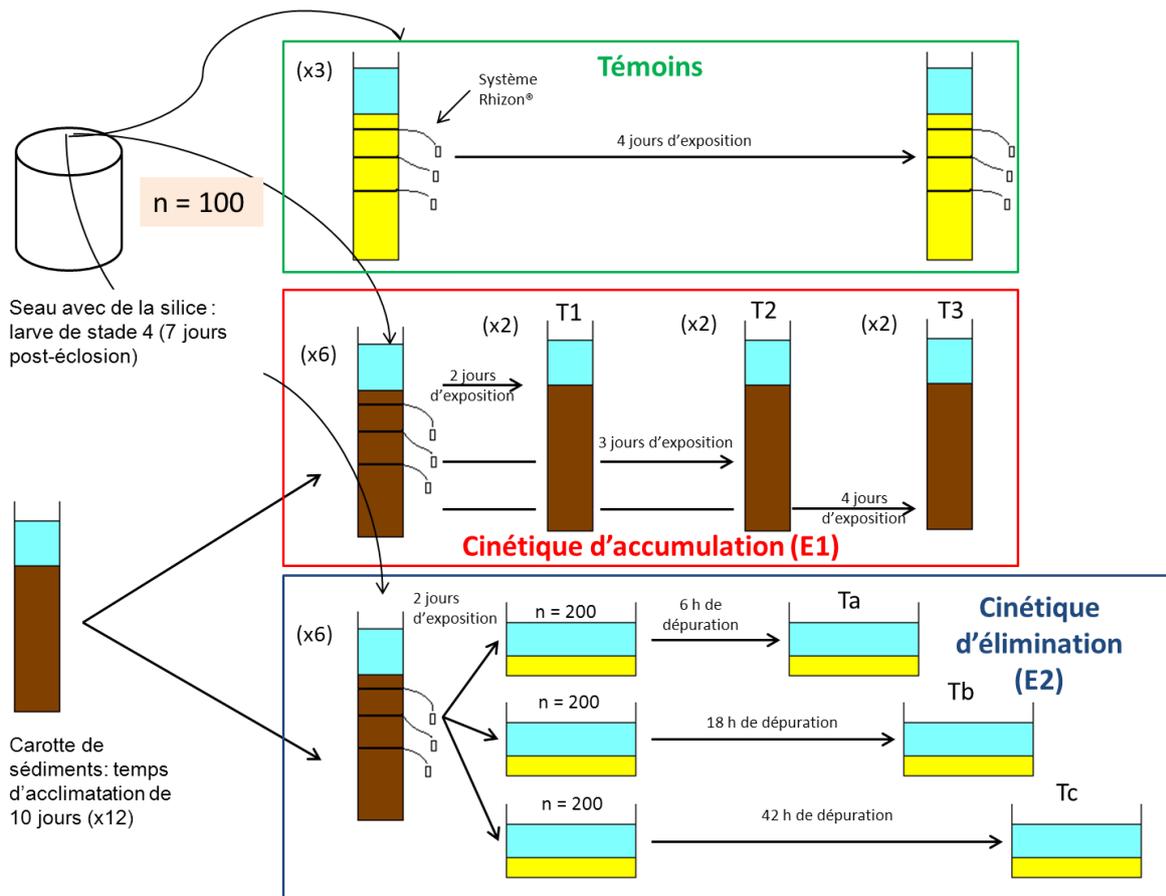


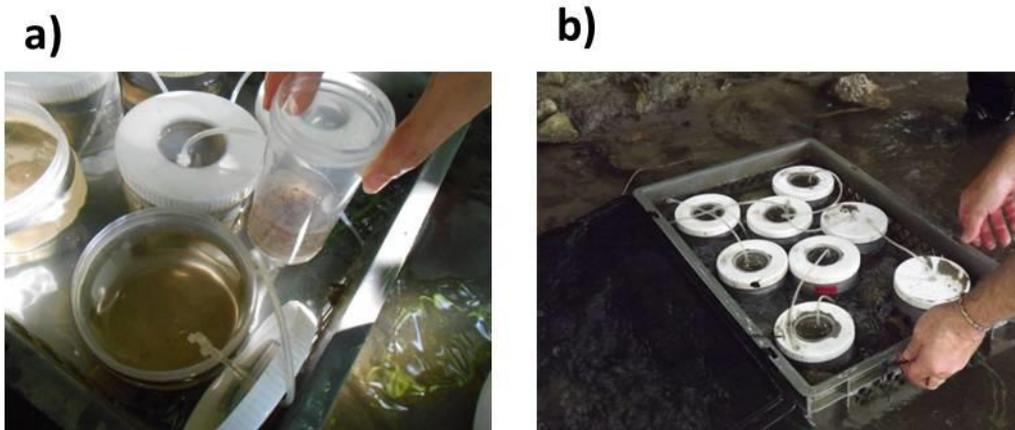
Figure 14: Design expérimental des chironomes exposés à des carottes de sédiments.

#### 4.1.4.2 Echantillonnage, mesure des traits de vie

L'eau de surface est échantillonnée à chaque temps (pour chaque cinétique et pour les témoins, tandis que l'eau interstitielle n'est échantillonnée qu'au temps T1 de la cinétique d'accumulation et 4 jours après l'introduction des chironomes dans les carottes de silice (à Te). Une carotte de sédiments, au moment de la mise en place des systèmes d'exposition (T0) a été découpée en 6 couches (0-0.5 cm, 0.5-2 cm, 2-3.5 cm, 3.5-5 cm, 5-6.5 cm et 6.5-8 cm) ainsi qu'une carotte au temps T3. Puis les sédiments de surface ont été récupérés à T1 et T2. Afin de suivre l'évolution de la croissance des chironomes pendant l'expérimentation, les organismes sont photographiés et pesés par groupe de 10 (4x) à chaque temps d'échantillonnage, dans les témoins et au début de l'expérimentation. La survie est également notée à chaque temps d'échantillonnage et dans les témoins.

#### 4.1.5 Encagement d'organismes sur le terrain (Chapitre 6)

Deux campagnes d'encagement de chironomes sur le terrain ont été réalisées en 2013, une au mois de juin et une autre au mois d'octobre. A chaque campagne, 8 cages ont été préparées avec un fond de silice. 100 chironomes en début de stade 4 (7 jours post-éclosion) ont été ajoutés dans chaque cage. Les cages ont ensuite été placées dans une caisse lestée (avec des pierres) puis plongée dans l'eau du site de l'île du Beurre et solidement accrochées (Figure 15). Le temps d'exposition des organismes est fonction de la température du site. Pour la campagne du mois de juin, la température a été de  $17.2 \pm 1.3^{\circ}\text{C}$ , tandis que pour celle du mois d'octobre la température a été de  $18.2 \pm 0.9^{\circ}\text{C}$ , les durées d'exposition des organismes ont été ajustées d'après la relation existant entre la température et la croissance des organismes (Péry and Garric, 2006) (4 jours pour les deux campagnes). Les chironomes ont été nourris pendant l'exposition à l'aide d'une seringue et d'une solution de Tetramin® à 100g/L. 2 mL de cette solution ont été introduits dans chaque cage lors de leur pose sur site, puis deux jours après leur pose. L'eau du site a été prélevée dans des flacons en polyéthylène (PE) lors de la deuxième campagne afin d'y doser les PFASs. La taille et le poids des organismes ont été mesurés avant et après l'exposition sur le terrain par lot de 15 organismes (x2). Un lot de 400 larves de chironomes a servi de point de référence (T0) pour les analyses de PFASs et des isotopes du  $^{13}\text{C}$  et de  $^{15}\text{N}$ . Les organismes à Tfinal (au moment du retrait des cages) ont également été conditionnés pour le dosage des PFASs et des isotopes du  $^{13}\text{C}$  et de  $^{15}\text{N}$ .



**Figure 15 : Systèmes d'encagement des chironomes sur le terrain : a) mis en place des chironomes dans le système et b) cages fermées avec leurs tubes flexibles permettant le nourrissage des organismes**

## 4.2 Gammare

### 4.2.1 Recherche d'une population de gammare non impactée par la contamination en PFASs

Afin de pouvoir réaliser des cinétiques d'accumulation et d'élimination des PFASs chez le gammare, il a été nécessaire de trouver une population de gammare non impactée par la contamination en PFASs. Pour cela 5 sites ont été prospectés, le site de Bourgoin-Jallieu, de la Tour du Pin, de Varèze, de Galaveyson et de La Mouge (Figure 16). Sur chaque site des gammare ont été prélevés et 3 lots de 40 gammare mâles ont été conditionnés en flacon, cryogénéisé puis stockés à -21°C. Les PFASs ont ensuite été analysés. La population qui a été retenue pour les expérimentations est celle de La Mouge.

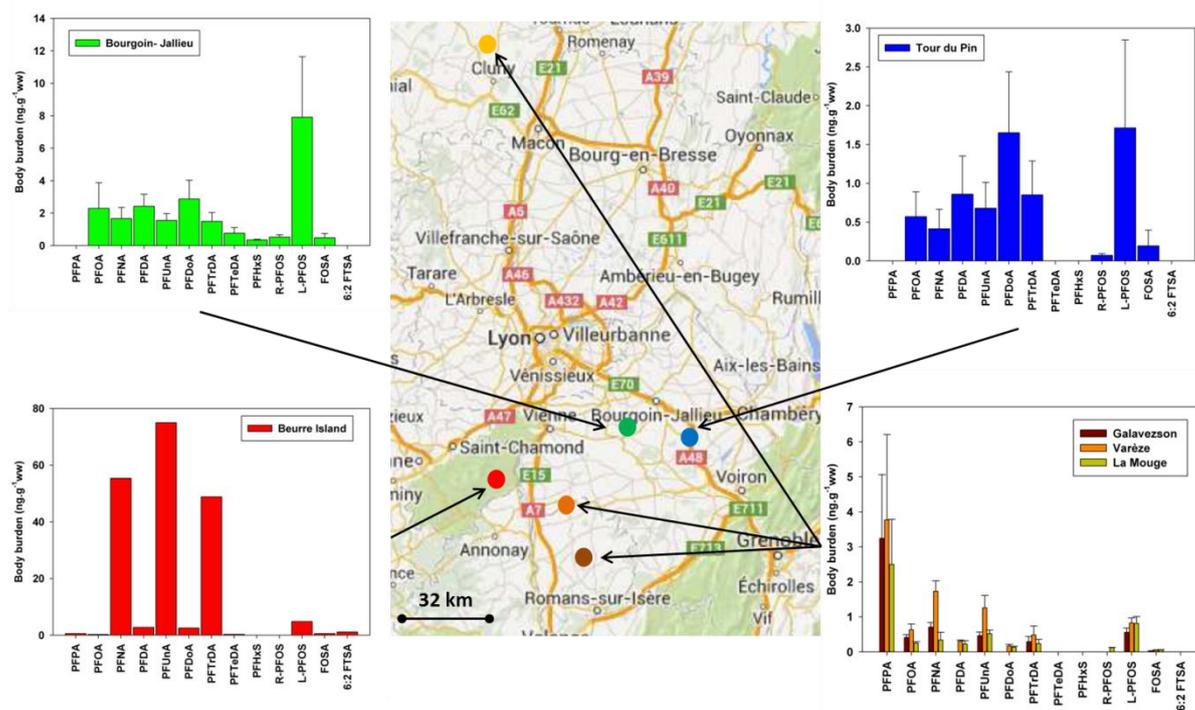


Figure 16: Résultats de la prospection d'une population de gammare non impacté par la contamination en PFASs

### 4.2.2 Cinétique d'accumulation et d'élimination des PFASs à partir de sédiment naturel (Chapitre 5)

#### 4.2.1.1 Mise en place du système d'exposition

Des gammares provenant de la rivière, La Mouge (N46°50'97.2"E4°75'63.9") ont été prélevés et exposés à des sédiments naturels à 12°C au laboratoire. Pour cela, deux expérimentations ont été conduites, la première (E1) consiste en une cinétique d'accumulation des PFASs et la seconde (E2) en une cinétique d'élimination.

Pour E1, 450 individus mâles de taille homogène (environ 10 mm) ont été ajoutés dans 9 aquariums contenant du sédiment homogénéisé à raison de 50 gammares par aquarium. 150 gammares ont été placés dans 3 aquariums témoins ne contenant que de l'eau à raison de 50 gammares par aquarium. Les organismes ont été sacrifiés au bout de 7 jours (T1), 15 jours (T2) et 21 jours (T3) d'exposition (Figure 17 et 18).

Pour E2, 450 organismes ont été placés dans 3 aquariums contenant du sédiment à raison de 150 gammares par aquarium. Après 3 semaines d'exposition, les organismes ont été transférés dans 3 aquariums contenant uniquement de l'eau. Les organismes ont été sacrifiés au bout de 7 jours (Ta), 15 jours (Tb) et 21 jours (Tc) de dépuration (Figure 17 et 18).

Pour chaque expérimentation, l'eau de surface est en renouvellement continu (4 fois par jour), sous constante aération avec une photopériode de 16 :8h jour : nuit. Les organismes sont nourris *ad libitum* avec des feuilles d'aulnes (*Alnus glutinosa*) préalablement conditionnées afin qu'un biofilm microbien s'y soit développé. Les paramètres de qualité de l'eau (pH, température, teneur en oxygène dissous, conductivité,  $\text{NO}_2^-$  et  $\text{NH}_4^+$ ) ont été mesurés une fois par semaine durant les deux expérimentations.

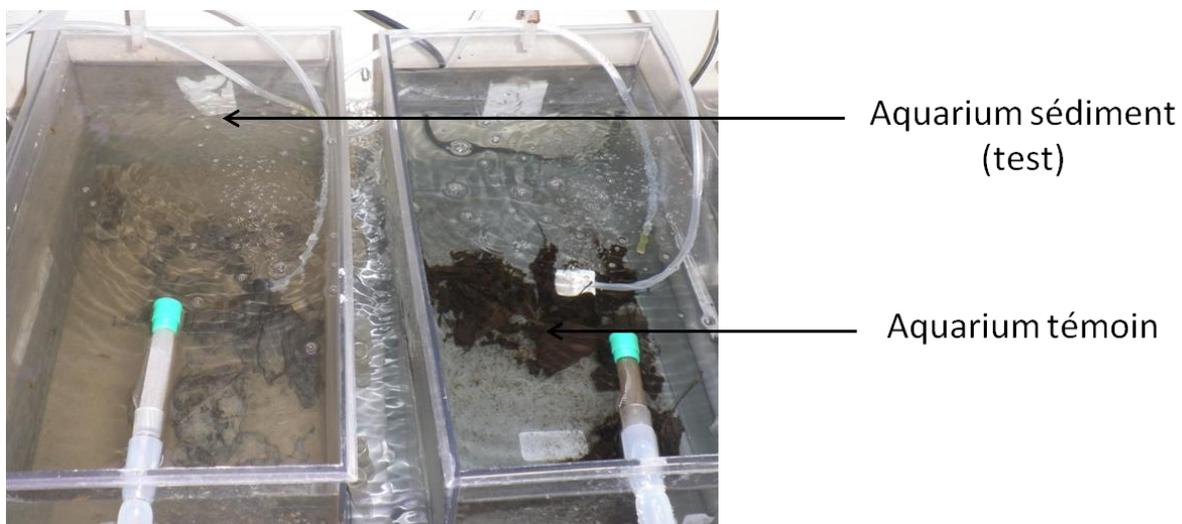
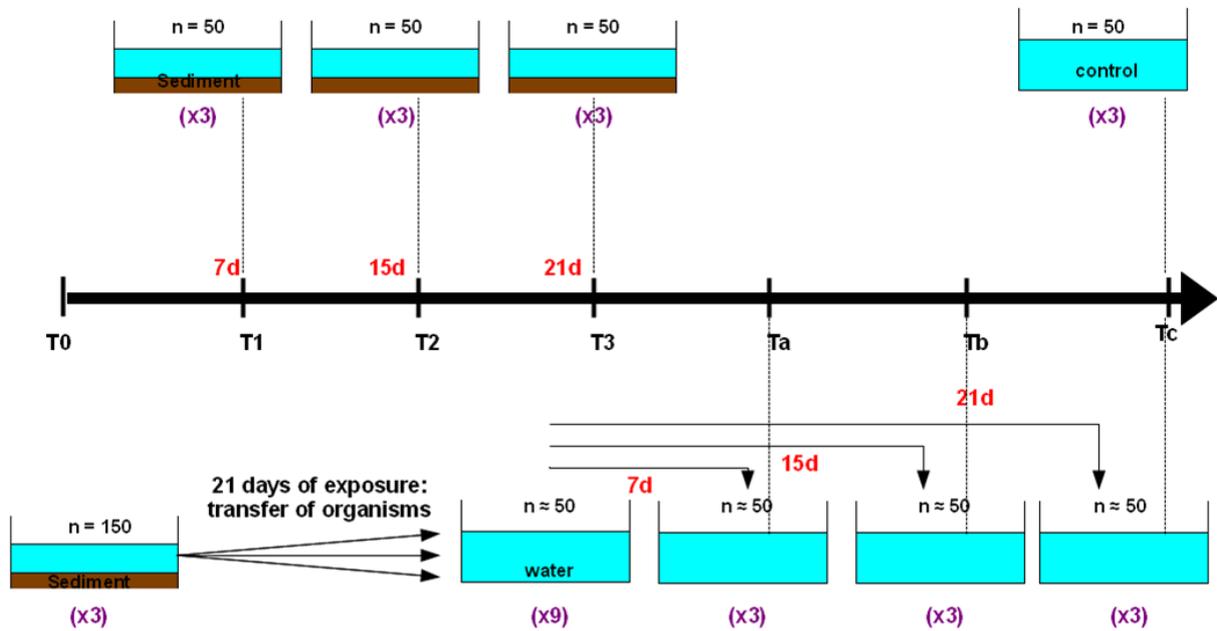


Figure 17: Photographie des aquariums sédiment et témoin utilisés pour l'exposition des gammares

E1: Accumulation kinetics



E2: Elimination kinetics

**Figure 18: Design expérimental des cinétiques d'accumulation (E1) et d'élimination (E2) des PFASs par les gammares**

4.2.1.2 *Echantillonnage, mesure des traits de vie*

L'eau de surface a été échantillonnée à tous les temps (T1, T2, T3, Ta, Tb et Tc) et dans les aquariums témoins, de la même manière que pour les expérimentations avec les chironomes. Il en est de même pour l'échantillonnage du sédiment et de l'eau interstitielle. L'eau interstitielle a été échantillonnée durant l'expérimentation E1 à T1, T2, T3. Les sédiments ont été récoltés avant l'exposition des organismes (T0), et à T1, T2 et T3. Les feuilles et les organismes ont été récupérés à T0, T1, T2, T3, Ta, Tb, Tc et dans les témoins. Avant leur mise en flaconnage les feuilles ont été rincées avec de l'eau. Les gammars ont été cryogénisés à l'azote liquide puis stockés à -21°C, les autres échantillons ont également été stockés à -21°C. Les PFASs ont été dosés dans tous les échantillons, le dosage des protéines totales et des lipides totaux s'est fait dans les organismes. Et le dosage des isotopes du <sup>13</sup>C et du <sup>15</sup>N a été réalisé dans les feuilles, les organismes et le sédiment.

Les gammes ne grandissent pas durant les expérimentations, seule la taille avant l'exposition des organismes et la survie à chaque temps ont été relevées. La taille a été mesurée de la même manière que celle des chironomes par photographie de 4 lots de 10 organismes.

## 5 Préparation des échantillons et analyse des PFASs par LC-MS/MS

### 5.1 Principes de la méthode

#### 5.1.1 Solid Phase Extraction (SPE)

Les PFASs sont adsorbés sur une phase stationnaire tandis que les impuretés sont éliminées lors du rinçage des cartouches avec un solvant polaire. Les PFASs sont ensuite élués avec un solvant apolaire (Figure 20).

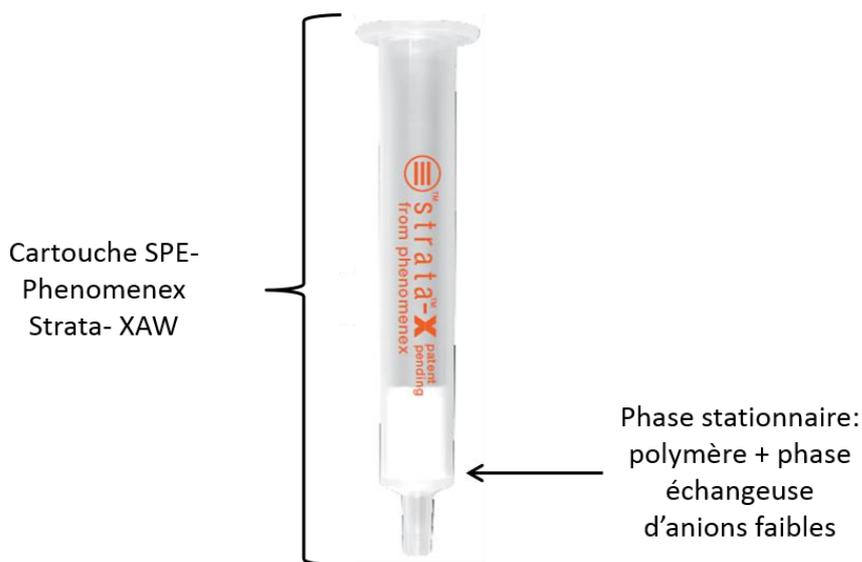


Figure 19: Cartouche SPE (Phenomenex Strata-XAW)

#### 5.1.2 LC-MS/MS

Le système LC-MS/MS est constitué d'un appareil de chromatographie liquide haute performance et d'un spectrophotomètre de masse en tandem (triple Quadripôle). La colonne de la chromatographie est remplie de billes de silice greffées d'une phase hydrophobe (C18)

constituant la phase stationnaire. La phase mobile (eau/ acétonitrile/ acétate d'ammonium) élue de manière graduelle les composés perfluorés. Une nébulisation de l'échantillon en électrospray (mode négatif) va alors former des gouttelettes chargées, évaporer le solvant puis exploser les gouttelettes, les composés passent alors sous forme gazeuse (formation d'ions). Les ions parents sont ensuite isolés en fonction du rapport masse sur charge ( $m/z$ ) par le premier quadripôle (Q1), le second (Q2), sert de cellule de collision où les ions vont alors se fragmenter à l'aide d'un gaz inerte qui entre en collision avec les ions, tandis que troisième (Q3), sélectionne une nouvelle fois les ions fragmentés en fonction de leurs rapport  $m/z$  (afin de pouvoir suivre plusieurs transitions) ; le signal est alors amplifié puis acquis.

### 5.1.3 Schéma général d'extraction et d'analyse des PFASs

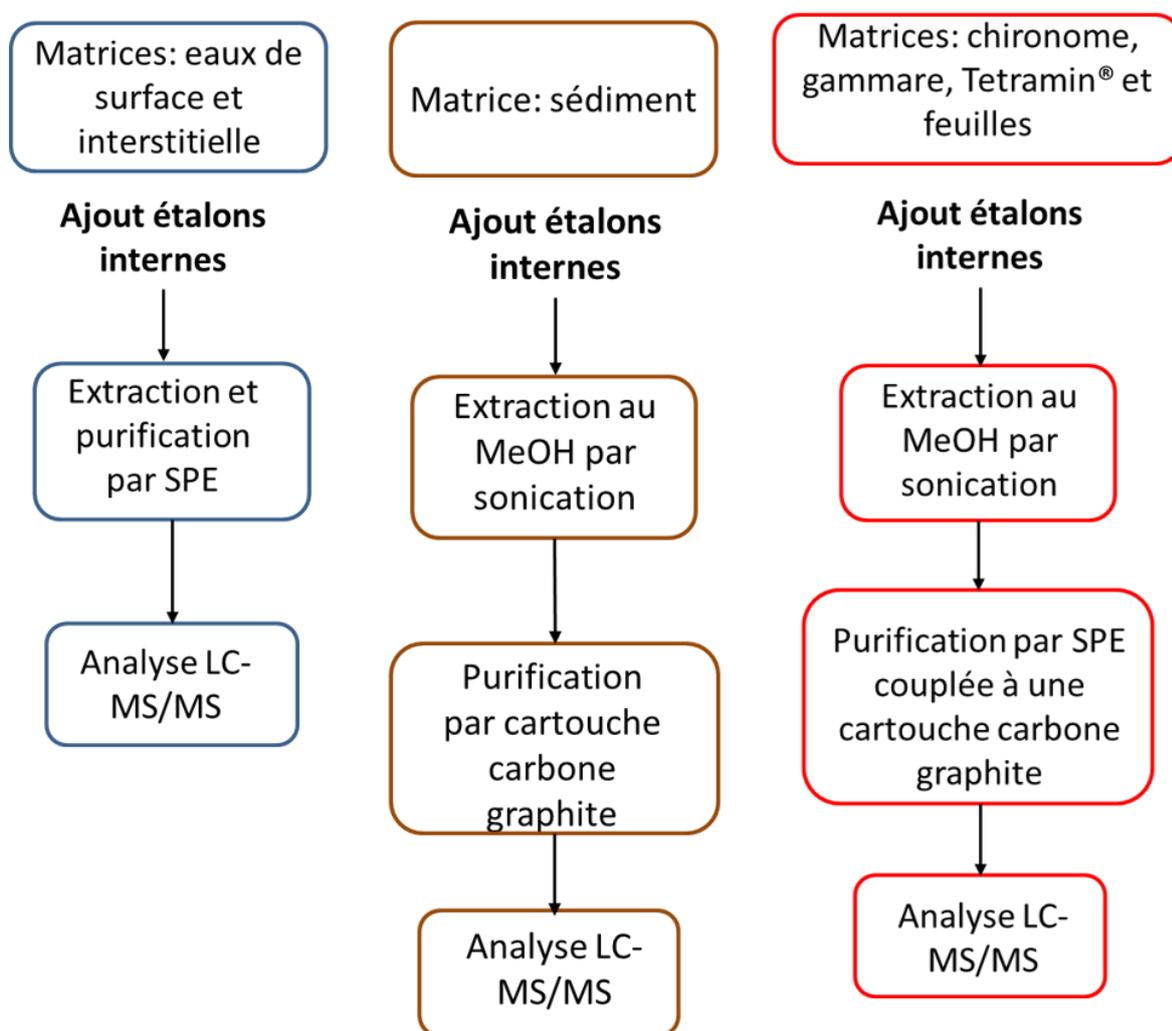


Figure 20: Préparation des échantillons avant leurs analyses par LC-MS/MS (développé par P. Labadie)

## 5.2 Extractions et purifications

Avant l'extraction et la purification de chaque type d'échantillons, des étalons internes permettant la quantification des molécules à doser, sont ajoutés aux échantillons. Ces étalons sont des PFASs qui ont été marqués soit au  $^{13}\text{C}$  soit au deutérium ( $^2\text{H}$  ou d) dont la quantité ajoutée est précisément connue (Tableau 2). En parallèle une gamme d'étalonnage a été réalisée avec des PFASs et leurs étalons internes associés.

**Tableau 2: Etalons internes associés à chaque molécule de PFASs dosés**

Composés	Acronymes	Nombre de carbone	Nombre de carbone fluoré	Etalons internes (ISs)	Acronymes des ISs
Acide perfluorobutanoïque	PFBA	4	3	[1,2- <sup>13</sup> C <sub>2</sub> ] PFHxA	MPFHxA
Acide perfluoropentanoïque	PFPA	5	4	[1,2- <sup>13</sup> C <sub>2</sub> ] PFHxA	MPFHxA
Acide perfluorohexanoïque	PFHxA	6	5	[1,2- <sup>13</sup> C <sub>2</sub> ] PFHxA	MPFHxA
Acide perfluoroheptanoïque	PFHpA	7	6	[1,2,3,4- <sup>13</sup> C <sub>4</sub> ] PFOA	MPFOA
Acide perfluoroheptanoïque	PFOA	8	7	[1,2,3,4- <sup>13</sup> C <sub>4</sub> ] PFOA	MPFOA
Acide perfluorononanoïque	PFNA	9	8	[1,2,3,4- <sup>13</sup> C <sub>4</sub> ] PFOA	MPFOA
Acide perfluorodécanoïque	PFDA	10	9	[1,2- <sup>13</sup> C <sub>2</sub> ] PFDA	MPFDA
Acide perfluoroundécanoïque	PFUnA	11	10	[1,2- <sup>13</sup> C <sub>2</sub> ] PFDA	MPFDA
Acide perfluorododécanoïque	PFDoA	12	11	[1,2- <sup>13</sup> C <sub>2</sub> ] PFDA	MPFDA
Acide perfluorotridécanoïque	PFTTrDA	13	12	[1,2- <sup>13</sup> C <sub>2</sub> ] PFDA	MPFDA
Acide perfluorotétradécanoïque	PFTeDA	14	13	[1,2- <sup>13</sup> C <sub>2</sub> ] PFDA	MPFDA
Acide perfluorobutane sulfonique	PFBS	4	3	[1,2,3,4- <sup>13</sup> C <sub>4</sub> ] PFOS	MPFOS
Acide perfluorohexane sulfonique	PFHxS	6	5	[1,2,3,4- <sup>13</sup> C <sub>4</sub> ] PFOS	MPFOS
Acide perfluoroheptane sulfonique	PFHpS	7	6	[1,2,3,4- <sup>13</sup> C <sub>4</sub> ] PFOS	MPFOS
Acide perfluorooctane sulfonique	PFOS	8	7	[1,2,3,4- <sup>13</sup> C <sub>4</sub> ] PFOS	MPFOS
Acide perfluorodécane sulfonique	PFDS	10	9	[1,2,3,4- <sup>13</sup> C <sub>4</sub> ] PFOS	MPFOS
N-Ethyl perfluorooctane sulfonamide	EtFOSA	8	7	d <sub>5</sub> -N-EtFOSA	MFOSA
N-Methyl perfluorooctane sulfonamide	MeFOSA	8	7	d <sub>3</sub> -N-MeFOSA	d-N-MeFOSA
Perfluorooctane sulfonamide	FOSA	8	7	[ <sup>13</sup> C <sub>8</sub> ] FOSA	d-N-FOSA
Acide N-Ethyl perfluorooctane sulfonamidoacétique	EtFOSAA	8	7	d <sub>5</sub> -N-EtFOSA	d-N-EtFOSA
Acide N-Methyl perfluorooctane sulfonamidoacétique	MeFOSAA	8	7	d <sub>3</sub> -N-MeFOSA	d-N-MeFOSA
Acide 6:2 Fluorotélomer sulfonique	6:2 FTSA	8	6	Sodium [1,2,3,4- <sup>13</sup> C <sub>4</sub> ] PFOS	MPFOS

## 5.2.1 Echantillons d'eau de surface et d'eau interstitielle

### 5.2.1.1 Conditionnement des cartouches SPE

Les échantillons d'eaux sont extraits et purifiés par SPE (Solid Phase Extraction, cartouches Strata X-AW). Pour cela, 12 cartouches préalablement étiquetées ont été placées sur une cuve SPE reliée à une pompe à vide (Figure 21). Les cartouches ont été conditionnées avant le passage des échantillons. Des flacons « poubelle » sont alors placés au fond de la cuve sous les cartouches puis deux fois 4 mL de méthanol (MeOH) contenant 0.2% d'hydroxyde d'ammonium (MeOH-NH<sub>4</sub>OH, 500 µL dans 250 mL de MeOH) et ensuite 4 mL d'eau ultra-pure passent au travers de chaque cartouche. Un morceau de coton préalablement nettoyé au méthanol a ensuite été placé au fond de chaque cartouche SPE afin d'empêcher l'obstruction des cartouches, puis 5 mL d'eau ultra-pure sont ajoutés dans les cartouches.

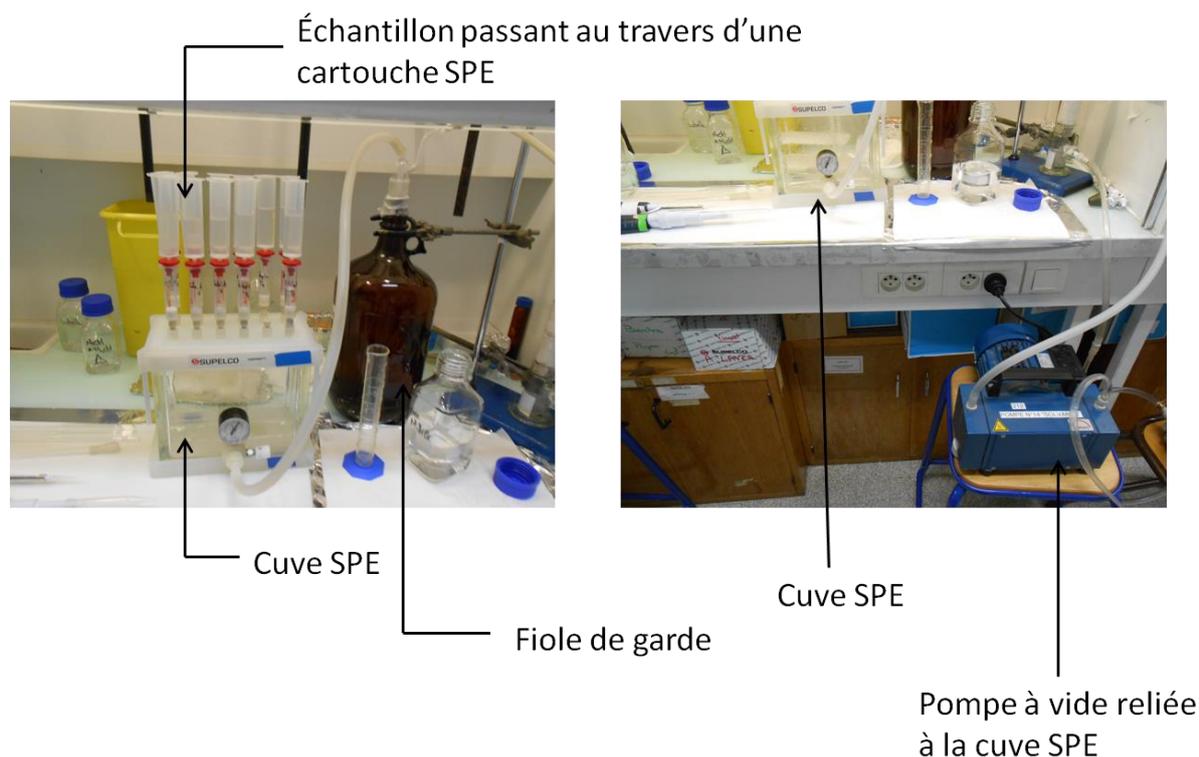


Figure 21: Description du matériel nécessaire aux extractions sur cartouches SPE

### 5.2.1.2 Passage des échantillons d'eau de surface

Des tuyaux en polyéthylène sont connectés, d'un côté, aux cartouches à l'aide de connecteurs placés sur les cartouches, et d'un autre côté, sont scotchés aux bouteilles d'1 L d'eau de surface (environ 800 mL). En parallèle, 2 échantillons de blancs par série de 10 échantillons, correspondant au passage de 500 mL d'eau de Vittel® sont réalisés afin de contrôler si la purification des échantillons n'apporte pas de PFASs aux échantillons. Le passage des échantillons se fait au goutte à goutte et dure environ 1h30 pour 800 mL d'eau de surface. A la fin du passage des échantillons, chaque flacon d'eau de surface a été rincé avec 5 mL d'eau ultra-pure. La fiole de garde est vidée, la cuve SPE est séchée avec du papier absorbant et les cartouches SPE sont également séchées sous vide pendant 30 à 40 min.

### 5.2.1.3 Passage des échantillons d'eau interstitielle

Le volume des échantillons d'eau interstitielle étant plus faible que celui des eaux de surface (environ 20 mL) des réservoirs sont placés sur les cartouches SPE à l'aide de connecteurs. Le volume total des échantillons est vidé dans les réservoirs. Les échantillons passent alors au goutte à goutte au travers des cartouches SPE. A la fin de leur passage, 5 mL d'eau ultra-pure sont ajoutés dans les réservoirs afin de les rincer. De la même manière que pour les échantillons d'eau de surface, la fiole de garde est vidée, la cuve SPE séchée et les cartouches SPE séchées sous vide pendant 30 à 40 min.

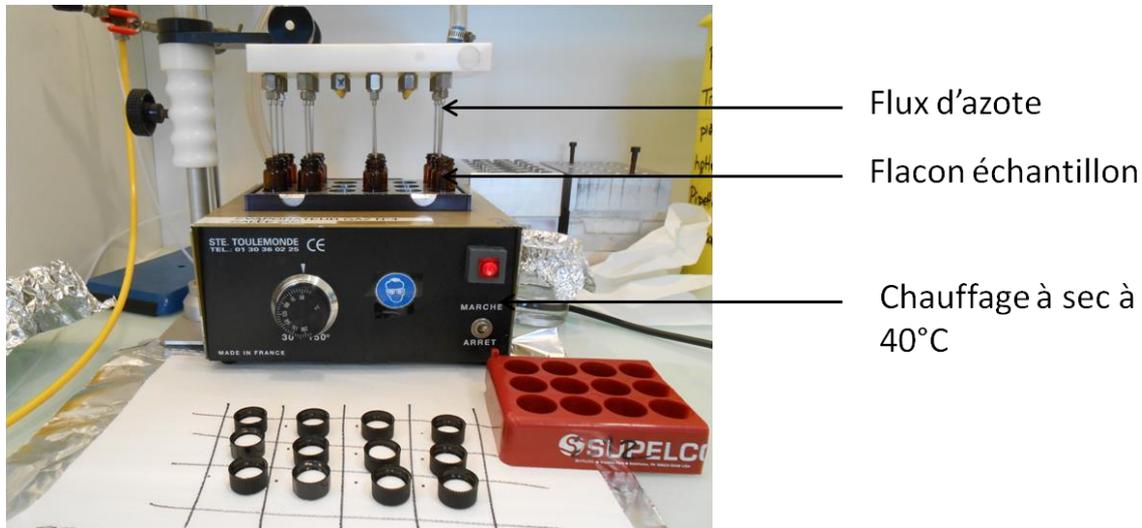
De même que pour les échantillons d'eau de surface, des blancs avec un volume de 50 mL d'eau de Vittel® ont été réalisés et ont suivi le même protocole de purification que les échantillons d'eau interstitielle.

### 5.2.1.4 Elution des PFASs

Après le séchage des cartouches SPE, les PFASs retenus dans les cartouches sont élués. Pour cela, des flacons de récupération des échantillons, préalablement étiquetés, sont placés dans le fond de la cuve. Deux fois 4 mL de MeOH-NH<sub>4</sub>OH passent au travers de chaque cartouche SPE et permettent l'éluion, à la fois des composés neutres et des composés acides.

### 5.2.1.5 Concentration des éluats

Le solvant contenu dans les flacons échantillons est évaporé sous flux d'azote à 40°C jusqu'à obtenir un volume d'environ 400  $\mu$ L (Figure 22).



**Figure 22:** Concentration des échantillons sous flux d'azote

### 5.2.1.6 Transfert des échantillons dans des vials à injection

Les échantillons sont transférés dans des vials à injection en polyéthylène par rinçage des flacons échantillons avec deux fois 100  $\mu$ L de MeOH. Les échantillons dans les vials sont alors reconcentrés jusqu'à 300  $\mu$ L.

## 5.2.2 Echantillons de sédiment

### 5.2.2.1 Extraction des échantillons de sédiment

L'extraction des sédiments se fait aux ultrasons suivant la méthode adaptée de Sun et al. (2011). Deux extractions successives ont lieu :

- pour la première : dans un flacon 5 mL de MeOH sont ajoutés à chaque échantillon de sédiment (1 g de sédiment sec et broyé), après 1 min de mélange au vortex, les flacons sont placés 20 min dans un bain aux ultrasons. Les flacons sont ensuite

centrifugés pendant 3 min à 20°C à 5000 rpm. Le surnageant est alors récupéré dans un flacon en verre.

- pour la deuxième : 2.5 mL de MeOH sont ajoutés au flacon contenant le culot de sédiment. Puis le même protocole que pour la première extraction est appliqué. Les surnageant sont alors récupérés dans le même flacon en verre que précédemment.

Les solvants sont alors évaporés sous flux d'azote à 40°C jusqu'à l'obtention d'un volume d'environ 800 µL.

De même que pour les échantillons d'eau de surface, des blancs ont été réalisés (flacon sans échantillons) et ont suivi le même protocole d'extraction que les sédiments.

#### *5.2.2.2 Purification des échantillons de sédiment*

La purification des échantillons de sédiments se réalise sur cartouche carbone graphite (Figure 23). Pour cela, comme les cartouches SPE, les cartouches carbone graphites (ENVI-Carb), placées sur une cuve SPE, sont conditionnées avant le passage des échantillons avec 4 mL de MeOH. Les flacons échantillons, préalablement étiquetés, sont placés au fond de la cuve SPE, puis les échantillons sont placés dans la cartouche carbone graphite à l'aide d'une pipette pasteur, les flacons sont rincés avec 2 fois 150 µL de MeOH. Le restant de PFASs est récupéré par le rinçage des cartouches carbone graphite avec 2 fois 4 mL de MeOH.

Les échantillons sont ensuite concentrés sous flux d'azote à 40°C jusqu'à 250- 300 µL puis transférés dans des vials à injection en polyéthylène avec du MeOH, puis reconcentrés jusqu'à 250- 300 µL.

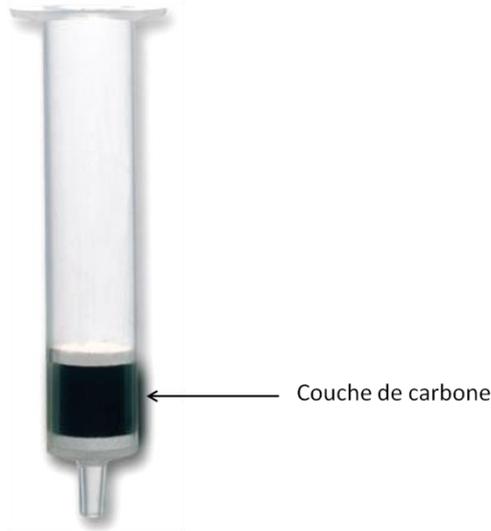


Figure 23: Cartouche carbone graphite ENVI-Carb (6cc, 250 mg)

### 5.2.3 Echantillons de biote, de Tetramin® et de feuilles d’aulnes

#### 5.2.3.1 Extraction des PFASs

L’extraction des PFASs pour les échantillons de biote, de nourriture commerciale Tetramin® et de feuilles d’aulnes suit le même protocole que pour les échantillons de sédiments. Les échantillons ont ensuite été concentrés dans un volume de 800  $\mu$ L sous flux d’azote à 40°C.

#### 5.2.3.2 Purification des échantillons

La purification des échantillons de biote, de Tetramin® et de feuilles s’est réalisée d’une manière différente de celle des sédiments. Au cours de ce travail de thèse deux techniques différentes d’élution ont été pratiquées.

Une partie de la méthode de purification est commune aux deux techniques : une cuve SPE avec 12 cartouches SPE est préparée. Après avoir conditionnées les cartouches avec 2 fois 4 mL de MeOH-NH<sub>4</sub>OH puis 4 mL d’eau ultrapure, les cartouches ont été remplies avec 5 mL d’eau ultrapure. Des connecteurs et des réservoirs ont été placés sur les cartouches SPE. 12 mL d’eau ultrapure ont été ajoutés dans les réservoirs, les échantillons ont ensuite été ajoutés à leur tour à l’aide d’une pipette pasteur, le flacon contenant l’échantillon a également

été rincé avec 2 fois 150  $\mu\text{L}$  de MeOH, enfin 12 mL d'eau ultrapure ont été ajoutés dans les réservoirs. Les mélanges eau/extrait passent à travers les cartouches SPE puis 5 mL d'eau ultrapure sont ajoutés pour rincer une dernière fois les réservoirs.

Afin de pouvoir réaliser la séparation en deux fractions des PFASs, 5 mL de tampon d'acétate de sodium ( $\text{pH} = 4.5$ ) sont passés au travers des cartouches SPE.

La fiole de garde est vidée, la cuve est séchée et les cartouches SPE sont séchées sous vide pendant 30 à 40 min.

#### *5.2.3.2.1 Méthode d'élution en deux fractions*

2 cartouches carbone graphite par échantillons sont conditionnées avec 4 mL de MeOH. Les cartouches SPE sont alors connectées à une première cartouche carbone graphite à l'aide d'un connecteur et des flacons de récupération des échantillons sont placés au fond de la cuve (Figure 24). La première fraction (fraction A) est éluée par le passage de 2 fois 4 mL de MeOH afin d'éluer les composés neutres (précurseurs). De nouveaux flacons de récupération des échantillons sont alors placés au fond de la cuve SPE, les mêmes cartouches SPE sont connectées à de nouvelles cartouches de carbone graphites et la deuxième fraction (Fraction B) est alors éluée. Cette fraction est éluée par le passage de 2 fois 4 mL de MeOH- $\text{NH}_4\text{OH}$  afin de récupérer les composés acides (PFCAs et PFSAs).

Les solvants sont évaporés sous flux d'azote à  $40^\circ\text{C}$  jusqu'à un volume de 300  $\mu\text{L}$  pour les fractions A et presque à sec pour les fractions B. Les fractions A sont alors transférées dans des vials à injection par rinçage des flacons avec 2 fois 100  $\mu\text{L}$  d'acétonitrile puis reconcentrées à 250-300  $\mu\text{L}$ . Les fractions B, sont transférées dans des tubes de type « eppendorf » contenant des filtres (préalablement nettoyés avec 500  $\mu\text{L}$  d'acétonitrile), les flacons contenant la fraction B sont rincés avec 100  $\mu\text{L}$  d'acétonitrile, puis 200  $\mu\text{L}$  d'eau ultrapure sont ajoutés. Les tubes sont alors centrifugés à 3000-3500 rpm, pendant 2 min à  $20^\circ\text{C}$ . Les filtrats sont récupérés et transférés dans des vials à injection en PE. Les solvants sont alors évaporés sous flux d'azote à  $40^\circ\text{C}$  jusqu'à un volume de 250-300  $\mu\text{L}$ .

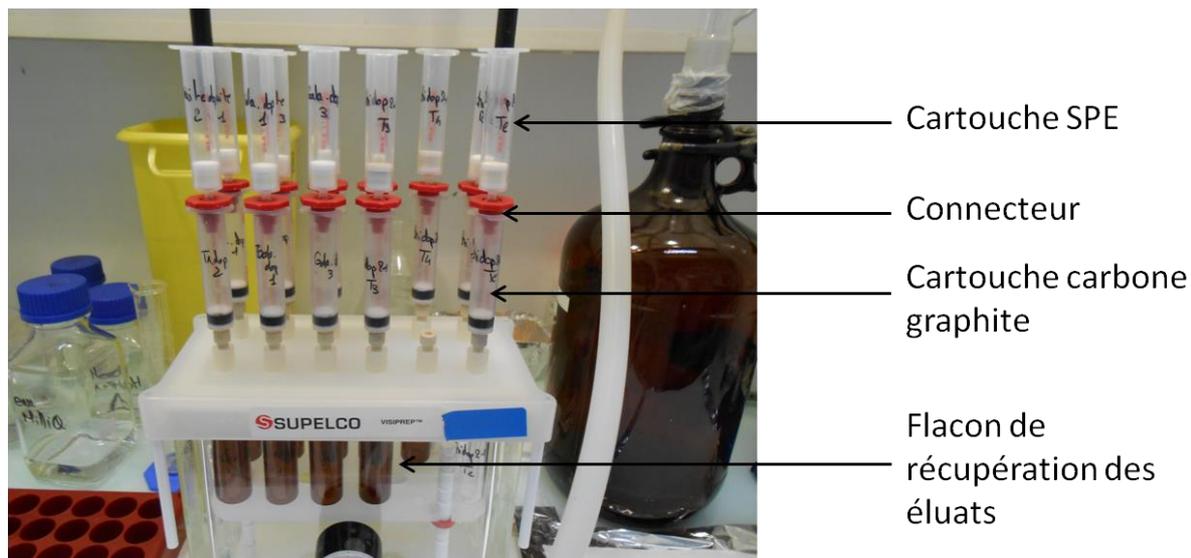


Figure 24: Purification des échantillons de biote, de Tetramin® et de feuilles

#### 5.2.3.2.2 Méthode d'élution en une seule fraction

Tous les PFASs sont élués dans une seule fraction. Pour cela, des cartouches carbone graphites sont conditionnées avec 4 mL de MeOH et connectées aux cartouches SPE. Des flacons de récupération des échantillons ont été placés dans le fond de la cuve et l'élution des composés se fait par le passage de 2 fois 4 mL de MeOH-NH<sub>4</sub>OH. Les solvants sont ensuite évaporés sous flux d'azote à 40°C jusqu'à 300 µL puis transférés dans des vials en PE avec des rinçages des flacons au MeOH (2 fois 100 µL). Lorsque cela a été nécessaire, lorsqu'un voile opaque était présent dans les échantillons lors de concentration (cas des échantillons de gammars), les échantillons sont alors transférés dans des tubes « eppendorf » avec filtre puis centrifugés de la même manière que pour la fraction B, mais en remplaçant l'acétonitrile par du MeOH, avant d'être transférés dans les vials.

### 5.3 Analyses par LC-MS/MS

Les analyses par LC-MS/MS ont été réalisées sur un système HPLC 1290 Infinity couplés à un spectromètre de masse 6460 ou 6490 (Triple quadrupole), les deux proviennent de chez Agilent Technologies (Massy, France).

Les analytes ont été séparés par une colonne C18 Agilent Zorbax Eclipse Plus (2.1 x 100 mm; dp = 1.8 µm). Le volume d'injection a été de 5 µL et les solvants utilisés pour les

phases mobiles étaient: une phase aqueuse composée d'eau ultrapure et d'acétate d'ammonium à  $2 \cdot 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$  (phase A) et une phase organique composée d'un mélange d'acétonitrile et d'eau ultrapure (95/5 en volume) et d'acétate d'ammonium à  $2 \cdot 10^{-3} \text{ mol.L}^{-1}$  (phase B). La séparation a été réalisée à  $35^{\circ}\text{C}$  avec un débit de 0.5 mL suivant un gradient A/B : 80:20 pendant 0.6 min puis de 80:20 jusqu'à 17.5:72.5% en 8 min et enfin 0:100 pendant 2 minutes. A 11.5 min, B passe à 80 % pendant 0.5 min puis le système est rééquilibré pendant 3.5 min.

Le spectromètre de masse a opéré en nébulisation par électrospray en mode négatif, en utilisant le logiciel Agilent MassHunter. L'identification des analytes a été réalisée en comparant les temps de rétention avec ceux des étalons internes. Pour chaque analyte, le ratio entre la transition de quantification et la transition de confirmation ont été comparées avec celui d'un standard commercial (erreur admise de 25%). La quantification a été obtenue en calculant le coefficient de réponse de chaque analyte par rapport à celui de l'étalon interne et les concentrations ont été calculées à partir d'une régression linéaire (gamme d'étalonnage).

## 5.4 Contrôle qualité et performance de la méthode

### 5.4.1 Rendement de la méthode

Le rendement de la méthode est calculé à partir de matrice (eau de Vittel®, sédiment et truite dont la quantité de PFASs est connue) dopées avec les analytes dosés en quantité connue, en début de procédure d'extraction et de purification. Ainsi, après l'analyse de ces matrices dopées, un calcul de rendement (rdt) a pu être effectué (Eq. 2).

$$rdt (\%) = \frac{m \text{ PFASs mesurée (ng)}}{m \text{ PFASs ajoutée (ng)}} \times 100 \quad \text{Eq. (2)}$$

### 5.4.2 Limites de détection et de quantification

Les limites de détection (LD) et de quantification (LQ) sont tout d'abord calculées d'une part à partir des substances déterminées dans les blancs et d'autre part à partir des matrices dopées. Pour les analytes présents dans les blancs, la LD est déterminée en

multipliant par 3 l'écart type des concentrations déterminées dans les blancs et la LQ en multipliant par 10 ce même écart type. Pour les composés qui ne sont pas présents dans les blancs, la LD et la LQ sont calculées à partir du rapport signal sur bruit (S/N) des matrices dopées (Eq. 3 et 4).

$$LD \text{ (ng. g}^{-1}\text{ poids frais)} = \frac{C \text{ ajoutée} \times 3}{S/N} \quad \text{Eq. (3)}$$

$$LQ \text{ (ng. g}^{-1}\text{ poids frais)} = \frac{C \text{ ajoutée} \times 9}{S/N} \quad \text{Eq. (4)}$$

Lorsque les LD et les LQ étaient plus élevées à partir des matrices dopées qu'à partir des blancs, nous avons choisi de prendre la valeur la plus élevée.

### 5.4.3 Matériel de référence

Une matrice SRM 1947, obtenue en cours de thèse, a été utilisée pour une partie des dosages de PFASs effectués (Chapitre 4, 5 et 6). Cette matrice de référence est un tissu de poisson du lac du Michigan dont les niveaux de PFASs dosés avec notre méthode sont comparés avec les valeurs du NIST (Reiner et al., 2012).

## 6 Dosages biochimiques

### 6.1 Dosage des protéines totales

Le dosage des protéines totales a été réalisé en utilisant la méthode de Lowry (Lowry et al., 1951). Il s'agit d'un dosage colorimétrique. Des homogénats de chaque organisme ont été réalisés. Pour les chironomes, chaque échantillon a été broyé dans du tampon phosphate (0.1M, pH = 7.8) avec un ratio en volume de 1 mg de chironome pour 50  $\mu$ L de tampon à l'aide d'un broyeur à bille. Pour les gammare, chaque échantillon a été broyé également dans du tampon phosphate (0.1 M, pH = 7.8) avec un ratio en volume de 1 mg de gammare pour 10  $\mu$ L de tampon à l'aide d'un broyeur à bille. Les homogénats ont ensuite été centrifugés pendant 15 min à 9000g à 4°C. Le surnageant a été récupéré puis dilué au  $\frac{1}{4}$  dans de l'eau ultra pure. Une gamme d'étalonnage avec de la sérum albumine bovine (BSA) a été réalisée à partir d'une solution mère à 0.3 g.L<sup>-1</sup> (0.3, 0.15, 0.075, 0.038 et 0.019 g.L<sup>-1</sup>).

Le dosage des protéines totales se réalise en microplaque (Grener 96), 100  $\mu\text{L}$  de solution étalon ou 10  $\mu\text{L}$  d'homogénat avec 90  $\mu\text{L}$  d'eau ultra-pure ont été inoculés dans les puits. Auquel 150  $\mu\text{L}$  de réactif de Lowry a été ajouté (40 mL d'eau ultra-pure dans un flacon de réactif). La plaque a été placée 20 min sous agitation puis 50  $\mu\text{L}$  de réactif de Folin a été ajouté dans chaque puits. Les puits ont été agités manuellement puis la plaque a été placée 10 min à l'obscurité. La densité optique a ensuite été mesurée à 690 nm à l'aide d'un Spectrofluorimètre SAFIRE® (TECAM®).

## 6.2 Dosage des lipides totaux

L'extraction des lipides totaux a été faite à partir de la méthode de Folck J. et al. (1957) et leurs dosages d'après une adaptation de la méthode de Van Handel (1985). Il s'agit d'un dosage colorimétrique. Des homogénats de chaque organisme ont été réalisés. Environ 100 mg de chironomes ont été broyés dans 1 mL de tampon phosphate (0.1M, pH = 7.8) à l'aide d'un broyeur à bille. Pour les gammarés, environ 30 mg d'organismes ont été broyés dans 300  $\mu\text{L}$  de tampon phosphate (0.1M, pH = 7.8). L'extraction des lipides totaux s'est faite en prélevant 60  $\mu\text{L}$  d'homogénat, en y ajoutant 30  $\mu\text{L}$  d'une solution de chlorure de potassium (KCl) à 8.8  $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  et 510  $\mu\text{L}$  d'une solution d'extraction chloroforme-méthanol (2 :1 v/v) contenant du BHT (2,6-di-tert-butyl-4- méthylphénol) à 0.45 mM afin de protéger les lipides de l'oxydation. Après une centrifugation (à 3000g, pendant 5 min, à 4°C) du mélange, 100  $\mu\text{L}$  du surnageant ont été prélevés et transvasés dans un tube en pyrex de 5 mL. Ensuite une extraction acide à chaud est réalisée. Pour cela, l'échantillon contenu dans le tube en pyrex est chauffé à 95°C dans un bain à sec. Puis une fois que les solvants ont été complètement évaporés, 200  $\mu\text{L}$  d'acide sulfurique ont été ajoutés et chauffés pendant 10 min. Après refroidissement des tubes, 4.8 mL de réactif phospho-vanilline (960 mg de vanilline + 160 mL d'éthanol + 640 mL d'acide phosphorique à 85%). Le contenu a été mélangé au vortex, puis après 10 min d'attente, le temps que la couleur se développe, la lecture au spectrophotomètre s'est faite (stabilité de la couleur de 30 min). Pour cela, une microplaque (Grener 96) est remplie avec 250  $\mu\text{L}$  d'échantillon par puits. En parallèle une gamme d'étalonnage à partir d'une solution de cholestérol à 1600  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  a été réalisée (0, 100, 200, 400, 800 et 1600  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ) et a suivi le même protocole que celui des échantillons. La lecture au spectrophotomètre s'est faite à 535 nm contre un blanc réactif (Spectrofluorimètre SAFIRE®,TECAM®).

## 7 Analyses isotopiques du $\delta^{13}\text{C}$ et du $\delta^{15}\text{N}$

Afin d'effectuer l'analyse des isotopes du  $^{13}\text{C}$  et de  $^{15}\text{N}$  sur les sédiments, ces derniers ont dû subir une décarbonatation. En effet, le signal des carbonates dans les sédiments fausse fortement celui des isotopes du  $^{13}\text{C}$ . Pour cela, 80 mg de sédiment et 7 mL d'acide chlorhydrique (HCl) à 1M ont été introduits dans un tube à centrifuger puis laissés à température ambiante pendant 6h. Le mélange a ensuite été centrifugé à 4000t/min, le surnageant éliminé, puis le mélange rincé au minimum 3 fois à l'eau ultra-pure afin que le pH redescende à 4-5. Le culot, ne contenant plus que la matière organique, a été lyophilisé.

Dans la première partie de la thèse, les échantillons de sédiments décarbonatés, de biote, de nourriture (feuille et Tetramin®) ont été envoyés dans un laboratoire d'analyse (PTEF-pôle isotopie, INRA Nancy). Dans un deuxième temps les échantillons ont été analysés au LPTC à Bordeaux.

## 8 Analyses statistiques et modélisation

### 8.1 Traitements statistiques

Les traitements statistiques effectués sur les données obtenues au cours de ce travail de thèse ont été : test de la normalité et de l'homogénéité de la variance avec les tests Shapiro-Wilk et Bartlett, test t de Student et tests non paramétrique de Kruskal-wallis et de Mann-Witney. Ces tests ont été réalisés à partir du logiciel R (R Core Team, 2014).

### 8.2 Modélisation

La bioaccumulation est un processus d'absorption des substances dans le milieu par les organismes où le flux entrant (phase d'accumulation) est supérieur au flux sortant (phase de dépuración). Cette accumulation peut avoir lieu via l'eau par diffusion passive, mais également par un transport actif nécessitant la consommation d'énergie. La diffusion passive peut alors s'exprimer sous la forme d'une équation (Eq. 5) où  $C_{\text{org}}$  correspond à la concentration de la substance dans l'organisme,  $k_u$  la constante d'accumulation et  $C_{\text{eau}}$ , la concentration de la substance dans l'eau :

$$\frac{dC_{org}}{dt} = k_u \times C_{eau} \quad \text{Eq. 5}$$

L'accumulation de substances peut également avoir lieu via la nourriture. Des facteurs de bioaccumulation peuvent alors être décrits (Eq. 6 et 7):

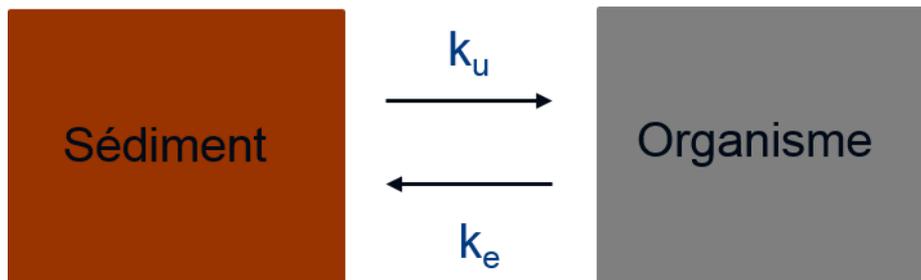
$$BAF = \frac{C_{org}}{C_{eau}} \quad \text{Eq. 6}$$

$$BSAF = \frac{C_{org}}{C_{sed}} \quad \text{Eq. 7}$$

Avec  $C_{sed}$ , la concentration de la substance dans les sédiments.

Afin de décrire la bioaccumulation, il existe un modèle de partition à deux compartiments (Landrum, 1989), modélisant les échanges de substances entre l'organisme et le compartiment via lequel ce dernier peut se contaminer (Eq. 8, Fig. 25) :

$$\frac{dC_{org}}{dt} = k_u \times C_{sed} - k_e \times C_{org} \quad \text{Eq. 8}$$



**Figure 25 : Illustration du modèle de partition à deux compartiments**

La constante d'élimination peut être déterminée de deux manières différentes, soit à partir de la phase d'accumulation (Eq. 9), soit à partir de la phase de dépuration (Eq. 10) (Fig. 26).

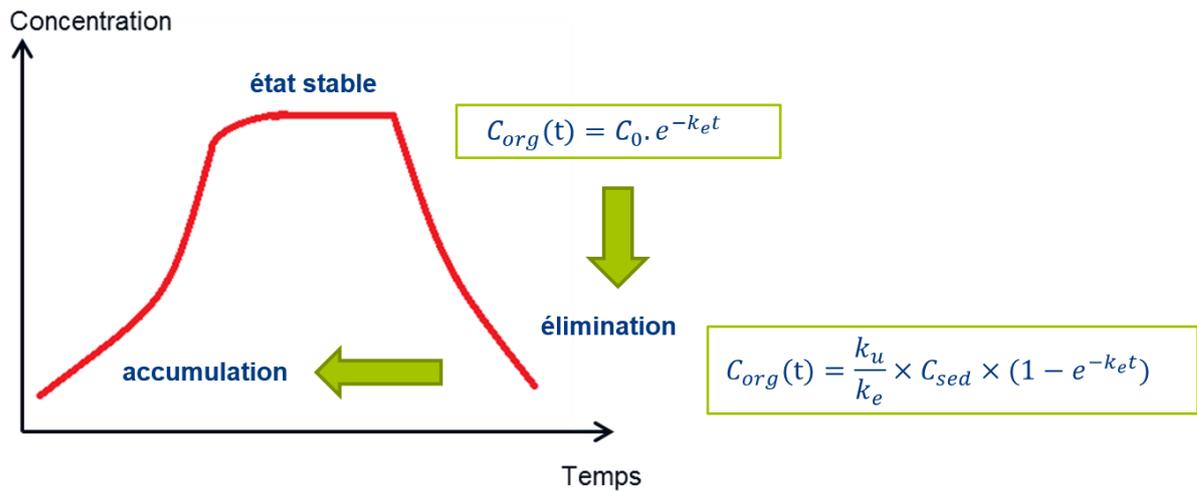


Fig. 26 : Schéma de cinétiques d'accumulation et d'élimination d'une substance par un organisme utilisant un modèle de partition à deux compartiments.

$$C_{org}(t) = \frac{k_u}{k_e} \times C_{sed} \times (1 - e^{-k_e t})$$

Eq. 9

$$C_{org}(t) = C_0 \cdot e^{-k_e t}$$

Eq. 10

Dans ce travail de thèse nous avons cherché à déterminer les constantes  $k_u$  et  $k_e$  chez le chironome (chapitre 3 et 4) et le gammare (chapitre 5) de manière simultanée par la méthode des moindres carrés. Cette méthode prend en compte les deux phases de la bioaccumulation (accumulation et élimination).

Les calculs des modèles et l'optimisation par les moindres carrés pondérés ont été réalisés avec le logiciel R (R Core Team, 2014).



## **Chapitre 3**

***Caractérisation du transfert des PFASs du  
sédiment au chironome : Cinétique  
d'accumulation***



## 1 Objectifs

Les objectifs de ce chapitre sont : (i) de déterminer la biodisponibilité des PFASs pour le chironome à partir d'un sédiment naturel, (ii) de décrire les cinétiques d'accumulation de ces composés et (iii) de comprendre quelles sont les voies de transfert de ces composés dans l'organisme.

## 2 Bioaccumulation of perfluoroalkyl compounds in midge (*Chironomus riparius*) larvae exposed to sediment (Publication 1)

### Résumé:

Les larves de chironome (*Chironomus riparius*) sont exposées à des sédiments provenant d'un site de déposition le long du Rhône, ce site est situé à l'aval d'une plateforme industrielle libérant de nombreux perfluorés dans le milieu naturel. Ces sédiments sont caractérisés par de hautes concentrations en acide perfluoroundécanoïque (PFUnA) et acide perfluorotridécanoïque (PFTrDA) et par de faibles concentrations en perfluorooctane sulfonate (PFOS). 23 composés perfluorés, incluant des acides carboxylate de C<sub>4</sub> à C<sub>14</sub>, des sulfonates de C<sub>4</sub> à C<sub>10</sub> et 7 précurseurs, sont analysés dans l'eau de surface, l'eau interstitielle, le sédiment et les larves. Les chironomes accumulent les acides carboxylates de C<sub>11</sub> à C<sub>14</sub>, le PFOS et deux précurseurs (le perfluorooctane sulfonamide : FOSA et le fluorotélomère acide 6 :2 sulfonique, 6 :2 FTSA). Ces substances sont principalement accumulées pendant le stade 4, qui correspond à une phase de croissance rapide. L'accumulation du 6 :2 FTSA, du PFUnA et du PFOS se fait par voie trophique et tégumentaire. Les autres composés sont principalement accumulés par la nourriture. Les cinétiques d'accumulations suivent un modèle exponentiel de partition, à partir duquel des constantes d'accumulation et d'élimination sont déterminées.

**Mots clés :** Composés perfluorés, Sédiment, *Chironomus riparius*, Bioaccumulation.

**Bioaccumulation of perfluoroalkyl compounds in midge (*Chironomus riparius*) larvae exposed to sediment**

Delphine Bertin<sup>1\*</sup>, Benoît J.D. Ferrari<sup>1,4</sup>, Pierre Labadie<sup>2</sup>, Alexandre Sapin<sup>1</sup>, Jeanne Garric<sup>1</sup>,  
Hélène Budzinski<sup>2</sup>, Magali Houde<sup>3</sup>, Marc Babut<sup>1</sup>.

<sup>1</sup> Present address: IRSTEA, UR MALY, 5 rue de la Doua, CS 70077, F- 69626 Villeurbanne, France.

E-mail address : [delphine.bertin@irstea.fr](mailto:delphine.bertin@irstea.fr); [benoit.ferrari@irstea.fr](mailto:benoit.ferrari@irstea.fr); [alexandre.sapin@irstea.fr](mailto:alexandre.sapin@irstea.fr);  
[jeanne.garric@irstea.fr](mailto:jeanne.garric@irstea.fr); [marc.babut@irstea.fr](mailto:marc.babut@irstea.fr)

<sup>2</sup> : Université Bordeaux 1, Environnements et Paléoenvironnements Océaniques et Continentaux (EPOC), UMR 5805 CNRS, Laboratoire de Physico- et Toxicochimie de l'environnement (LPTC), 351 cours de la Libération, 33405 Talence, France.

E-mail address : [pierre.labadie@u-bordeaux1.fr](mailto:pierre.labadie@u-bordeaux1.fr); [h.budzinski@epoc.u-bordeaux1.fr](mailto:h.budzinski@epoc.u-bordeaux1.fr)

<sup>3</sup> : Environment Canada, Aquatic Contaminant Research Division, 105 rue McGill, Montreal, QC, H2Y 2E7, Canada.

E-mail address : [Magali.Houde@ec.gc.ca](mailto:Magali.Houde@ec.gc.ca)

<sup>4</sup>: Present address: Centre Ecotox/Oekotoxzentrum, EPFL-ENAC-IIE-GE, Station 2 (GR B0 392), 1015 Lausanne, Suisse. [benoit.ferrari@centreecotox.ch](mailto:benoit.ferrari@centreecotox.ch)

\*Corresponding author: Delphine BERTIN, IRSTEA, UR MALY, 5 rue de la Doua, CS 70077, F-69626 Villeurbanne, France. [delphine.bertin@irstea.fr](mailto:delphine.bertin@irstea.fr), phone : +33 (0)4 72 20 10 75.

## Abstract

Midge larvae (*Chironomus riparius*) were exposed to sediments from a deposition sampled at a site along the Rhône River (France) downstream of an industrial site releasing various perfluorinated chemicals. This sediment is characterized by high concentrations of perfluoroundecanoic acid (PFUnA) and perfluorotridecanoic acid (PFTrDA) and a low perfluorooctane sulfonate (PFOS) concentration. Concentrations of 23 perfluoroalkyl compounds, including C<sub>4</sub>-C<sub>14</sub> carboxylate acids, C<sub>4</sub>-C<sub>10</sub> sulfonates, and seven precursors, were analyzed in overlying and pore water, sediment, and larvae. Midge larvae accumulated carboxylate acids (C<sub>11</sub>-C<sub>14</sub>), PFOS, and two precursors (perfluorooctane sulfonamide: FOSA and 6:2 fluorotelomer sulfonic acid, 6:2 FTSA). These substances accumulated mainly during the fourth instar larvae exponential growth phase. Accumulation of 6:2 FTSA, PFUnA, and PFOS occurred via trophic and tegumentary routes. Other compounds mainly accumulated from food. Kinetics followed a partition model, from which uptake and elimination constants were derived.

Keywords: Perfluoroalkyl compounds, sediment, *Chironomus riparius*, bioaccumulation.

**Capsule:** *Chironomus riparius* mainly bioaccumulates long-chain PFASs via trophic and/or tegumentary routes during the fourth instar larvae growth phase.

## 1. Introduction

Polyfluoroalkyl and perfluoroalkyl substances (PFASs) have been produced since the early 1950s. The production and use of these compounds have resulted in their global distribution in the environment (Houde et al., 2011; Houde et al., 2006; Prevedouros et al., 2006). In 2000, the 3M company voluntarily phased -out C<sub>8</sub>-based-chemicals (i.e., sulfonamide based polymers), at the base of the formation of perfluorooctane sulfonate (PFOS) and perfluorooctanoic acid (PFOA), and replaced them with shorter- chain chemicals (e.g., perfluorobutane sulfonate, PFBS) (Renner, 2006; Lindstrom et al., 2011). In 2009, PFOS was listed under Annex B of the Stockholm convention (United Nations Environmental Program -UNEP) on Persistent Organic Pollutants (POPs) (Lindstrom et al., 2011).

PFASs have been found in all aquatic media (Houde et al., 2011; Houde et al., 2006). On the basis of global modelling, marine sediments have been designated as the ultimate containment for PFASs (Armitage et al., 2006). Several studies have shown the presence of PFASs in sediment with concentrations ranging from  $0.5 \pm 0.1$  to  $38.3 \pm 16.8$  ng.g<sup>-1</sup> dry weight (dw) (Ahrens et al., 2009; Bao et al., 2009; Bao et al., 2010; Higgins et al., 2005; Labadie and Chevreuril, 2011; Myers et al., 2012; Zushi et al., 2010). Sediment has been suggested as a major source of contamination of aquatic organisms (Martin et al., 2004). However, the distribution of water, sediment, and biota as well as the role of the sediment compartment in biota contamination is still poorly understood. The length of the fluorocarbon chain is an important criterion for PFAS distribution in the environment (Ahrens et al., 2009; Higgins and Luthy, 2006; Myers et al., 2012). PFASs with eight or more carbon atom backbones are known to be bioaccumulative (Kannan et al., 2005; Kelly et al., 2009; Loi et al., 2011; Tomy et al., 2004).

In France, PFASs were found in fish from the Rhône River near Lyon (Miège et al., 2012). Highest levels of PFASs were found in fish from this latter river (mean total PFAS concentration: 241.5 ng.g<sup>-1</sup> dw), the Rhône River was therefore chosen as the study site for

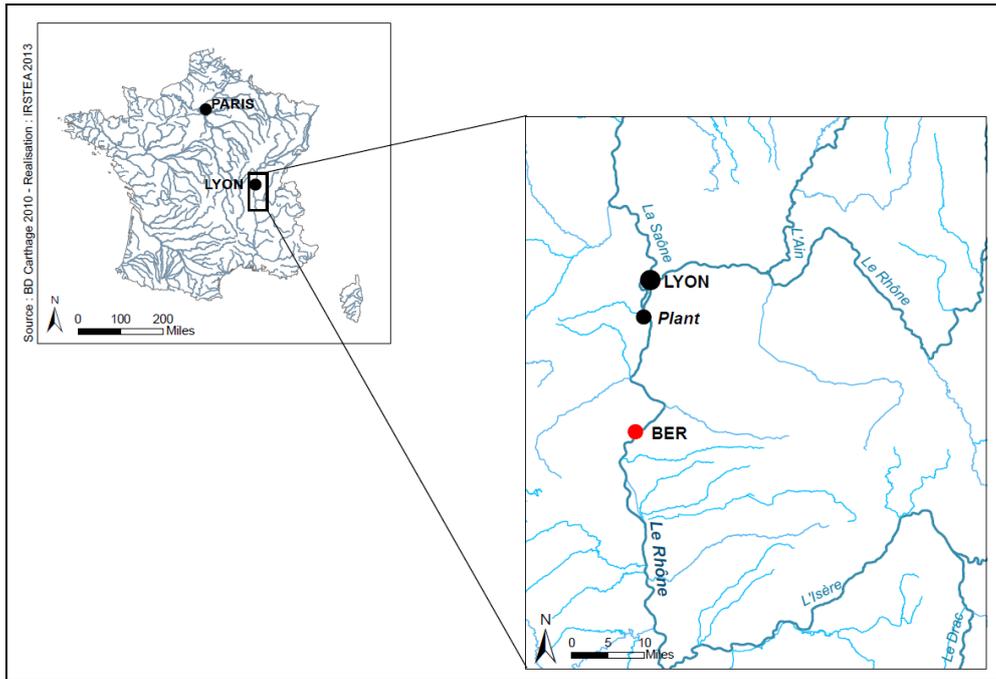
this research which aimed to better understand the origin of PFAS contamination in aquatic organisms by evaluating the transfer of these compounds from sediment to invertebrates.

A benthic invertebrate, the non-biting midge *Chironomus riparius*, is found in sediment from the Rhône River and is recommended by the OECD for toxicity testing (OECD, 2004). Midges are holometabolous, that is they go through complete metamorphosis consisting of egg, larva, pupa, and adult stages. *C. riparius* mates in aerial swarms. After mating, the female deposits the eggs on the water surface. Larvae undergo four instars; the first (L1) is planktonic and the second to fourth larval stages (L2, L3, L4) are in direct contact with sediment (Fig. S1). Larvae L2 to L4 are collector-gatherers, feeding mainly on detritus and its associated bacteria and fungi. This species represents an important food source for fish, making it a useful species for documenting the bioaccumulation of perfluoroalkyl compounds (Armitage et al., 1995).

The objectives of the present study were (i) to experimentally determine the role played by sediment in the accumulation of eleven carboxylic acids (from 4 to 14 carbons), five sulfonates (ranging from 4 to 10 carbons), and seven precursors by *C. riparius* larvae and (ii) to describe the kinetics of the bioaccumulation process.

## **2. Materials and Methods**

The study site, Beurre Island (BER), is a fluvial annex of the Rhône River (eastern central France, N45°28'17,0"E4°46'43,4", Fig. 1) and located downstream of a fluoropolymer manufacturing plant that has been found to be an important source of PFAS contamination with a typical profile (Dauchy et al., 2012).



**Figure 1 : Study site of the Rhône River, France. BER= Beurre Island, Plant = PFAS production plant. The river runs from north to south.**

## 2.1 Sediments

In 2012, 50 L of natural sediments were collected from the river bed with a Van-Veen grab, kept on ice and brought to the laboratory, where they were sieved at 2 mm, pooled in a polypropylene (PP) jar, and stored at 4°C. Six aquaria (38 × 20 × 24.5 cm in polystyrene) were prepared with 4 L of homogenized sediment and 15 L of groundwater mixed with treated water via an osmosis system in order to reach a conductivity of 300  $\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$ . Each aquarium was allowed to settle for 1 week before introducing the chironomids. Three control aquaria were prepared in the same manner with silica sand (particle size distribution: 90% 50-200 $\mu\text{m}$ , 10% <50 $\mu\text{m}$ ) (Péry et al., 2002).

The sediment was characterized for water content, nitrogen, carbonate using a Bernard calcimeter, and loss on ignition (LOI) (AFNOR, 1994, 2000, 2007; Vatan 1967) and showed a water content of 43.4%, an organic carbon content of 4.3%, a carbonate content of 27.4%, and

a nitrogen content of 0.19%. The particle size distribution was determined by laser diffractometry (Cilas 1190, France) and found to be 10% clay -silt (< 5.83µm), 40% silt (5.83 - 52.24 µm), and 50% of silt -very fine sand (>52.24 mm).

## 2.2 *C. riparius* exposure

Chironomids were obtained from laboratory cultures made according to standard methods (AFNOR, 2010; OECD, 2004). Chironomids were exposed to the BER sediment at standard temperature (21°C). Two experiments were conducted to examine the extent to which developmental stage influences the amount of accumulated chemicals in *C. riparius* (experimental designs shown in Fig. S2). The first experiment (E1) started with L2 larvae until the end of the L4 stage and lasted for 9 days. The second experiment (E2) started directly with L4 larvae.

In experiment E1, 2400 L2 larvae (2-day-old larvae post-hatching) were added to three study aquaria, and to three control aquaria (400 in each aquarium). In experiment E2, 1200 early L4 larvae (7-day-old larvae post-hatching) were exposed in three aquaria. Overlying water (OW) was continuously renewed (four times a day) to maintain adequate water quality and oxygenated under a 16:8-h light: dark photoperiod during the experiment. Larvae were fed ad libitum each day with 1mg commercial food (Tetramin®) per organism per day. We decided to feed the chironomids during the experiment because previous experiments showed that larvae did not survive without an external supply of food in this sediment. A quantity of 1mg Tetramin® per organism per day was selected because preliminary tests (data not shown) conducted with 0.6mg Tetramin® per organism per day showed low survival and growth. E1 organisms were sacrificed after 11 post-hatching days, i.e., 9 days (T<sub>final</sub>, T<sub>f</sub>) after being introduced in the aquaria. E2 organisms were sacrificed at 2 (T<sub>1</sub>), 3 (T<sub>2</sub>), and 4 (T<sub>3</sub>) days, respectively, after introducing L4 chironomids. The water quality parameters (pH,

concentration of dissolved oxygen, conductivity,  $\text{NO}_2^-$ , and  $\text{NH}_4^+$ ) were monitored once a week and at the beginning and the end of the exposure period (Fig. S2).

### 2.3 Sample collection and chironomid measurements

Overlying water (OW), pore water (PW), and sediment were sampled at T1, T2, T3, and Tf. E1 organisms were sampled only at Tf. E2 chironomids were sampled at T0 (fourth instar larvae), T1, T2 and T3, and Tf. The overlying water was sampled directly in a 1L polyethylene (PE) bottle. For pore water, we used a Rhizon<sup>®</sup> system (SDEC, Reignac-sur-Indre, France), which consists of one porous polymer part inside a fiberglass rod. Organisms were collected by sieving the upper layer of sediment at 500 $\mu\text{m}$ ; sub-samples from deeper sediment were deposited in PE tubes. Organisms were split into two different batches for PFAS analysis (about 800 mg wet weight (ww), representing about 200 larvae) and  $\delta^{13}\text{C}$  and  $\delta^{15}\text{N}$  isotopic analysis (about 5 mg dw of larvae). Biota samples were cryopreserved in liquid nitrogen and stored at  $-21^\circ\text{C}$  and abiotic samples frozen and kept at  $-21^\circ\text{C}$  (Fig S2).

Chironomid survival, length, and weight were determined for all aquaria. To determine length, four groups of ten larvae were photographed and mean sizes assessed using digital image analysis software (Jmicrovision, freely available via <http://www.jmicrovision.com/>). The same groups were then weighed (weighing scales: Sartorius CPA225D, France) to obtain mean weights.

### 2.4 PFAS extraction

#### 2.4.1 Overlying and pore water samples

Water samples were each spiked with 2 ng of IS and processed using Srata X-AW cartridges as described by Labadie and Chevreuil (2011).

Eluates were concentrated to 400 µL under a nitrogen stream at 40°C and transferred into PP vials (final volume: 250-300 µL). Extracts were stored at -20°C until analysis.

#### 2.4.2 Sediment sample

Sediment samples were extracted by sonication, using a method adapted from Sun et al. (2011). Samples (1 g dw) were spiked with ISs (1.8 ng each) and extracted with 5 mL of MeOH for 20 min, prior to centrifugation for 3 min (20°C, 2900 g). This procedure was repeated with 2.5 mL of MeOH and the two extracts were combined and concentrated to 800 µL under a nitrogen stream at 40°C. Samples were purified using ENVI-Carb cartridges previously conditioned with 4 mL of MeOH and eluted with 2× 4 mL of MeOH. Eluates were concentrated to 400 µL under a nitrogen stream at 40°C and transferred into injection vials.

#### 2.4.3 *C. riparius* samples and Tetramin® samples

Extraction of PFASs in 120 mg dw *C. riparius* (800 mg ww) and in 540 mg Tetramin® followed the same protocol used for the sediment samples. Extract clean-up was adapted from Ballesteros-Gomez et al. (2010). Extracts were diluted 20 times with ultra-pure water (5% extract in water) and then passed through a Strata X-AW cartridge previously conditioned as described above. After extract loading, cartridges were washed with 5 mL of sodium acetate buffer (pH=4.5, 25 mM). They were vacuum-dried (30-40 min) and connected via a polyethylene adaptor cap to an ENVI-Carb cartridge previously conditioned with 8 mL of MeOH. Neutral PFASs were eluted with 8 mL of MeOH (fraction A). The ENVI-Carb cartridge was then replaced and a second fraction (fraction B) containing acidic analytes was eluted with 8 mL of MeOH containing 0.2% NH<sub>4</sub>OH. Fraction A eluates were concentrated to 300 µL and then transferred into PP injection vials. Fraction B eluates were processed almost to dryness before adding 200 µL of acetonitrile and 200 µL ultrapure water. Extracts were

then passed through MeOH-rinsed centrifuge tube filters and transferred into PP injection vials.

### 2.5 Isotopic analysis

Isotopic analysis ( $^{13}\text{C}$  and  $^{15}\text{N}$ ) was performed by the INRA-Nancy laboratory (PTEF-isotopy pole, France) on decarbonated sediment, Tetramin<sup>®</sup>, and chironomids (i.e., chironomids that have eliminated their gut content following 48h in a beaker containing silicate, overlying water with food, and chironomids with gut content).

### 2.6 LC-MS/MS analysis

PFAS analyses were performed using an Agilent 1200 LC system (Agilent Technologie, Massy, France) interfaced with an Agilent 6460 triple quadrupole mass spectrometer (details in Table S2).

### 2.7 Quality control and performance methods

Analyte recoveries were determined using spiked samples for each matrix (surface and pore water, sediment, and chironomids). Native PFAS recoveries ranged from 50 to 110% (except for PFTeDA, MeFOSA and EtFOSA), with a relative standard deviation below 15% (Table S3).

Mean IS recoveries, estimated by external calibration, were in the range 70 - 135% for the different matrices. Replicate procedural blanks were analyzed for each series of samples. The predominant compounds in surface water blanks were PFHpA (mean level: 166 pg) and PFHxA (115 pg). For solid samples, the prevailing analytes in blanks were PFOA (63 pg) and PFPA (26 pg). PFAS concentrations were therefore blank-corrected. For compounds present in blanks, the limits of detection (LDs) were defined as three times the standard deviation, and the limits of quantification (LQs) were set at ten times the standard deviation of the blank. For

analytes not detected in the blanks, LDs and LQs were determined as the concentration with a signal-to-noise ratio of 3 and 9, respectively. This calculation was performed on matrices spiked at 2-5 ng.g<sup>-1</sup> (sediment and *C. riparius*) and 2-3 pg.L<sup>-1</sup> (Vittel® mineral water samples) (Table S4).

## 2.8 Data processing

Data were analyzed using the Student' *t*-test. All data were checked for normality and homogeneity of variance using the Shapiro-Wilk test and the Bartlett test, respectively. For all statistical tests, the significance level (alpha) was set at 0.05 and calculations were performed using the software package R (version 2.11.0) (R Development Core Team, 2013). For calculating data below the LQ, 0.5\*LQ was used.

When relevant, accumulation data were fit to an exponential rise model (Eq.1) with Sigma Plot 10.0 software (Systat software Inc., Point Richmond, CA, USA-[www.systat.com](http://www.systat.com)).

$$C_{\text{org}}(t) = a.(1-e^{-bt}) \quad \text{Eq. (1)}$$

Where  $C_{\text{org}}$  is the concentrations in chironomids (ng. g<sup>-1</sup> ww),  $t$  the time in (h),  $a$  and  $b$  are defined in the discussion.

This model has been adapted to existing bioaccumulation models, including the model described by Spacie and Hamelink (1985) and Landrum (Landrum, 1989).

## 3. Results

### 3.1 PFAS distribution in water, sediment, food, and *C. riparius*

Short- (PFBA to PFHxA) and long-chain PFCAs (PFOA, PFNA, PFDA, PFUnA, and PFTrDA), short- and long-chain PFSAAs (PFBS, PFHxS, and PFOS) and one precursor (6:2 FTSA) were detected in OW test aquaria. PFBA, PFPA, PFHxA, PFNA, PFDA, PFBS,

PFHxS, and PFOS were also detected in OW control aquaria, at levels comparable to those observed in test aquaria. Concentrations were consistent throughout the replicates (test and control) (Table S5). The same compounds were observed in pore water, except PFDA and PFTTrDA; PFHpA was also measured in this compartment. In PW samples from control aquaria, PFBA, PFPA, PFHxA, PFHpA, and PFHxS were detected at levels lower than PW from test aquaria ( $n = 3$ ,  $p$ -value < 0.001). In sediment, short- (PFBA to PFHpA) and long-chain (PFOA to PFTeDA) PFCAs, PFOS, and two precursors (6:2 FTSA and FOSA) were detected > LQs and EtFOSAA were detected < LQs. Concentration of long-chain PFCAs were higher in sediment: PFTTrDA ( $2.54 \pm 0.23$  ng.g<sup>-1</sup>dw), PFUnA ( $1.70 \pm 0.22$  ng.g<sup>-1</sup>dw), PFDoA ( $1.54 \pm 0.63$  ng.g<sup>-1</sup>dw), PFTeDA and PFDA ( $0.99 \pm 0.58$  ng.g<sup>-1</sup>dw and  $0.91 \pm 0.43$  ng.g<sup>-1</sup>dw respectively), whereas PFOS was lower ( $0.26 \pm 0.02$  ng.g<sup>-1</sup>dw). In sediment control samples, only PFPA and PFOA results were between LDs and LQs; the other compounds were <LDs.

The analysis of Tetramin<sup>®</sup> indicated the presence of 4 PFASs: PFNA ( $0.20 \pm 0.05$  ng.g<sup>-1</sup>dw), PFUnA ( $0.34 \pm 0.32$  ng.g<sup>-1</sup>dw), PFOS ( $1.43 \pm 0.17$  ng.g<sup>-1</sup>dw), and FOSA ( $0.39 \pm 0.03$  ng.g<sup>-1</sup>dw). The range of PFAS concentrations in chironomids at the end of E1 and E2 exposures are presented in Table 1, PFAS concentrations in chironomids control were <LDs.

### 3.2 Growth and accumulation kinetics

Survival throughout the experiments (E1 and E2) was greater than 80%.

Chironomid weight was significantly different ( $p < 0.001$ ) between growth in sediment (two at fourth instar larvae:  $7.15 \pm 0.60$  mg) and in silica ( $5.84 \pm 0.83$  mg) at 11 days post-hatching (Fig. S3). However, no adverse effect of contaminated sediment on chironomid growth was observed. In addition, fourth instar larvae weight data (E2) fit an exponential growth curve well ( $R^2 = 0.999$ ,  $p < 0.0001$ ); growth rate (g)  $0.0148$  h<sup>-1</sup> (0.0001).

The results indicated that *C. riparius* accumulated four long-chain PFCAs (> 10 carbons: PFUnA, PFTrDA, PFDoA, and PFTeDA), PFOS, one precursor (FOSA), and one fluorotelomer (6:2 FTSA); the other compounds were all <LDs (Fig. 2). Fourth instar chironomid larvae accumulated PFASs as early as the second day of exposure and a steady state was observed at the end of exposure for most of the accumulated compounds, except for PFTeDA (LD < PFTeDA concentration < LQ) and perhaps for 6:2 FTSA. No differences in accumulation were observed between organisms exposed only at the fourth instar and those exposed from the second to the fourth instar (Fig. 3, Table 1).

**Table 1**

**PFAS concentrations in chironomids at the end of E1 and E2 exposures (ng.g<sup>-1</sup> ww). E1 with standard deviation (*n* = 3) and E2 with analytical error calculation relative to spiked samples (Table S3). PFTeDA “trace” means that concentrations were between LD and LQ.**

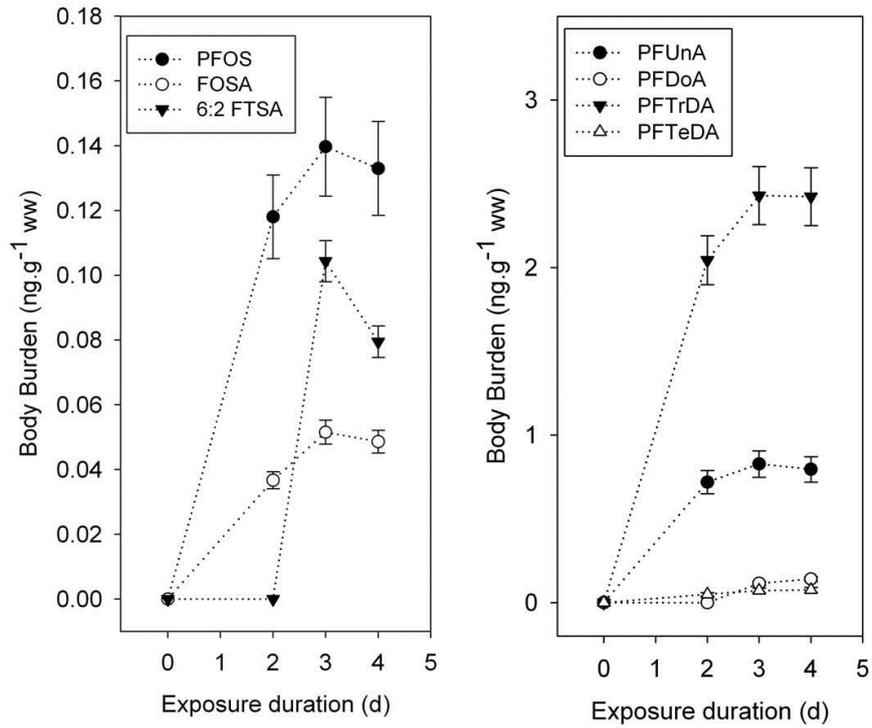
Compounds	PFASs in chironomids at the end of E1 (ng.g <sup>-1</sup> ww)	PFASs in chironomids at the end of E2 (ng.g <sup>-1</sup> ww)
PFUnA	0.79 ± 0.10	0.80 ± 0.08
PFDoA	0.11 ± 0.01	0.14 ± 0.01
PFTrDA	1.71 ± 0.42	2.42 ± 0.17
PFTeDA trace	0.05 ± 0.001	0.08 ± 0.02
PFOS	0.16 ± 0.02	0.13 ± 0.02
FOSA	0.05 ± 0.01	0.05 ± 0.02
6:2 FTSA	0.07 ± 0.03	0.08 ± 0.005

The chironomids were not deperated before PFAS analyses; therefore the gut content estimation was based on Brooke et al. (1996). According to this calculation there was no difference in PFAS concentrations between chironomids in which gut content was or was not estimated. Therefore, the data without gut content correction were kept for further interpretation.

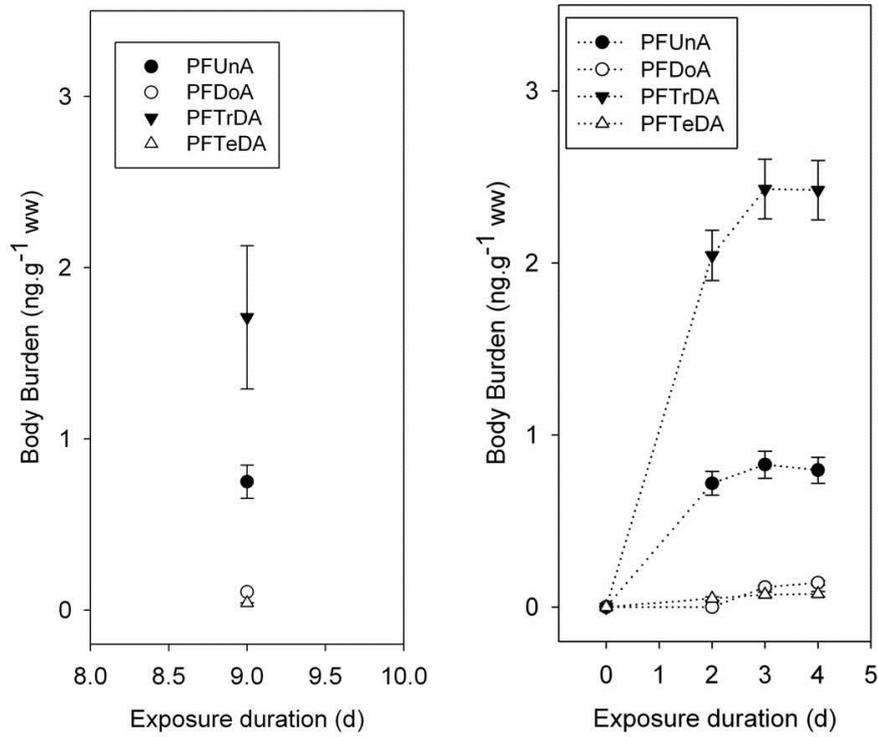
The biota-to-sediment accumulation factor (BSAF) between organisms was calculated according to (Higgins et al., 2007):

$$BSAF_{ww} = C_{org} / C_{sed,oc} \quad \text{Eq. (2)}$$

where  $C_{org}$  ( $\text{ng}\cdot\text{g}^{-1}$  ww) is the PFAS concentration in the organism (at steady state) and  $C_{sed,oc}$  ( $\text{ng}\cdot\text{g}_{oc}^{-1}$  dw) is the PFAS concentration in sediment normalized by the organic carbon content (Table 2).



**Figure 2: Kinetics of PFAS accumulation in fourth instar larvae of *Chironomus riparius***



**Figure 3: PFCA accumulation in E1 (left) and E2 (right) experiments**

**Table 2**

**BSAF<sub>ww</sub> (g<sub>oc</sub>.g<sub>ww</sub><sup>-1</sup>) for chironomids and for *Lumbriculus variegatus* (Higgins et al., 2007; Lasier et al., 2011); n.d, not detected, \*PFTeDA, as guidelines only (because LD < PFTeDA concentrations in chironomids < LQ).**

Compounds	Fluorinated carbon number	BSAF <sub>ww</sub> chironomid	BSAF <sub>ww</sub> Higgins et al., 2007	BSAF <sub>ww</sub> Lasier et al., 2011
PFUnA	10	0.020	0.44 ± 0.11	0.29, CV= 40
PFDoA	11	0.004	0.45 ± 0.08	0.34, CV=40
PFTrDA	12	0.042	n.d	0.62, CV=44
PFTeDA*	13	0.004	n.d	0.63, CV=47
PFOS	8	0.023	0.83 ± 0.20	0.49, CV=50
6:2 FTSA	6	0.018	n.d	n.d
FOSA	8	0.098	n.d	n.d

### 3.3 Isotopic analysis

$\delta^{13}\text{C}$  signatures of  $-27.57 \pm 0.005\text{‰}$  and  $-23.11\text{‰}$  and  $\delta^{15}\text{N}$  signatures of  $4.12 \pm 0.64\text{‰}$  and  $7.58\text{‰}$  were found in sediment and chironomid food (Tetramin®) respectively. No

differences were observed between depurated or non-depurated chironomids: the  $\delta^{13}\text{C}$  signature was  $-20.37 \pm 0.42\text{‰}$  and the  $\delta^{15}\text{N}$  signature  $11.61 \pm 0.80\text{‰}$  (Fig. S4).

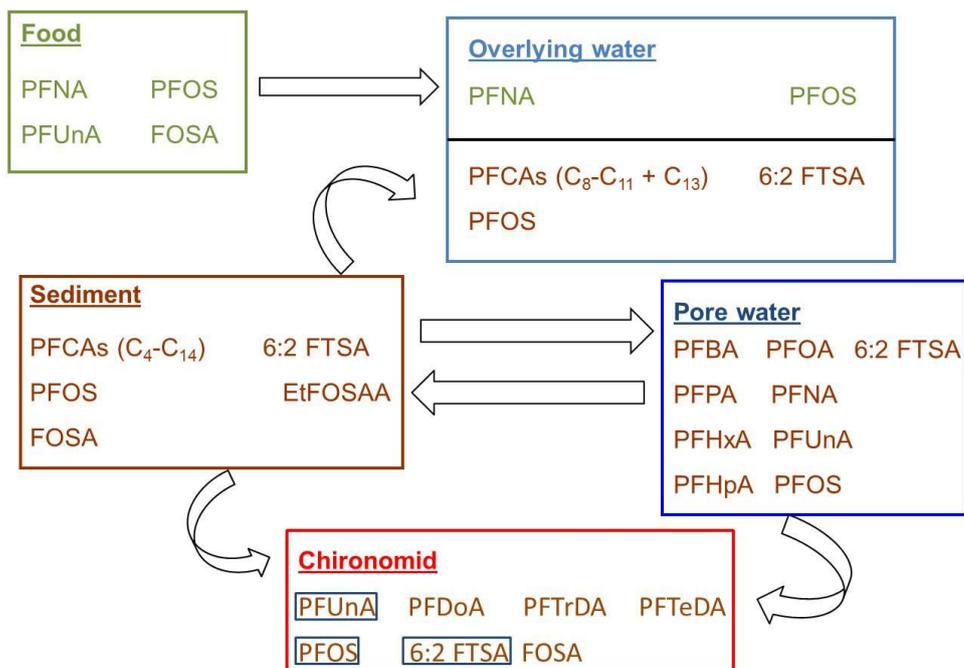
#### 4. Discussion

##### 4.1 PFAS distribution in water, sediment, food, and *C. riparius*

The sediment from the study site was characterized by high concentrations of PFNA, PFUnA, and PFTrDA, whereas PFOS concentrations remained low as compared with the data reported in the literature (Table S6). This pattern of PFAS contamination may be characteristic of the upstream industrial discharge from a fluoropolymer and polyvinylidene fluoride facility (Dauchy et al., 2012). In most published studies from other sites, PFUnA and PFDA were usually below  $1 \text{ ng.g}^{-1}\text{dw}$  (Clara et al., 2009; Higgins et al., 2005; Higgins et al., 2007; Labadie and Chevreuil, 2011), except for the Coosa River in Alabama ( $3.80 \text{ ng.g}^{-1}\text{dw}$ ) and Tennessee, USA ( $4.66 \text{ ng.g}^{-1}\text{dw}$ ) (Lasier et al., 2011). Detection of other long-chain PFCAs was scarce: a maximum value of  $1.19 \text{ ng.g}^{-1}\text{dw}$  for PFTrDA was reported in Tokyo Bay, Japan (Zushi et al., 2010), and PFDoA and PFTeDA values were below  $1 \text{ ng.g}^{-1}\text{dw}$  in the Orge River (near Paris, France) (Labadie and Chevreuil, 2011), whereas in the Coosa River, USA, concentrations above  $1 \text{ ng.g}^{-1}\text{dw}$  ( $1.7$  and  $4.64 \text{ ng.g}^{-1}\text{dw}$  respectively) were found (Lasier et al., 2011). For PFOS, BER sediment concentrations ( $0.247 - 0.294 \text{ ng.g}^{-1} \text{ dw}$ ) were in the same range as reported in other studies around the world (Table S6) (Bao et al., 2009; Benskin et al., 2012; Nakata et al., 2006) and lower than PFOS levels in the Orge River (France), Coosa River (USA), Sydney Harbor (Australia), and the North and Baltic Seas (Labadie and Chevreuil, 2011; Lasier et al., 2011; Theobald et al., 2012; Thompson et al., 2011).

Comparison of the respective concentration ranges for the PFASs measured in control and test aquaria make it possible to design a conceptual diagram of PFASs transport between

compartments (Fig. 4). Since PFBA, PFPA, PFH<sub>x</sub>A, PFNA, PFDA, PFBS, and PFH<sub>x</sub>S display the same concentrations on overlying waters in control and test aquaria, we inferred that sediment is not a source for these compounds to water. Conversely, PFOA, PFUnA, PFTrDA, and 6:2 FTSA, which were present only in OW test aquaria and therefore were clearly released from the sediment. Similarly, PFBA, PFPA, PFH<sub>x</sub>A, PFOA, PFNA, PFUnA, PFOS, and 6:2 FTSA associated with test sediments were in much higher concentrations in PW from test aquaria than in PW from controls. Therefore, their presence in PW cannot be related to OW. PFNA and PFOS were measured in both food (Tetramin<sup>®</sup>) and OW controls aquaria. As a consequence, it could not be excluded that PFNA and PFOS in Tetramin<sup>®</sup> were dissolved into OW. However, all the PFASs measured were <LD in control chironomids; therefore Tetramin<sup>®</sup> is not a source of PFASs. PFUnA, PFOS, and 6:2 FTSA were present in sediment, PW, and chironomids: both PW (respiration) and sediment (food) contribute to the contamination. Conversely, PFDoA, PFTrDA, PFTeDA, and FOSA present only in sediment and chironomids contributed to the contamination by the ingestion of sediment particles.



**Figure 4: Partition between different compartments**

#### 4.2 PFASs in benthic invertebrates

Chironomids bioaccumulated four PFCAs, one PFSA (PFOS), and two PFASs precursors. Among these, 6:2 FTSA was found to bioaccumulate poorly in fish and rats (DuPont, 2008). Reported concentrations were generally higher for benthic invertebrates than chironomids, especially for PFOS; ranges of PFOS in Capitellidae and Nereidae were 0.82 - 12.6 ng.g<sup>-1</sup>ww and 0.26 - 0.67 ng.g<sup>-1</sup>ww (Loi et al., 2011). Mean PFAS concentrations reported for lugworm were 0.41 ng.g<sup>-1</sup>ww (Nakata et al., 2006) and 280 ± 33 ng.g<sup>-1</sup>ww for *Diporeia hoyi* (Martin et al., 2004). The latter study also reported that concentrations of PFUnA, PFDoA, PFTTrDA, and PFTeDA were higher in *Diporeia hoyi* than in chironomids (Martin et al., 2004). In Nereidae and Capillidae worms, concentrations of PFUnA were lower than in chironomids (Loi et al., 2011). Compared to chironomids from the present study, lower concentrations were also reported for PFDoA in Capillidae (Loi et al., 2011), for PFOS in clams (Nakata et al., 2006; Nania et al., 2009), for FOSA in clams and lugworms (Nakata et al., 2006), and for PFTeDA in Nereidae worms (Loi et al., 2011). However, comparisons between freshwater and marine organisms should be interpreted with caution because salt may affect the chemical activity (Jeon et al., 2010a; Jeon et al., 2010b).

#### 4.3 Accumulation kinetics

The biota-to-sediment accumulation factors (BSAFs; Eq. 2) indicated values for FOSA > PFTTrDA > PFOS > PFUnA > 6:2 FTSA > PFTeDA > PFDoA, and no trend was observed between BSAF and PFAS chain length. In contrast, Higgins et al. (2007) observed that BSAF values tended to decrease with increasing chain length and Lasier et al. (2011) reported that BSAF values increased with increasing chain length. BSAF values in the present study were lower than BSAFs reported by Higgins et al. (2007) and Lasier et al. (2011) (e.g., PFUnA BSAF<sub>ww</sub> chironomid = 0.020; BSAF<sub>ww</sub> = 0.44 ± 0.11; BSAF<sub>ww</sub> = 0.29, CV = 40,

respectively). This might be explained by the fact to the food added during the present experiment, in contrast to the absence of feeding in previous studies (Higgins et al., 2007 and Lasier et al., 2011). Adding food may decrease the exposure and dilute the contamination because without this addition the chironomids would have fed only on sediment organic matter. Our experiment was conducted in this manner because preliminary trials showed that survival rates were too low when no food was added to the aquaria.

In the Higgins et al. (2007) study, *Lumbriculus variegatus* reached steady state for PFOA and PFDS but not for PFNA, PFOS, PFDA, PFUnA, and PFDoA. In this experiment *C. riparius* reached a steady state both for PFCAs > C<sub>11</sub> (PFUnA, PFDoA, PFTrDA) and PFOS and FOSA. However, in Lasier et al. (2011), *L. variegatus* accumulated other compounds that were not accumulated by chironomids such as PFHpA, PFOA, PFNA, and PFDA, although they were measured in sediment. This could be explained by the difference in feeding habits between the two organisms (Nogaro et al., 2009). In addition, chironomid growth during the accumulation phase is not negligible, unlike for *L. variegatus*, which lost weight (because it went unfed), as growth dilutes contamination. PFAS accumulation in chironomids was as effective when exposure started at 2<sup>nd</sup> instar as when it started at 4<sup>th</sup> instar. PFASs concentrations were the same between the end of E1 and E2 exposures (Table 1, Fig. 3). At the latter stage, growth is more rapid than at previous stages (Péry et al., 2002). These results suggest that the sole use of the 4<sup>th</sup> instar in could be included in the design of future experimental studies with this organism.

For PFTrDA, PFUnA, PFOS, and FOSA, accumulation data obtained in the present study fit an exponential rise model well (Eq. 1), with R<sup>2</sup> values ranging from 0.99 (PFOS) to 0.97 (PFUnA). Equation (1) supports either a classical two-compartment partition model (Higgins et al., 2007; Landrum, 1989) or a more sophisticated adsorption-like accumulation model (Liu

et al., 2011). Model parameter  $a$  is related to the exposure concentration ( $C_{sed-oc}$ ) and uptake and depuration rates ( $k_u$  and  $k_e$  respectively).

Model parameter  $b$  is related to the elimination rate ( $k_e$ ). As chironomids grow during the experiment, the elimination rate ( $k_e'$ ) should be corrected according to Eq. (3) (Spacie and Hamelink, 1985),

$$k_e' = k_e + g \quad \text{Eq. (3)}$$

The complete two-compartment model includes a  $\lambda$  term in order to account for the chemical concentration decline in sediment. This term is set to 1, as in eq. 1, when sediment concentrations do not vary significantly during the experiment (that is, if the flux from sediment to organisms is much lower than the overall compound mass in sediment). This was the case in the current experiment (Table S5). In this case, equation (1) can be solved easily, with  $b$  being the apparent elimination rate ( $k_e'$  in  $h^{-1}$ ), and

$$a = (k_u/k_e) * C_{sed-oc} \quad \text{eq. (4)}$$

with  $k_u$  the uptake rate ( $g_{oc} \cdot g_{ww} \cdot h^{-1}$ ) and  $C_{sed-oc}$  the concentration in sediment normalized to the organic carbon content ( $ng \cdot g_{oc}^{-1}$ ).

Applying this approach, yields ( $k_u$ ,  $k_e$ , and  $k_e'$ ) were obtained for PFTrDA, PFUnA, PFOS, and FOSA) (Table 3). These data are only informative because no depuration data were available.

The adsorption-like model (Liu et al., 2011) was developed initially for an uptake experiment from water. We assumed that it could also apply to accumulation from sediment and food as in our study. Nevertheless, it cannot be solved without depuration data because three variables are included in the terms  $a$  and  $b$  instead of two as in the two-compartment model:

$$a = (n * k_u * C_{sed}) / (k_u * C_{sed} + k_e) \quad \text{Eq. (5)}$$

$$b = k_u * C_{sed} + k_e \quad \text{Eq. (6)}$$

where  $n$  is the number of adsorption sites.

**Table 3**

**Model parameters with ( $k_e'$ ) and without growth correction ( $k_u$ ,  $k_e$ )**

Compounds	a	$k_u$	$k_e'$ (b)	$k_e$
PFUnA	$0.83 \pm 0.03$	0,0009	$0.04 \pm 0.01$	0,03
PFTrDA	$2.56 \pm 0.11$	0,0015	$0.03 \pm 0.01$	0,02
PFOS	$0.14 \pm 0.008$	0,0009	$0.04 \pm 0.01$	0,03
FOSA	$0.06 \pm 0.01$	0,0022	$0.02 \pm 0.01$	0,01

#### 4.4 Contamination routes

All compounds accumulated by the chironomids were detected in sediment. PFUnA, PFOS, and 6:2 FTSA were also quantified in both pore and overlying water and PFTrDA was detected in overlying water. In addition, some compounds, such as PFUnA, PFOS, and FOSA, were found in food added (Tetramin<sup>®</sup>) to chironomids, which did not affect accumulation in chironomids (i.e., the balance between accumulation and depuration) because these compounds were not detected in control chironomids (PFAS concentrations <LDs).

These results therefore suggest that there are two contamination routes for the PFASs, which differ according to the compounds. The contamination routes for substances found in both pore water and sediment (particles) were via food and tegument. For other compounds, found only in sediment, the contamination route was only trophic.

These observations are supported by the growth data: larvae grew more in test sediments than in the control setting, although they received the same quantity of Tetramin<sup>®</sup>. These results indicate that larvae fed on organic carbon from the sediment and thus may have absorbed the PFAS associated with particles. On the other hand, the chironomid  $\delta^{13}\text{C}$  values

were almost identical in test and control organisms, suggesting that the proportion of C obtained by the larvae from the sediment was limited. This is consistent with the findings reported by Goedkoop et al. (2006), which showed that about 90% of the carbon intake was from added food. However, both  $\delta^{13}\text{C}$  and  $\delta^{15}\text{N}$  values for Tetramin<sup>®</sup> were mean values because Tetramin<sup>®</sup> is a mixture of animal (fish, crustaceans, mollusks) and plant (cereals) ingredients, each having its own isotopic composition. Chironomids may feed selectively on certain components of the added food (Goedkoop et al., 2006). Therefore, the observed chironomid  $\delta^{13}\text{C}$  signature may be influenced by sediment organic carbon.

## 5. Conclusion

Results from this study indicate that *C. riparius* accumulated four long-chain perfluoroalkyl carboxylates (PFUnA, PFDoA, PFTrDA, and PFTeDA), a perfluoroalkyl sulfonate (PFOS), a precursor (FOSA), and a fluorotelomer (6:2 FTSA) from sediment. No short-chain PFAS, detected mostly in water, were accumulated by chironomids. No trends were observed for BSAFs, in contrast to studies by Higgins et al. (2007) and Lasier et al. (2011). The contamination pathways appeared to be trophic (sediment particles) and tegumentary (pore water) for PFUnA, PFOS, and 6:2 FTSA and only via the trophic pathway for the other compounds. Growth data support the trophic contamination route but isotopic data are difficult to interpret because of food added during the experiments. PFUnA, PFTrDA, and PFOS data fit an exponential rise model; apparent uptake and elimination constants can thus be proposed on the basis of the classical partition model (Landrum, 1989; Spacie and Hamelink, 1985). Elimination experiments should be conducted to determine the elimination kinetics experimentally in this species.

## Acknowledgments

This study was funded by the Rhone-Mediterranean and Corsica Water Agency and the Rhone-Alpes Region within the Rhone ecological restoration plan. We thank Bernard Motte (IRSTEA), Raphael Barlon, and the Centre d'Observation de l'Ile du Beurre team (Condrieu, France) for their assistance during the sampling campaigns and chemical laboratory analysis (UR MALY, IRSTEA Lyon-Villeurbanne) for monitoring the physicochemical characterization of sediment, and Linda Northrup for copyediting the text as well as two anonymous reviewers for their constructive remarks.

## **References**

AFNOR, 1994. Determination of kjeldahl nitrogen - Method after mineralization with selenium Water quality.

AFNOR, 2000. Determination of dry residue and water content Characterization of sludges.

AFNOR, 2007. Determination of loss on ignition in waste, sludge and sediments Characterization of waste.

AFNOR, 2010. Determination of the toxicity of fresh water sediments to Chironomus riparius - Part 1 : natural sediments Water quality

Ahrens, L., Yamashita, N., Yeung, L.W.Y., Taniyasu, S., Horii, Y., Lam, P.K.S., Ebinghaus, R., 2009. Partitioning Behavior of Per- and Polyfluoroalkyl Compounds between Pore Water and Sediment in Two Sediment Cores from Tokyo Bay, Japan. *Environmental Science & Technology* 43, 6969-6975.

Armitage, J., Cousins, I.T., Buck, R.C., Prevedouros, K., Russell, M.H., Macleod, M., Korzeniowski, S.H., 2006. Modeling global-scale fate and transport of perfluorooctanoate emitted from direct sources. *Environmental Science and Technology* 40, 6969-6975.

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

Ballesteros-Gómez, A., Rubio, S., van Leeuwen, S., 2010. Tetrahydrofuran–water extraction, in-line clean-up and selective liquid chromatography/tandem mass spectrometry for the quantitation of perfluorinated compounds in food at the low picogram per gram level. *Journal of Chromatography A* 1217, 5913-5921.

Bao, J., Jin, Y., Liu, W., Ran, X., Zhang, Z., 2009. Perfluorinated compounds in sediments from the Daliao River system of northeast China. *Chemosphere* 77, 652-657.

Bao, J., Liu, W., Liu, L., Jin, Y., Ran, X., Zhang, Z., 2010. Perfluorinated compounds in urban river sediments from Guangzhou and Shanghai of China. *Chemosphere* 80, 123-130.

Benskin, J.P., Ikonomou, M.G., Gobas, F.A.P.C., Woudneh, M.B., Cosgrove, J.R., 2012. Observation of a Novel PFOS-Precursor, the Perfluorooctane Sulfonamido Ethanol-Based Phosphate (SAmPAP) Diester, in Marine Sediments. *Environmental Science & Technology* 46, 6505-6514.

Brooke, L.T., Ankley, G.T., Call, D.J., Cook, P.M., 1996. Gut content weight and clearance rate for three species of freshwater invertebrates. *Environmental Toxicology and Chemistry* 15, 223-228.

Clara, M., Gans, O., Weiss, S., Sanz-Escribano, D., Scharf, S., Scheffknecht, C., 2009. Perfluorinated alkylated substances in the aquatic environment: An Austrian case study. *Water Research* 43, 4760-4768.

Dauchy, X., Boiteux, V., Rosin, C., Munoz, J.F., 2012. Relationship between industrial discharges and contamination of raw water resources by perfluorinated compounds. Part I: Case study of a fluoropolymer manufacturing plant. *Bull Environ Contam Toxicol* 89, 525–530.

DuPont Zonyl FSE, 2008. [Fluorotelomer Products in the Environment – An Update NFPA.](http://www2.dupont.com/Capstone/en_US/index.html) [http://www2.dupont.com/Capstone/en\\_US/index.html](http://www2.dupont.com/Capstone/en_US/index.html) (April 24 2013).

Goedkoop, W., ÅKerblom, N., Demandt, M.H., 2006. Trophic fractionation of carbon and nitrogen stable isotopes in *Chironomus riparius* reared on food of aquatic and terrestrial origin. *Freshwater Biology* 51, 878-886.

Higgins, C.P., Field, J.A., Criddle, C.S., Luthy, R.G., 2005. Quantitative determination of perfluorochemicals in sediments and domestic sludge. *Environmental Science and Technology* 39, 3946-3956.

Higgins, C.P., Luthy, R.G., 2006. Sorption of perfluorinated surfactants on sediments. *Environmental Science and Technology* 40, 7251-7256.

Higgins, C.P., McLeod, P.B., Macmanus-Spencer, L.A., Luthy, R.G., 2007. Bioaccumulation of perfluorochemicals in sediments by the aquatic oligochaete *Lumbriculus variegatus*. *Environmental Science and Technology* 41, 4600-4606.

Houde, M., De Silva, A.O., Muir, D.C.G., Letcher, R.J., 2011. Monitoring of Perfluorinated Compounds in Aquatic Biota: An Updated Review. *Environmental Science & Technology* 45, 7962-7973.

Houde, M., Martin, J.W., Letcher, R.J., Solomon, K.R., Muir, D.C.G., 2006. Biological monitoring of polyfluoroalkyl substances: A review. *Environmental Science and Technology* 40, 3463-3473.

- Jeon, J., Kannan, K., Lim, H.K., Moon, H.B., Kim, S.D., 2010a. Bioconcentration of perfluorinated compounds in blackrock fish, *Sebastes schlegeli*, at different salinity levels. *Environmental Toxicology and Chemistry* 29, 2529-2535.
- Jeon, J., Kannan, K., Lim, H.K., Moon, H.B., Ra, J.S., Kim, S.D., 2010b. Bioaccumulation of perfluorochemicals in pacific oyster under different salinity gradients. *Environmental Science and Technology* 44, 2695-2701.
- Kannan, K., Tao, L., Sinclair, E., Pastva, S.D., Jude, D.J., Giesy, J.P., 2005. Perfluorinated compounds in aquatic organisms at various trophic levels in a Great Lakes food chain. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 48, 559-566.
- Kelly, B.C., Ikonomou, M.G., Blair, J.D., Surridge, B., Hoover, D., Grace, R., Gobas, F.A.P.C., 2009. Perfluoroalkyl contaminants in an arctic marine food web: Trophic magnification and wildlife exposure. *Environmental Science and Technology* 43, 4037-4043.
- Labadie, P., Chevreuil, M., 2011. Partitioning behaviour of perfluorinated alkyl contaminants between water, sediment and fish in the Orge River (nearby Paris, France). *Environmental Pollution* 159, 391-397.
- Landrum, P.F., 1989. Bioavailability and toxicokinetics of polycyclic aromatic hydrocarbons sorbed to sediments for the amphipod *Pontoporeia hoyi*. *Environmental Science & Technology* 23, 588-595.
- Lasier, P.J., Washington, J.W., Hassan, S.M., Jenkins, T.M., 2011. Perfluorinated chemicals in surface waters and sediments from northwest Georgia, USA, and their bioaccumulation in *Lumbriculus variegatus*. *Environmental Toxicology and Chemistry* 30, 2194-2201.
- Lindstrom, A.B., Strynar, M.J., Libelo, E.L., 2011. Polyfluorinated Compounds: Past, Present, and Future. *Environmental Science & Technology* 45, 7954-7961.
- Liu, C., Gin, K.Y.H., Chang, V.W.C., Goh, B.P.L., Reinhard, M., 2011. Novel Perspectives on the Bioaccumulation of PFCs – the Concentration Dependency. *Environmental Science & Technology* 45, 9758-9764.
- Loi, E.I.H., Yeung, L.W.Y., Taniyasu, S., Lam, P.K.S., Kannan, K., Yamashita, N., 2011. Trophic Magnification of Poly- and Perfluorinated Compounds in a Subtropical Food Web. *Environmental Science & Technology* 45, 5506-5513.
- Martin, J.W., Whittle, D.M., Muir, D.C.G., Mabury, S.A., 2004. Perfluoroalkyl contaminants in a food web from lake Ontario. *Environmental Science & Technology* 38, 5379-5385.
- Miège, C., Roy, A., Labadie, P., Budzinski, H., Le Bizec, B., Vorkamp, K., Tronczynski, J., Persat, H., Coquery, M., Babut, M., 2012. Occurrence of priority and emerging organic substances in fishes from the Rhone river in the area of Lyon. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2721-2735.

- Myers, A.L., Crozier, P.W., Helm, P.A., Brimacombe, C., Furdui, V.I., Reiner, E.J., Burniston, D., Marvin, C.H., 2012. Fate, distribution, and contrasting temporal trends of perfluoroalkyl substances (PFASs) in Lake Ontario, Canada. *Environment International* 44, 92-99.
- Nakata, H., Kannan, K., Nasu, T., Cho, H.S., Sinclair, E., Takemura, A., 2006. Perfluorinated contaminants in sediments and aquatic organisms collected from shallow water and tidal flat areas of the Ariake Sea, Japan: Environmental fate of perfluorooctane sulfonate in aquatic ecosystems. *Environmental Science and Technology* 40, 4916-4921.
- Nania, V., Pellegrini, G.E., Fabrizi, L., Sesta, G., Sanctis, P.D., Lucchetti, D., Pasquale, M.D., Coni, E., 2009. Monitoring of perfluorinated compounds in edible fish from the Mediterranean Sea. *Food Chemistry* 115, 951-957.
- Nogaro, G., Mermillod-Blondin, F., Valett, M.H., François-Carcaillet, F., Gaudet, J.P., Lafont, M., Gibert, J., 2009. Ecosystem engineering at the sediment-water interface: Bioturbation and consumer-substrate interaction. *Oecologia* 161, 125-138.
- OECD, 2004. Sediment - Water Chironomid Toxicity Test Using Spiked Sediment, OECD Guidelines for the testing of chemicals, pp. 1-21.
- Péry, A.R.R., Mons, R., Flammarion, P., Lagadic, L., Garric, J., 2002. A modeling approach to link food availability, growth, emergence, and reproduction for the midge *Chironomus riparius*. *Environmental Toxicology and Chemistry* 21, 2507-2513.
- Prevedouros, K., Cousins, I.T., Buck, R.C., Korzeniowski, S.H., 2006. Sources, fate and transport of perfluorocarboxylates. *Environmental Science and Technology* 40, 32.
- R Development Core Team, 2013. R: A language and environment for Statistical computing, in: R Foundation for Statistical Computing (Ed.), Vienna.
- Renner, R., 2006. The long and the short of perfluorinated replacements. *Environmental Science and Technology*, 12-13.
- Spacie, A., Hamelink, J.L., 1985. Bioaccumulation, in: Rand, G.M., Petrocelli, S.R. (Eds.), *Fundamentals of Aquatic Toxicology*, pp. 495-519.
- Sun, H., Gerecke, A.C., Giger, W., Alder, A.C., 2011. Long-chain perfluorinated chemicals in digested sewage sludges in Switzerland. *Environmental Pollution* 159, 654.
- Theobald, N., Caliebe, C., Gerwinski, W., Hühnerfuss, H., Lepom, P., 2012. Occurrence of perfluorinated organic acids in the North and Baltic Seas. Part 2: distribution in sediments. *Environmental Science and Pollution Research*, 1-12.
- Thompson, J., Roach, A., Eaglesham, G., Bartkow, M.E., Edge, K., Mueller, J.F., 2011. Perfluorinated alkyl acids in water, sediment and wildlife from Sydney Harbour and surroundings. *Mar. Pollut. Bull.* 62, 2869-2875.
- Tomy, G.T., Budakowski, W., Halldorson, T., Helm, P.A., Stern, G.A., Friesen, K., Pepper, K., Tittlemier, S.A., Fisk, A.T., 2004.

Fluorinated organic compounds in an Eastern arctic marine food web. *Environmental Science and Technology* 38, 6475-6481.

Vatan , A., 1967. Manuel de sédimentologie. Technip, Paris.

Zushi, Y., Tamada, M., Kanai, Y., Masunaga, S., 2010. Time trends of perfluorinated compounds from the sediment core of Tokyo Bay, Japan (1950s–2004). *Environment and Pollution* 158, 756.

### 3 Synthèse et ouverture

Cette expérimentation de cinétique d'accumulation des PFASs chez le chironome à partir de sédiment naturel, nous a apporté plusieurs éléments de réponses aux questions posées : (i) les PFASs sont biodisponibles pour cet organisme à partir de ce sédiment, (ii) les cinétiques d'accumulation de 4 PFCAs (C<sub>11</sub> à C<sub>14</sub>), un sulfonate le PFOS et de deux précurseurs (FOSA et 6 :2 FTSA) ont été décrites, ces cinétiques atteignent un état stable et suivent un modèle exponentiel ; (iii) les voies d'expositions se font principalement via la nourriture mais pour 3 composés, le PFOS, le PUnA et le 6 :2 FTSA, elles se font également par voie tégumentaire via l'eau interstitielle du sédiment.

Ces résultats soulèvent plusieurs questions, notamment celle du modèle le mieux approprié à ces molécules amphiphiles et à cet organisme. En effet, derrière ce modèle exponentiel, plusieurs hypothèses sont possibles, est-ce que les PFASs s'accumulent dans l'organisme en suivant un système de partition à deux compartiments ? **ou** est-ce qu'un processus d'adsorption des molécules chimiques dans et/ou à la surface de l'organisme serait mieux approprié ?

Afin de répondre à ces questions, le chapitre 4, traite de l'élimination des PFASs chez le chironome et de la dépendance à la concentration à l'accumulation de ces substances, dans le but de déterminer un modèle de bioaccumulation adapté à la fois aux PFASs et aux chironomes.

## *Chapitre 4*

*Détermination des constantes  
d'accumulation et d'élimination des PFASs  
chez le chironome : développement d'un  
modèle de bioaccumulation*



## 1 Objectifs

Les objectifs de ce chapitre sont de comprendre quel modèle décrit le mieux la bioaccumulation des PFASs chez le chironome à partir du sédiment. Pour cela le chapitre 3 a montré que les cinétiques d'accumulation des PFASs chez le chironome suivaient un modèle exponentiel. Derrière ce modèle, deux principales théories existent : (i) un modèle de partition classique supposant une proportionnalité dans l'accumulation entre les concentrations présentes dans les sédiments et celles dans l'organisme, et (ii) l'existence possible d'une dépendance à la concentration sur l'accumulation supposant un modèle « adsorption-like » c'est à dire une adsorption des molécules à la surface et/ou dans l'organisme. Afin de comprendre quel modèle est le mieux adapté à cet organisme et à ces molécules, il est nécessaire de décrire les cinétiques d'élimination des PFASs chez le chironome et de tester l'hypothèse de la dépendance à la concentration en utilisant des sédiments dopés.

## 2 Refining PFAS uptake and depuration constants for *C. riparius* larvae: what can be learned from a simple model accumulation? (Publication 2)

### Résumé :

Le but de cette étude a été de déterminer les cinétiques d'élimination des composés perfluorés (PFASs) et d'affiner les constantes d'accumulation et de dépuration des PFASs pour *Chironomus riparius*. Les larves ont été exposées à du sédiment dopé et du sédiment naturel contaminé par des PFASs. Trois expérimentations ont été réalisées dans le but d'étudier l'accumulation et l'élimination de PFASs avec un mélange de perfluorooctane sulfonate (PFOS), de perfluorooctane sulfonamide (FOSA), d'acide perfluoroundécanoïque (PFUnA) et d'acide perfluorotridécanoïque (PFTrDA). Les résultats des cinétiques d'élimination indiquent une élimination complète pour tous les PFASs en 42h par le chironome. De plus, le test d'accumulation avec du sédiment dopé montre que seul l'accumulation et l'adsorption du PFTrDA est concentration-dépendante. Ces données ont été utilisées pour développer un modèle de bioaccumulation qui prend en compte la croissance linéaire du chironome et la dépendance à la concentration des PFASs. Les constantes d'accumulation et de dépuration ont également été déterminées.

**Mots clés :** Composés perfluoroalkyles, Sédiment, *Chironomus riparius*, Bioaccumulation.

## **Refining PFAS uptake and depuration constants for *C. riparius***

### **larvae: what can be learned from simple model accumulation?**

Delphine Bertin<sup>1</sup>, Benoît J. D. Ferrari<sup>1,2</sup>, Pierre Labadie<sup>3,4</sup>, Alexandre Sapin<sup>1</sup>, Débora Da Silva Avelar<sup>1</sup>, Rémy Beaudouin<sup>5</sup>, Alexandre Péry<sup>6</sup>, Jeanne Garric<sup>1</sup>, Hélène Budzinski<sup>3</sup>, Marc Babut<sup>1</sup>.

<sup>1</sup>Present address: IRSTEA, UR MALY, 5 rue de la Doua, CS 70077, F- 69626 Villeurbanne, France. E-mail address : [delphine.bertin@irstea.fr](mailto:delphine.bertin@irstea.fr) ; [jeanne.garric@irstea.fr](mailto:jeanne.garric@irstea.fr) ; [marc.babut@irstea.fr](mailto:marc.babut@irstea.fr)

<sup>2</sup>: Ecotox Center, Eawag-EPFL, EPFL-ENAC-IIIE-GE, Station 2, CH-1015 Lausanne, Switzerland.

E-mail address: [benoit.ferrari@centreecotox.ch](mailto:benoit.ferrari@centreecotox.ch)

<sup>3</sup>: Université Bordeaux, UMR 5805 EPOC (LPTC Research group), Université de Bordeaux, 351 Cours de la Libération, 33405 Talence, France. E-mail address : [pierre.labadie@u-bordeaux1.fr](mailto:pierre.labadie@u-bordeaux1.fr) ; [h.budzinski@epoc.u-bordeaux1.fr](mailto:h.budzinski@epoc.u-bordeaux1.fr)

<sup>4</sup>: CNRS, UMR 5805 EPOC (LPTC Research group), Université de Bordeaux, 351 Cours de la Libération, 33405 Talence, France.

<sup>5</sup>: Unité Modèles pour l'Ecotoxicologie et la Toxicologie (METO), Institut National de l'Environnement Industriel et des Risques (INERIS), BP2, F-60550 Verneuil en Halatte, France. E-mail address : [remy.beaudouin@ineris.fr](mailto:remy.beaudouin@ineris.fr)

<sup>6</sup>: AgroParisTech, E-mail address: [alexandre.pery@agroparistech.fr](mailto:alexandre.pery@agroparistech.fr)

## **Abstract**

The aims of this study were to determine perfluorinated compound (PFAS) elimination kinetics and to refine PFAS uptake and depuration constants for *Chironomus riparius*. Midge larvae were exposed to field and spiked natural sediment contaminated by PFAS. Three experiments were conducted to investigate the accumulation and elimination of PFASs with a mixture of perfluorooctane sulfonate (PFOS), perfluorooctane sulfonamid (FOSA), perfluoroundecanoic acid (PFUnA), and perfluorotridecanoic acid (PFTrDA). Elimination kinetics results indicated complete elimination for all PFASs in 42 h by chironomids. In addition, the accumulation test with spiked sediment showed that only PFTrDA uptake and adsorption are concentration-dependent. These data were used to develop a bioaccumulation model to account for chironomid linear growth and PFAS concentration dependency. Uptake and the depuration coefficient were also determined.

Keywords: Perfluoroalkyl compound; Sediment; *Chironomus riparius*; Bioaccumulation.

## **1. Introduction**

Polyfluoroalkyl and perfluoroalkyl substances (PFASs) are emerging compounds; their uses and properties induce their global distribution in the environment (Houde et al., 2011; Houde et al., 2006b; Prevedouros et al., 2006). The physico-chemical properties of PFASs vary substantially from other persistent organic pollutants (POPs), most particularly, they are amphiphilic, which makes measurement of the octanol-water partitioning coefficient impossible ( $K_{ow}$  usually predicts bioaccumulation). These particular physico-chemical characteristics make the comprehension of the bioaccumulation of this compound difficult. Several studies have shown the presence of PFASs in sediment (Ahrens et al., 2009; Bao et al., 2009; Bao et al., 2010; Higgins et al., 2005; Labadie and Chevreuil, 2011; Myers et al., 2012; Zushi et al., 2010). In addition, Martin et al. (2004b) have suggested that sediment is a

major source of PFAS contamination. However, PFAS transfer by sediment to biota is poorly understood. Only a few studies have provided evidence of bioaccumulation from sediment by benthic invertebrates (Bertin et al., 2014b; Higgins et al., 2007; Lasier et al., 2011). A previous study (Bertin et al., 2014b) described the contamination routes and the accumulation kinetics of PFASs from a field sediment from the Rhone River by a benthic invertebrate, the midge (*Chironomus riparius*). The chironomid's contamination routes are dual: one through the trophic pathway for all compounds accumulated (PFCAs C<sub>11</sub> to C<sub>14</sub>, PFOS, FOSA, and 6:2 FTSA) and another through the tegumentary pathway for the PFUnA, PFOS, and 6:2 FTSA, which are present in both interstitial water and chironomids. As for the accumulation kinetics, an exponential model has been applied. However, this exponential trend could be explained by two models: (i) the classical partition model (Higgins et al., 2007; Landrum, 1989), which assumes the PFAS concentrations in organisms and sediment are proportional; and (ii) an adsorption-like model (Liu et al., 2011), which hypothesizes that the kinetics are concentration-dependent. To refine the uptake and depuration constants and to gain a more detailed understanding of the processes underpinning the bioavailability of PFASs for chironomids, the models proposed must be tested to determine the most suitable for this context.

The study's aims were therefore to (i) describe PFAS elimination kinetics from chironomids, (ii) test the concentration dependency on PFAS bioaccumulation, and (iii) propose a bioaccumulation model adapted to these compounds and organisms in order to refine the kinetic constants. To validate the choice of the model, we exposed chironomids to both a relevant PFAS concentration in natural contaminated sediments and to natural sediment spiked at different concentrations of PFAS in order to test the concentration-dependency assumption.

## **2. Materials and Methods**

### 2.1 Chemicals

Standard PFAS solutions (PFC-MXA and PFS-MXA) were obtained from Wellington Laboratories (via BCP Instruments, Irigny, France). A working solution containing all analytes, each at approximately 0.1 ng.µL<sup>-1</sup>, was prepared in MeOH and stored at -18°C.

<sup>13</sup>C-labeled PFHxA, PFOA, PFDA, PFOS, and FOSA (each at 50 ng.µL<sup>-1</sup> in MeOH), <sup>2</sup>H (or D)-labeled MeFOSA, and EtFOSA were supplied by Wellington Laboratories and used as internal standards (ISs). A working solution was prepared in MeOH, containing each IS at 0.1 ng.µL<sup>-1</sup> (Table S1).

LC/MS-grade MeOH and acetonitrile (ACN) were purchased from J.T. Baker (France). Sodium acetate buffer (99%, ACS Reagent), ammonium hydroxide (28-30% in water), 0.2µm nylon centrifuge tube filters, and ENVI-Carb cartridges (6cc, 250 mg) were obtained from Sigma-Aldrich (St Quentin Fallavier, France), whereas Strata XAW (6cc, 200 mg) were purchased from (Le Pecq, France). Nitrogen (99%) was supplied by Air Liquide (Paris, France). Ultra-pure water was obtained using an Elix 10 purification system fitted with an EDS pack (Millipore, Guyancourt, France).

### 2.2 Field sediment

The study was conducted at Beurre Island, the same site as the previous study (Bertin et al., 2014b). This site is a fluvial annex of the Rhone River (eastern central France, N45°28'17.0"E4°46'43.4") and located downstream of a fluoropolymer manufacturing plant. Two campaigns were conducted in 2013 (February and November): 50 L of natural sediments were collected from the river bed with a Van-Veen grab, kept on ice, and brought to the

laboratory, where they were sieved at 2 mm, pooled in a polypropylene (PP) jar, and stored at 4°C.

### 2.3 Sediment spiking

Field sediments were spiked with PFOS, FOSA, PFUnA and PFTrDA solutions, purchased from Wellington Laboratories (via BCP Instruments, Irigny, France) at two concentrations (C1 and C2). The compounds were selected for their accumulation capacity by chironomids. In a further experiment, PFTrDA was added alone at one concentration (C3). For each concentration (Table S4), in a glass bottle, PFAS solutions (0.1 g.L<sup>-1</sup> in methanol) were added to 60% sediment and 20% groundwater (used in experimental aquaria). The bottles were mixed for 6 h; the sediment was then decanted for 48 h and the overlaying water was removed before being mixed for chironomid exposure (according to Dabrin et al., 2012).

### 2.4 *Chironomus riparius* accumulation and depuration tests

Chironomids were obtained from laboratory cultures according to standard methods (AFNOR, 2010; OCDE, 2004b). Experiments were conducted in the same laboratory conditions previously described by Bertin et al. (2014b). Briefly, L4 chironomids larvae (7-day-old larvae post-hatching) were exposed to field sediment covered with overlying water (OW) corresponding to groundwater mixed with osmosed water in order to reach a conductivity of 300 µS.cm<sup>-1</sup>. Each experiment was conducted at 21°C under a 16:8-h light-dark photoperiod. The OW was renewed four times per day to maintain adequate water quality and oxygenation. Ancillary parameters such as pH, concentration of dissolved oxygen, conductivity, NO<sub>2</sub><sup>-</sup>, and NH<sub>4</sub><sup>+</sup> were monitored once a week.

Three experiments were conducted with *C. riparius*: the (E1) accumulation test with field and spiked sediments and the (E2) elimination test with spiked sediments, and the (E3) characterization of the PFAS elimination kinetics with field sediment.

#### 2.4.1 Accumulation and depuration at several concentrations

For the accumulation test (E1), three aquaria (38 x 20 x 24.5 cm in polystyrene) were prepared with 4 L of homogenized sediment and 15 L of OW: one with field sediment, one with C1spiked sediment, and the last one with C2spiked sediment. In the same manner, three control aquaria were prepared with silica sand (particle size distribution: 90% 50-200  $\mu\text{m}$ , 10% <50  $\mu\text{m}$ ). A total of 2800 L4 larvae were added to exposed aquaria and control aquaria (400 in each aquaria). After 4 days of exposure, test and control chironomids were sacrificed ( $T_{\text{final}}$  and  $T_{\text{c}}$ , respectively) (experimental design is shown in Fig. S1).

For the elimination test (E2), two aquaria were prepared with 4 L of homogenized sediment spiked with PFTrDA (C3 spike level) with 15 L of OW. One control aquarium was prepared in the same manner with silica sand. A total of 2000 L4 larvae were added to the spiked-sediment aquaria (1000 in each aquarium) and 400 L4 larvae were added to the control aquarium. After 2 days of exposure, 400 larvae were sacrificed ( $T_1$ , accumulation point), the other larvae in spiked sediment aquaria were transferred to three aquaria containing silicate sand and groundwater for the depuration phase. The organisms were sacrificed after 6 h ( $T_2$ ), 18 h ( $T_3$ ), and 42 h ( $T_4$ ) of depuration; at  $T_4$  control organisms were sacrificed (experimental design is shown in Fig. S1).

#### 2.4.2 Depuration kinetics

In the third experiment (E3), *C. riparius* were exposed only to field sediment. Four aquaria (38 x 20 x 24.5 cm in polystyrene) were prepared with 4 L of homogenized field sediment and 15 L of OW. In the same manner, three control aquaria with silica sand were

prepared. A total of 2800 L4 larvae were added to field sediment aquaria and control aquaria (400 in each aquaria). After 2 days of exposure, the larvae in one sediment aquarium were sacrificed (T1, accumulation point) and the other larvae in aquaria sediment were transferred to three aquaria with silicate sand for the depuration phase. The organisms were sacrificed after 6 h (T2), 18 h (T3), and 42 h (T4) of depuration; at T4 control organisms were sacrificed (experimental design is shown in Fig. S2).

### 2.5 Sample collection and organism measurements

The OW was sampled in 1L polyethylene (PE) bottles and the pore water (PW) was sampled with a Rhizon® system (SDEC, Reignac-sur-Indre, France). The chironomids were collected by sieving the upper layer of sediment or silica at 500 µm; sub-samples from deeper sediment were deposited in PE tubes, and the organisms were cryopreserved in liquid nitrogen for PFAS analysis (about 800 mg ww, representing about 200 larvae) and stored at -21°C. Abiotic samples were frozen and kept at -21°C. For E2 and E3, the sediments were sampled at T0 and at T1. The organisms were sampled at T0 (before the test) and at each time (T1, T2, T3, T4 and T4 control). In the same manner, for the E1 experiment, the sediment and chironomids were sampled at T0 (before the test) and at T<sub>final</sub> and T<sub>c</sub>.

Chironomid survival, length, and weight were determined for each time. To determine the length, four groups of ten larvae were photographed and the mean sizes assessed using digital image analysis software (Jmicrovision, available free at <http://www.jmicrovision.com/>). The same groups were then weighed (weighing scales: Sartorius CPA225D, France) to obtain mean weights.

### 2.6 PFAS extraction

For OW, PW, and sediment samples, the PFAS extraction methods were similar to those described in Bertin et al. (2014b). For the chironomid samples, the method was adapted

with minor modifications: both neutral and acid analytes were eluted in a single fraction using methanol (MeOH) containing 0.2% NH<sub>4</sub>OH (30% in water). PFASs were analyzed on 800 mg wet weight (ww) for *C. riparius* and 120 mg dry weight for the fish reference matrix SRM 1947.

### 2.7 LC-MS/ MS analysis

PFASs were analyzed using an Agilent 1200 LC system (Agilent Technologies, Massy, France) interfaced with an Agilent 6460 triple quadrupole mass spectrometer (details in Table S2).

### 2.8 Quality control and methods performance

Analyte recovery was determined using spiked samples for each matrix (surface and pore water, sediment, and chironomids). Native PFAS recovery ranged from 50 to 123 % with a relative standard deviation below 30% (Table S3).

Replicate procedural blanks were analyzed for each series of samples. PFAS concentrations were blank-corrected when applicable. For compounds present in blanks, the limits of detection (LDs) were defined as three times the standard deviation of the blank, and the limits of quantification (LQs) were set at ten times the standard deviation of the blank. For analytes not detected in the blanks, LDs and LQs were determined as the concentration with a signal-to-noise ratio of 3 and 9, respectively. This was calculated on matrices spiked at 0.3-1.1 ng.g<sup>-1</sup> (sediment and *C. riparius*) and 0.7-1.4 ng.L<sup>-1</sup> (Vittel® mineral water samples) (Table S5). The PFASs measured in SRM 1947 Lake Michigan Fish Tissue and compared with the NIST value are presented in SI (Table S6).

### 2.9 Data analyses and modeling

#### 2.9.1: Data analyses

Data were checked for normality using the Shapiro-Wilk test and were analyzed using the Student *t*-test.

The biota-to-sediment accumulation factor when the steady state was reached (Ankley et al., 1992; Arnot and Gobas, 2006; Burkhard et al., 2012a) was calculated as follows:

$$BSAF_{exp} = \frac{C_{org}}{C_{sed}} \quad \text{Eq. (1)}$$

This ratio can also be determined according to the bioaccumulation model with the uptake and elimination constants:

$$BSAF_{model} = \frac{k_u}{k_e} \quad \text{Eq. (2)}$$

### 2.9.2 Modeling bioaccumulation

To the model bioaccumulation, experimental data were taken from accumulation kinetics in Bertin et al. (2014b) and from data provided for E2 and E3 experiments in the present study.

Assuming that the uptake and elimination of PFASs depended on the organisms' surface, the dynamic of PFAS quantity in the organism is defined as follows:

$$\frac{d(Q_{org})}{dt} = S_{org} \cdot k'_u \cdot C_{sed} - S_{org} \cdot k'_e \cdot C_{org} \quad \text{Eq. (3)}$$

where  $Q_{org}$  corresponds to the quantity of PFASs in or on (or both) the organism,  $S_{org}$  the surface of the chironomids,  $k'_u$  ( $\text{g} \cdot \text{g}_{\text{ww}} \cdot \text{mm}^{-2} \cdot \text{d}^{-1}$ ) and  $k'_e$  ( $\text{mm}^{-2} \cdot \text{d}^{-1}$ ) the uptake and elimination constants, respectively.  $C_{sed}$  ( $\text{ng} \cdot \text{g}^{-1}_{\text{dw}}$ ) and  $C_{org}$  ( $\text{ng} \cdot \text{g}^{-1}_{\text{ww}}$ ), the PFAS concentration in the sediment and in the organisms, respectively.

To take into account the dilution by growth, linear growth was applied as described by Péry et al. (2002), shown in Eq. 4

$$\frac{d(L)}{dt} = r \quad \text{Eq. (4)}$$

where  $r$  is the growth rate (cm.d<sup>-1</sup>).

The first equation of the model can be rearranged to predict the dynamics of the PFAS concentration in the chironomids (see the appendix for detail):

$$\frac{d(C_{org})}{dt} = \left( \frac{1}{L} \cdot k_u \cdot C_{sed} - \frac{1}{L} \cdot k_e \cdot C_{org} \right) - C_{org} \times \frac{d(V)}{dt} \times \frac{1}{V} \quad \text{Eq. (5)}$$

where  $V$  is the chironomid volume (unit).

Finally, PFAS uptake may or may not be concentration-dependent (Liu et al., 2011), so the  $S$  term was introduced:

$$S = n - C_{org} \quad \text{Eq. (6)}$$

with  $n$  representing the number of free binding sites. The final equation is therefore:

$$\frac{d(C_{org})}{dt} = \left( \frac{1}{L} \cdot k_u \cdot C_{sed} \cdot S - \frac{1}{L} \cdot k_e \cdot C_{org} \cdot S \right) - C_{org} \times \frac{d(V)}{dt} \times \frac{1}{V} \quad \text{Eq. (7)}$$

A half-life ( $T_{1/2}$ ) was determined with the model.

Details of the calculation are provided in the supplementary data.

Two different hypotheses were tested: (H1) concentration dependency and (H2) no concentration dependency. Four parameters (depending on the hypothesis) were optimized simultaneously by minimizing the weighted least squares between the simulated and observed data: the uptake and elimination coefficient ( $k_u$  and  $k_e$ ), the number of free binding sites ( $n$ ), and the growth rate ( $r$ ). For each hypothesis, the distance and the adjusted coefficient of determination ( $R^2$ ) were calculated. To weight the least-square method, the analytical error calculation relative to the spiked samples (Table S3) was used each time and for each

organism compound concentration, and the standard deviation of the length measures was used for each chironomid's growth time.

Model calculations, optimization and data analyses were performed with R (R Core Team, 2014) and the Integrated development environment for R : RStudio (Version 0.97.336) software.

### 3. Results

#### 3.1 Sediment contamination

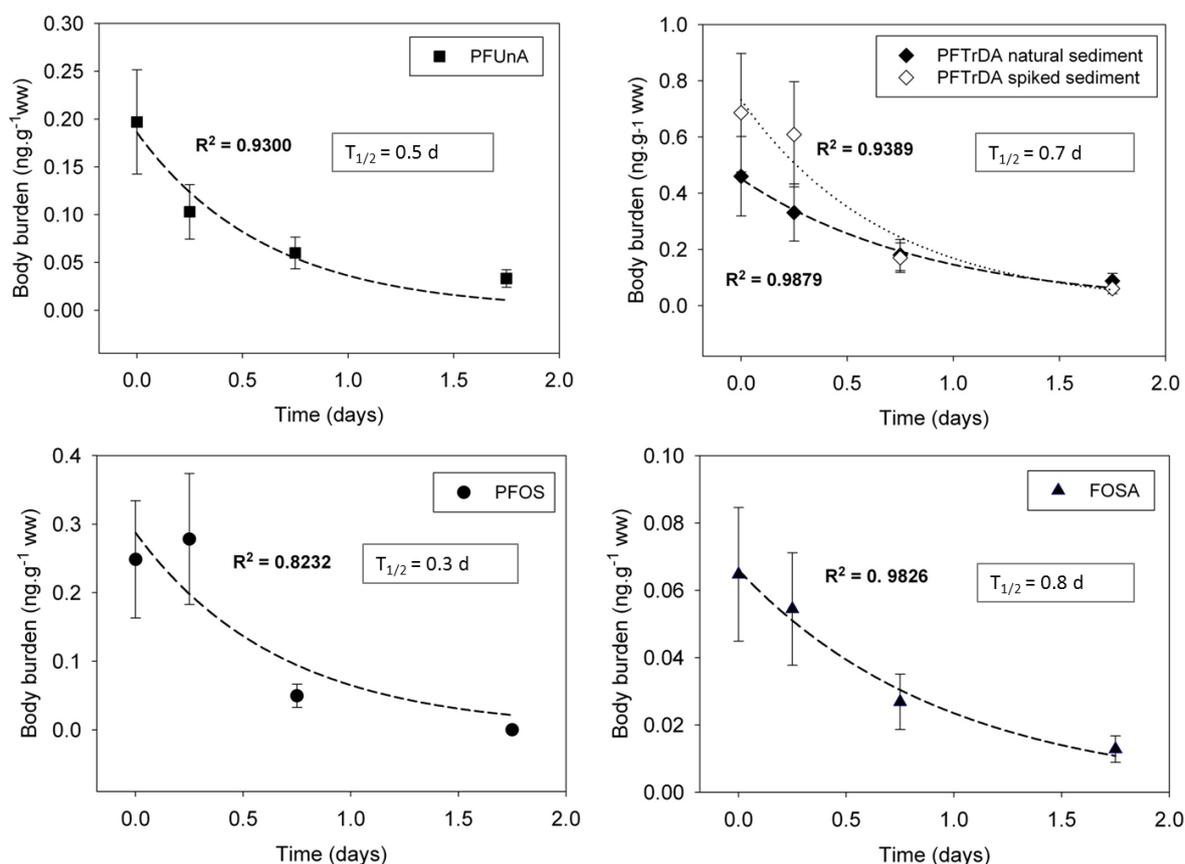
The shorter perfluoroalkyl chain compounds (PFOS and FOSA) were not significantly adsorbed on sediment particles. FOSA was not detected in either surface or interstitial water, while PFOS was observed in interstitial water at the same concentration as in the control aquaria. PFUnA [C0:  $0.909 \pm 0.260 \text{ ng.g}^{-1}_{\text{dw}}$ ; C1:  $0.913 \pm 0.127 \text{ ng.g}^{-1}_{\text{dw}}$ ; C2:  $1.009 \pm 0.052 \text{ ng.g}^{-1}_{\text{dw}}$ ]; differences between spiked and non-spiked sediments were not significant. In other words, spiking did not enrich the sediment particles with PFUnA (Fig. S3). Concentrations of PFUnA varied between  $2.9 \pm 0.4 \text{ ng.L}^{-1}$  (C0),  $6.6 \pm 1.0 \text{ ng.L}^{-1}$  (C1), and  $3.7 \pm 0.5 \text{ ng.L}^{-1}$  (C2) in pore water, while those observed in overlying water varied between  $0.21 \pm 0.02 \text{ ng.L}^{-1}$  (C0) and  $0.74 \pm 0.07 \text{ ng.L}^{-1}$  (C2). Although the spiking did not work well for PFUnA, an increase in the concentration in pore water was induced. The PFTrDA was adsorbed to sediment particles for each spiked concentration [ $1.673 \pm 0.481 \text{ ng.g}^{-1}_{\text{dw}}$  (C01);  $5.830 \pm 0.722 \text{ ng.g}^{-1}_{\text{dw}}$  (C1);  $10.782 \pm 0.640 \text{ ng.g}^{-1}_{\text{dw}}$  (C2), and  $1.642 \pm 0.034 \text{ ng.g}^{-1}_{\text{dw}}$  (C02);  $3.656 \pm 0.476 \text{ ng.g}^{-1}_{\text{dw}}$  (C3); Fig.S4; Table S6].

#### 3.2 Chironomids

For E1, chironomid survival at each condition was 97.0%, 92.8%, and 96.0% for the test (field sediment, C1 and C2, respectively) and  $97.1 \pm 2.9\%$  for the control sample. For E2 and E3, chironomid survival was  $96.4 \pm 2.6\%$  and  $62.8 \pm 17.7\%$  for the test and 81.9% and

91.1 ± 4.0% for the control sample, respectively. The larvae length data fit well a linear growth model ( $R^2 = 0.798$ ) (Fig. S5).

The chironomids accumulated two long perfluoroalkyl chains (PFUnA and PFTrDA), one perfluoroalkyl sulfonate (PFOS), and one precursor (FOSA). For all compounds, PFAS elimination was nearly complete in 42 h. There was no significant difference between the PFTrDA elimination rate from natural and spiked sediments. The half-life ( $T_{1/2}$ ) showed rapid elimination for all PFASs (between 7.2 and 19.2 h). PFAS concentration data were fit with an exponential decrease model (Fig. 1).



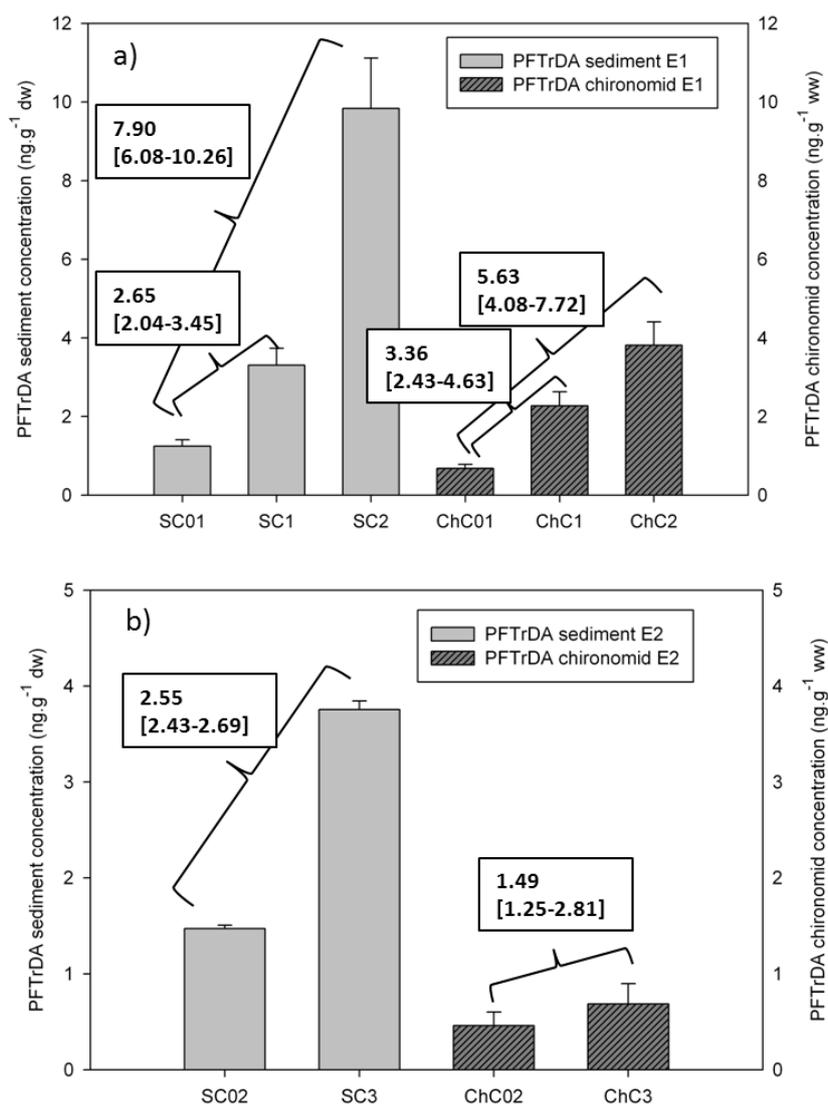
**Figure 1:** Elimination kinetics of PFASs in chironomids with field sediment for each PFAS and with spiked sediment for the PFTrDA,  $T_{1/2}$  corresponding to half-life of PFAS elimination,  $p$ -value for PFUnA = 0.0356,  $p$ -value for PFTrDA field sediment = 0.0061 and for PFTrDA spiked sediment = 0.0310,  $p$ -value for PFOS = 0.0927,  $p$ -value for FOSA = 0.0087.

The  $BSAF_{exp}$  were determined for PFTrDA on the basis of measured concentrations but without correcting for lipid content and organic carbon (Table 1). These results showed a decrease of  $BSAF$  as the concentration increased, except for the C1 exposure concentration in the E1 experiment, like the results observed by Liu et al. (2011) who used a green mussel (*Perna viridis*) exposed to PFASs via the dissolute phase (spiked water).

**Table 1:**  $BSAF_{exp}$  for each PFTrDA-spiked concentration in the E1 and E2 experiments.

Experiments	Concentrations	$BSAF_{exp}$
E1	C01	0.544
	C1	0.688
	C2	0.388
E2	C02	0.313
	C3	0.183

Whatever the experiment (E1 or E2), the increase of PFTrDA concentration in chironomids exposed to field and spiked sediments was much less pronounced than the concentration increase in sediments (Fig. 2). In fact, there was no linear relation between the PFTrDA concentrations in chironomids and the PFTrDA concentration in sediment because there were no increasing concentrations in chironomids. For PFUnA, the results showed the same concentrations in chironomids for each exposure concentration (C01:  $0.22 \pm 0.02 \text{ ng.g}^{-1}_{ww}$ ; C1:  $0.26 \pm 0.02 \text{ ng.g}^{-1}_{ww}$ ; C2:  $0.29 \pm 0.03 \text{ ng.g}^{-1}_{ww}$ ), even though the PFUnA concentration increased as the spike level in PW increased.

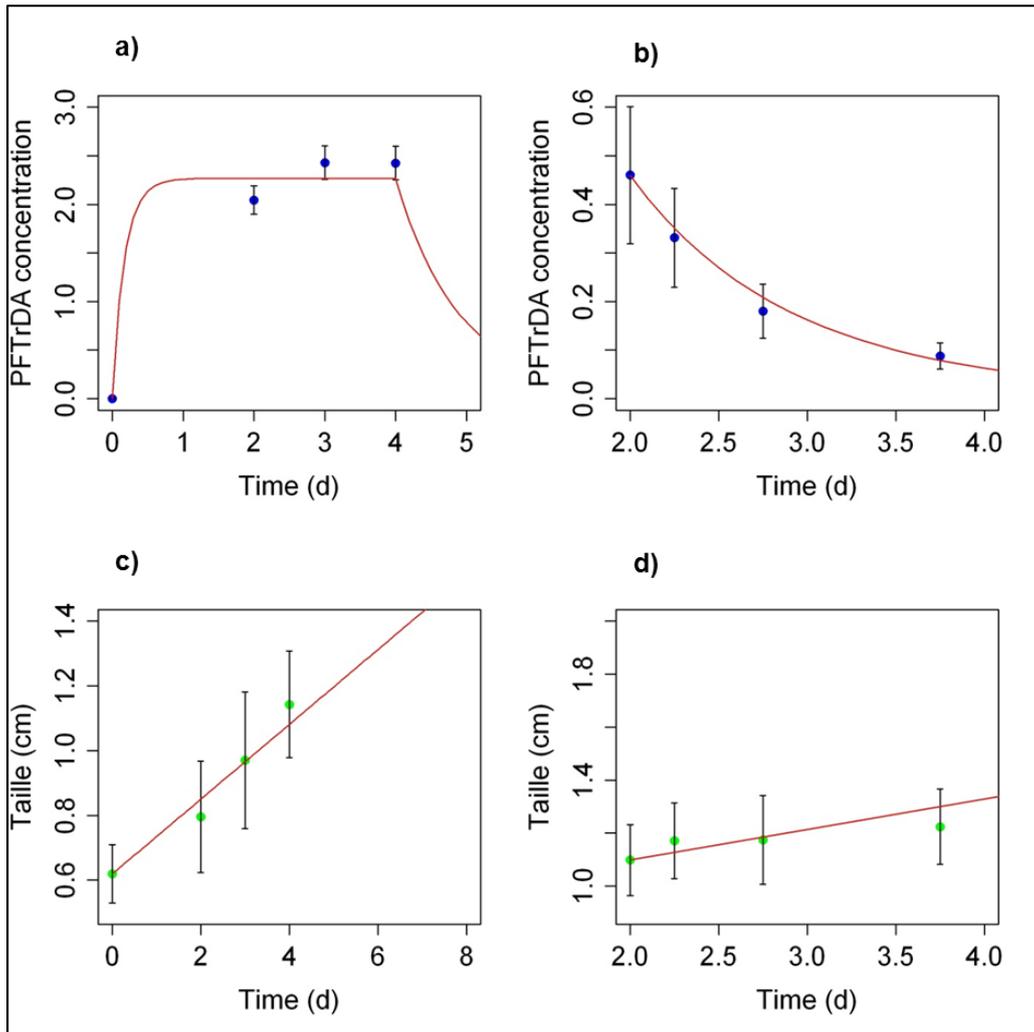


**Figure 2:** Differences between concentration of exposure (S) and concentration in organisms (Ch) after exposure for E1 at Tfinal (a) and E2 at T1; (b) experiments for each exposure condition (C0, C1, C2, and C3 concentrations in sediments). The concentrations in sediments and in chironomids are expressed in ng.g<sup>-1</sup><sub>dw</sub> and in ng.g<sup>-1</sup><sub>ww</sub>, respectively. The numbers between the histogram bars correspond to the concentration ratio between the C0 and Cspike levels.

### 3.3 Model outcomes

The model parameters ( $k_u$ ,  $k_e$  and  $n$ ) were optimized simultaneously. Table 2 provides the distances and  $R^2$  adjusted values for each model hypothesis and each compound. The PFTrDA compound is the only compound for which concentration dependency was observed. Therefore, the distance and  $R^2$  adjusted values for the hypotheses including the S term (H1)

were calculated only for this PFAS. The distance and adjusted R2 model results showed no differences with or without the concentration dependency (S term) (Fig. 3 and Fig. S6). The results obtained, all hypotheses and molecules together, showed a good fit between the observed and the simulated data.



**Figure 3:** PFTTrDA modeling with the H1 hypothesis (concentration dependency); a) and b) are the chironomid concentration ( $\text{ng.g}^{-1}_{\text{ww}}$ ) during the accumulation and the elimination parts (respectively); c) and d) are the chironomid growth (cm) during the accumulation and the elimination parts (respectively). The red lines are the simulated data and the dots are the observed data.

**Table 2 :** Results of the adjusted determination coefficient (adjusted R<sup>2</sup>) and distance calculations for the two assumptions and each molecule. N corresponds to the number of data, P the number of parameters.

Hypotheses	PFASs	N	P	Distance	Adjusted R <sup>2</sup>
H1	PFTrDA	8	4	1.269	0.942
H2	PFUnA	8	3	1.346	0.973
	PFTrDA	8	3	0.970	0.974
	PFOS	8	3	1.373	0.648
	FOSA	8	3	2.768	0.937

The experimental data allowed us to choose the H1 hypothesis for PFTrDA; the results of uptake and the elimination coefficient are presented in Table 3.

**Table 3:** Parameters optimized for each PFAS with model hypotheses H1 for the PFTrDA and H2 for the other molecules, and the BSAF calculation ( $BSAF = k_u/k_e$ )

parameters	PFTrDA	PFUnA	PFOS	FOSA
$k_u$ (g.g <sub>ww</sub> .h <sup>-1</sup> )	0.04	0.03	0.05	0.08
$k_e$ (h <sup>-1</sup> )	0.04	0.05	0.09	0.03
n	3.47			
BSAF	1.08	0.63	0.60	2.99

## 4. Discussion

### 4.1 Uptake and elimination kinetics

PFAS elimination by chironomids is quick even after the growth model correction; indeed, the elimination coefficient varied between 0.03 h<sup>-1</sup> and 0.09 h<sup>-1</sup> or 0.67 d<sup>-1</sup> and 2.12 d<sup>-1</sup> (Table 3). The  $k_e$  values calculated in the present study (0.03-0.09 h<sup>-1</sup>) are close to the  $k_e$  determined in a previous study (Bertin et al., 2014b) and calculated using a partition model (Higgins et al., 2007; Landrum, 1989) with a growth correction (Spacie and Hamelink, 1985): 0.02-0.04 h<sup>-1</sup>. However, the uptake coefficients computed in the present study are higher than those calculated in (Bertin et al., 2014b): 0.02-0.08 g.g<sub>ww</sub>.h<sup>-1</sup> and 0.0009-0.0022 g.g<sub>ww</sub>.h<sup>-1</sup> respectively. This difference in  $k_u$  values may be explained by the growth dilution factor. In our previous study, growth dilution was corrected for elimination only (according to Spacie

and Hamelink, 1985), which could lead to underestimating the uptake coefficient, also depending on the surface of the organism. However, in the present study, the model proposed for each PFAS takes into account the growth dilution for both uptake and elimination with the length of the organisms introduced in each term of the model equation (Eq. 5). In addition,  $k_u$  and  $k_e$  were estimated from the same experimental dataset. In comparison with the uptake and elimination coefficient obtained by Higgins et al. (2007),  $k_u$  and  $k_e$  obtained in the present study are lower than those calculated by (Higgins et al., 2007) ( $k_u$  and  $k_e$  in Higgins et al. (2007) ranged from  $10.7 \cdot 10^4$  to  $19.3 \cdot 10^4$   $g_{oc} \cdot g_{ww} \cdot h^{-1}$  and from  $6.8 \cdot 10^4$  to  $36.8 \cdot 10^4$   $h^{-1}$ , respectively), but in the present study the uptake coefficients were not normalized by the organic carbon contained in sediment, and the exposure concentrations were lower than those used by (Higgins et al., 2007). However, the biota-to-sediment factor derived from the model ( $BSAF_{model}$ ) seems to show an increase with the PFCA carbon fluorinated length chain (PFUnA: 0.63 and PFTrDA: 1.08), which is in good agreement with Lasier et al. (2011) but differs from conclusions by Bertin et al. (2014b). The same observation is shown with the  $BSAF_{exp}$  calculation (PFUnA: 0.27 and PFTrDA: 0.31), but the values are lower than those calculated from the model: the growth dilution is not taken into account for the  $BSAF_{exp}$  calculation, which may explain these differences.

#### 4.2 Exposure routes and adsorption mechanism

The spiked sediment results showed the differences that may exist between the molecule affinities with the sediment particles. The sediment-water distribution coefficient ( $K_d$ ) increased with the chain length and was higher for PFCA than PFSA (Kwadijk et al., 2010). Therefore, added FOSA and PFOS, which are more hydrophilic, were removed with the overlying water at the end of the spiking process, whereas PFTrDA which is more hydrophobic, was found in association with the sediment particles. However the mixing time required for spiked sediment could be longer, as in the study reported by Higgins et al.

(2007), but the sediment characteristics are not the same (details given in supplementary data).

The accumulation tests with field sediment and spike sediment provide a better understanding of the organisms' exposure pathway. Indeed, PFTrDA present on sediment particles in the field and spiked sediment favor the food pathway, whereas PFUnA is present in the same quantity on sediment particles in field sediment and spiked sediment but at a higher concentration in interstitial water for the spiked sediment. The chironomid accumulation results show no difference between the chironomid exposed to field sediment and PFUnA-spiked sediment. In Bertin et al. (2014b), we concluded that a double pathway exists for PFUnA (trophic and tegumentary) because the results showed the PFUnA presence in pore water and on sediment particles, but the results obtained in the present study suggest the predominance of the trophic pathway for the PFUnA and PFTrDA uptake by *C. riparius*. This clarifies the importance of the exposure pathway on the PFAS bioaccumulation.

Liu et al. (2011) showed a concentration dependency for the uptake of four PFASs (PFOS, PFOA, PFNA, and PFDA) through direct exposure from the water. However, the question of exposure realism is raised because the laboratory exposure was conducted in water without suspended matter for green mussels preventing a trophic pathway. Here, in view of the sediment spiking results, conclusions can be drawn only for PFTrDA, which seems to be concentration-dependent. Therefore, the PFTrDA bioaccumulation mechanism seems to be adsorption for the chironomid.

## **5. Conclusion**

The models tested herein are advantageous in that they can integrate concentration dependency (number of free binding sites,  $n$ ) and simultaneously optimize the uptake coefficient, the elimination coefficient, and the chironomid growth rate, in contrast to several

studies that used a bioaccumulation model and calculated the uptake and elimination coefficient from two different equations (Higgins et al., 2007; Higgins et al., 2009; Van Geest et al., 2011). In the future, a biodynamic model that can determine three parameters, the uptake rate from food, the uptake rate of substance in water, and the loss rate (Luoma and Rainbow, 2005) could be used for the chironomid. This model would accommodate the two PFAS contamination pathways, but the biodynamic model adapted to chironomids remains to be validated.

### **Acknowledgements**

### **References**

AFNOR, 2010. Determination of the toxicity of fresh water sediments to Chironomous riparius - Part 1 : natural sediments Water quality

Ahrens, L., Yamashita, N., Yeung, L.W.Y., Taniyasu, S., Horii, Y., Lam, P.K.S., Ebinghaus, R., 2009. Partitioning Behavior of Per- and Polyfluoroalkyl Compounds between Pore Water and Sediment in Two Sediment Cores from Tokyo Bay, Japan. *Environmental Science & Technology* 43, 6969-6975.

Ankley, G.T., Cook, P.M., Carlson, A.R., Call, D.J., Swenson, J.A., Corcoran, H.F., Hoke, R.A., 1992. Bioaccumulation of PCBs from Sediments by Oligochaetes and Fishes: Comparison of Laboratory and Field Studies. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 49, 2080-2085.

Arnot, J.A., Gobas, F.A.P.C., 2006. A review of bioconcentration factor (BCF) and bioaccumulation factor (BAF) assessments for organic chemicals in aquatic organisms. *Environ. Rev.* 14, 40.

Bao, J., Jin, Y., Liu, W., Ran, X., Zhang, Z., 2009. Perfluorinated compounds in sediments from the Daliao River system of northeast China. *Chemosphere* 77, 652-657.

Bao, J., Liu, W., Liu, L., Jin, Y., Ran, X., Zhang, Z., 2010. Perfluorinated compounds in urban river sediments from Guangzhou and Shanghai of China. *Chemosphere* 80, 123-130.

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

- Burkhard, L.P., Arnot, J.A., Embry, M.R., Farley, K.J., Hoke, R.A., Kitano, M., Leslie, H.A., Lotufo, G.R., Parkerton, T.F., Sappington, K.G., Tomy, G.T., Woodburn, K.B., 2012. Comparing laboratory- and field-measured biota-sediment accumulation factors. *Integrated Environmental Assessment and Management* 8, 32-41.
- Dabrin, A., Durand, C.L., Garric, J., Geffard, O., Ferrari, B.J.D., Coquery, M., 2012. Coupling geochemical and biological approaches to assess the availability of cadmium in freshwater sediment. *Science of The Total Environment* 424, 308-315.
- Higgins, C.P., Field, J.A., Criddle, C.S., Luthy, R.G., 2005. Quantitative determination of perfluorochemicals in sediments and domestic sludge. *Environmental Science and Technology* 39, 3946-3956.
- Higgins, C.P., McLeod, P.B., Macmanus-Spencer, L.A., Luthy, R.G., 2007. Bioaccumulation of perfluorochemicals in sediments by the aquatic oligochaete *Lumbriculus variegatus*. *Environmental Science and Technology* 41, 4600-4606.
- Higgins, C.P., Paesani, Z.J., Chalew, T.E.A., Halden, R.U., 2009. Bioaccumulation of triclocarban in *Lumbriculus variegatus*. *Environmental Toxicology and Chemistry* 28, 2580-2586.
- Houde, M., De Silva, A.O., Muir, D.C.G., Letcher, R.J., 2011. Monitoring of Perfluorinated Compounds in Aquatic Biota: An Updated Review. *Environmental Science & Technology* 45, 7962-7973.
- Houde, M., Martin, J.W., Letcher, R.J., Solomon, K.R., Muir, D.C.G., 2006. Biological monitoring of polyfluoroalkyl substances: A review. *Environmental Science and Technology* 40, 3463-3473.
- Kwadijk, C.J.A.F., Korytár, P., Koelmans, A.A., 2010. Distribution of perfluorinated compounds in aquatic systems in the netherlands. *Environmental Science and Technology* 44, 3746-3751.
- Labadie, P., Chevreuil, M., 2011. Partitioning behaviour of perfluorinated alkyl contaminants between water, sediment and fish in the Orge River (nearby Paris, France). *Environmental Pollution* 159, 391-397.
- Landrum, P.F., 1989. Bioavailability and toxicokinetics of polycyclic aromatic hydrocarbons sorbed to sediments for the amphipod *Pontoporeia hoyi*. *Environmental Science & Technology* 23, 588-595.
- Lasier, P.J., Washington, J.W., Hassan, S.M., Jenkins, T.M., 2011. Perfluorinated chemicals in surface waters and sediments from northwest Georgia, USA, and their bioaccumulation in *Lumbriculus variegatus*. *Environmental Toxicology and Chemistry* 30, 2194-2201.
- Liu, C., Gin, K.Y.H., Chang, V.W.C., Goh, B.P.L., Reinhard, M., 2011. Novel Perspectives on the Bioaccumulation of PFCs – the Concentration Dependency. *Environmental Science & Technology* 45, 9758-9764.

- Luoma, S.N., Rainbow, P.S., 2005. Why Is Metal Bioaccumulation So Variable? Biodynamics as a Unifying Concept. *Environmental Science & Technology* 39, 1921-1931.
- Martin, J.W., Whittle, D.M., Muir, D.C.G., Mabury, S.A., 2004. Perfluoroalkyl contaminants in a food web from lake Ontario. *Environmental Science & Technology* 38, 5379-5385.
- Myers, A.L., Crozier, P.W., Helm, P.A., Brimacombe, C., Furdui, V.I., Reiner, E.J., Burniston, D., Marvin, C.H., 2012. Fate, distribution, and contrasting temporal trends of perfluoroalkyl substances (PFASs) in Lake Ontario, Canada. *Environment International* 44, 92-99.
- OCDE, 2004. Sediment - Water Chironomid Toxicity Test Using Spiked Sediment, OECD Guidelines for the testing of chemicals, pp. 1-21.
- Péry, A.R.R., Mons, R., Flammarion, P., Lagadic, L., Garric, J., 2002. A modeling approach to link food availability, growth, emergence, and reproduction for the midge *Chironomus riparius*. *Environmental Toxicology and Chemistry* 21, 2507-2513.
- Prevedouros, K., Cousins, I.T., Buck, R.C., Korzeniowski, S.H., 2006. Sources, fate and transport of perfluorocarboxylates. *Environmental Science and Technology* 40, 32.
- R Core Team, 2014. R: A Language and Environment for Statistical Computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria.
- Spacie, A., Hamelink, J.L., 1985. Bioaccumulation, in: Rand, G.M., Petrocelli, S.R. (Eds.), *Fundamentals of Aquatic Toxicology*, pp. 495-519.
- Van Geest, J.L., MacKay, D., Poirier, D.G., Sibley, P.K., Solomon, K.R., 2011. Accumulation and depuration of polychlorinated biphenyls from field-collected sediment in three freshwater organisms. *Environmental Science and Technology* 45, 7011-7018.
- Zushi, Y., Tamada, M., Kanai, Y., Masunaga, S., 2010. Time trends of perfluorinated compounds from the sediment core of Tokyo Bay, Japan (1950s–2004). *Environment and Pollution* 158, 756.

### **3 Synthèse et ouverture**

Les résultats des cinétiques d'élimination des PFASs par le chironome ont montré une rapide et complète élimination en 42h pour tous les composés accumulés par cet organisme. En ce qui concerne les tests de dépendance à la concentration effectués pour le PFUnA, le PFTrDA, le PFOS et le FOSA, ces derniers, ont permis de nous prononcer sur l'existence possible d'une dépendance à la concentration uniquement pour le PFTrDA. A partir des résultats expérimentaux obtenus, un modèle de bioaccumulation a été défini, pour le PFTrDA il s'agit d'un modèle « adsorption like » prenant en compte la dépendance à la concentration et pour les autres substances il s'agit d'un modèle de partition à deux compartiments. Les avantages du modèle de bioaccumulation appliqué au cas du chironome et des PFASs, sont : la possibilité d'intégrer la dépendance à la concentration, ou non, en fonction des substances, de pouvoir optimiser les constantes d'accumulation ( $k_u$ ) et d'élimination ( $k_e$ ) de manière simultanée mais aussi de pouvoir y intégrer la dilution par la croissance liée à la physiologie de l'organisme.



## *Chapitre 5*

*Evaluation de la variabilité interspécifique  
vis-à-vis de la bioaccumulation des PFASs:  
utilisation d'un amphipode d'eau douce, le  
gammare*



## **1 Objectifs**

Les différences d'accumulation des PFASs entre le chironome et un oligochète, *Lumbriculus variegatus* (Higgins et Lasier) ont mis en évidence l'importance que la variabilité interspécifique via le mode de nutrition, le mode de vie de l'organisme, peuvent avoir, sur la bioaccumulation des PFASs. L'objectif de ce chapitre est donc de décrire dans un premier temps les cinétiques d'accumulation et d'élimination des PFASs en utilisant un autre organisme épi-benthique, le gammare, à partir de sédiment naturel. Puis dans un deuxième temps, de décrire la ou les voies de contamination chez cet organisme. Afin de pouvoir, en finalité, commenter les différences et les ressemblances d'accumulation et d'élimination des PFASs entre ces deux organismes benthiques : le chironome et le gammare. Car en effet, ces organismes ont un mode de nutrition, un mode de vie bien différent l'un de l'autre, le chironome vit et se nourrit exclusivement dans le sédiment, tandis que le gammare est un organisme détritivore et a un contact plus ponctuel avec le sédiment. Ce chapitre a donc pour but, via les différences de comportement de ces deux invertébrés benthiques, d'évaluer l'effet de la variabilité interspécifique sur la bioaccumulation des PFASs.

## **2 Accumulation of poly- and per- fluororoalkyl compounds (PFAS) by a freshwater amphipod: *Gammarus sp.* (Crustacea) (Publication 3)**

### **Résumé:**

Les gammares ont été exposés à des sédiments provenant d'un site d'échantillonnage se trouvant sur le Rhône en aval d'un site industriel rejetant des composés perfluorés. Les organismes ont accumulé quatre acides perfluoroalkyle carboxylates (PFCA) à longue chaîne de C9 à C13, un sulfonate, le perfluorooctane sulfonate (PFOS), trois précurseurs et un fluorotélomère. L'accumulation des PFASs n'a pas atteint l'état stable après 3 semaines et l'élimination a été presque complète pour le PFOS, les trois précurseurs et le fluorotélomère, mais pas pour les PFCAs à longue chaîne où le temps de dépuración augmente avec la

longueur de chaîne. L'accumulation des PFASs a lieu via la voie trophique et via la voie respiratoire. Les cinétiques suivent un modèle de partition à partir duquel des coefficients d'accumulation et d'élimination ont été dérivés.

**Mots clés:** Bioaccumulation, Gammare, Composés perfluorés, Sédiment.

**Accumulation of poly- and perfluoroalkyl compounds (PFAS) by  
a freshwater amphipod : *Gammarus sp.* (Crustacea)**

Delphine Bertin<sup>1</sup>, Pierre Labadie<sup>2</sup>, Benoît J. D. Ferrari<sup>1,3</sup>, Alexandre Sapin<sup>1</sup>, Jeanne Garric<sup>1</sup>,  
Olivier Geffard<sup>1</sup>, Hélène Budzinski<sup>2</sup>, Marc Babut<sup>1</sup>.

<sup>1</sup>Present address: IRSTEA, UR MALY, 5 rue de la Doua, CS 70077, F- 69626 Villeurbanne,  
France.

E-mail address: [delphine.bertin@irstea.fr](mailto:delphine.bertin@irstea.fr) ; [jeanne.garric@irstea.fr](mailto:jeanne.garric@irstea.fr) ; [olivier.geffard@irstea.fr](mailto:olivier.geffard@irstea.fr);  
[marc.babut@irstea.fr](mailto:marc.babut@irstea.fr)

<sup>2</sup>: Université Bordeaux 1, Environnements et Paléoenvironnements Océaniques et  
Continentalux (EPOC), UMR 5805 CNRS, Laboratoire de Physico- et Toxicologie Chimie de  
l'environnement (LPTC), 351 cours de la Libération, 33405 Talence, France.

E-mail address: [pierre.labadie@u-bordeaux1.fr](mailto:pierre.labadie@u-bordeaux1.fr) ; [h.budzinski@epoc.u-bordeaux1.fr](mailto:h.budzinski@epoc.u-bordeaux1.fr)

<sup>3</sup>: Centre ecotox, EPFL ENAC IIE-GE, GR B0 391/392, Station 2, CH-1015 Lausanne,  
Switzerland.

E-mail address: [benoit.ferrari@centreecotox.ch](mailto:benoit.ferrari@centreecotox.ch)

## Abstract

Gammarids were exposed to sediments from a deposition sampled at a site along the Rhône River (France) downstream of an industrial site releasing various perfluorinated chemicals. The organisms accumulated four long-chain perfluorocarboxylic acids (PFCAs) from C<sub>9</sub> to C<sub>13</sub>, one sulfonate, perfluorooctane sulfonate (PFOS), three precursors and one fluorotelomere. The PFAS accumulation did not reach a steady state after 3 weeks and the elimination was almost complete for PFOS, the three precursors and the fluorotelomere, but not for the long-chains PFCAs where the depuration time increased with the chain length. PFAS accumulation occurs via the trophic and the respiration pathways. The kinetics follow a partition model from which uptake and the elimination coefficient were derived.

**key words:** bioaccumulation, gammarid, perfluorinated compounds, sediment.

## 1. Introduction

Per- and polyfluoroalkyl compounds (PFASs) are present in all media (water, sediment, biota, humans) and are found in polar regions, suggesting a large-scale distribution (Giesy and Kannan, 2001; Houde et al., 2006a; Houde et al., 2011). Several studies have shown PFASs' bioaccumulation and biomagnification capacity, and some authors suggest that sediment is a PFAS source (Armitage et al., 2006; Loi et al., 2011; Martin et al., 2004b). In 2009, perfluorooctane sulfonate (PFOS) and related compounds were registered under Annex B of the Stockholm Convention on Persistent Organic Pollutants. They are also registered on the priority substances list of the European Water Framework Directive.

Little is known about the PFAS transfer from sediment to benthic organisms. Two studies using the benthic invertebrate, *Lumbriculus variegatus*, have shown PFAS transfer

from sediment. Indeed, this oligochaete accumulated seven perfluoroalkyl carboxylic acids (PFCA) from C<sub>7</sub> to C<sub>14</sub> and three perfluoroalkane sulfonates (PFBS, PFDS and PFOS) (Higgins et al., 2007; Lasier et al., 2011). However, the PFAS pathways and the factors influencing PFAS bioaccumulation have not been described. Two field studies with midge (*Chironomus riparius*) larvae exposed to natural sediment have shown rapid accumulation and elimination of several PFASs (Bertin et al., 2014a; Bertin et al., 2014b). This organism is in direct contact with sediment, and accumulation occurs through food and interstitial water (Bertin et al., 2014b). Chironomid BSAFs were lower than BSAFs reported by Higgins et al. (2007) and Lasier et al. (2011). This could be explained by the food added in chironomid experiments, which decreased the exposure and diluted the contamination, and by the difference in feeding habits between the two organisms. The effect of the organisms' lifestyle on the PFAS bioaccumulation is not known. Therefore, in the present study, another benthic invertebrate, *Gammarus sp.*, with a lifestyle differing from the chironomid, was used to better understand this possible effect. *Gammarus sp.* is a freshwater invertebrate widely used in ecotoxicology. The gammarid is a widespread epi-benthic organism, in the northern hemisphere. Furthermore, this organism is an important food source for fish, amphibians and birds (MacNeil et al., 1999). It plays an important role in the nutrient cycle in its shredder feeding mode that redistributes the organic matter in the environment. In addition to its shredder feeding mode, gammarids graze organic biofilm, feed on fine organic matter particulates from sediment deposits, filter suspended organic matter and are predators (MacNeil et al., 1997).

The objectives of this study were to (i) describe the accumulation and elimination kinetics of PFASs from natural sediment to gammarids, (ii) understand the contamination route for gammarid and (iii) compare this bioaccumulation in gammarids and chironomids obtained in

previous studies to better understand the effect of the organism's behavior on PFAS bioaccumulation.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Sediments

Approximately 60 L of sediment was sampled from the river bed of a deposition site 40 km downstream of a fluoropolymer manufacturing plant (Dauchy et al., 2012) with a Van-Veen grab in October 2013. They were sieved at 2 mm, pooled in a polypropylene (PP) jar and kept on ice and stored at 4°C in the laboratory. Twelve aquaria (38 x 20 x 24.5 cm in polystyrene) were prepared with 4 L of homogenized sediment and 15 L of groundwater with 400-500  $\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$  conductivity. Each aquarium was allowed to settle for 1 week before introducing the gammarids. Twelve aquaria were prepared with only groundwater for the controls.

### 2.2. Collection and maintenance of gammarids

Three weeks before the start of the experiment, adult gammarids ( $9.5 \pm 0.8$  mm) were collected with a hand net at a reference site (La Mouge River, N46°50'97.2"E4°75'63.9"), where gammarids presented low concentrations in PFASs (cartography of the gammarid contamination, Fig. S1). Gammarids were kept in a bucket on ice, and brought to the laboratory. They were acclimated 3 weeks in aquaria with continuously renewed groundwater under constant aeration; a 16:8 h light:dark photoperiod was maintained and the temperature was kept at 12°C. Organisms were fed ad libitum with alder leaves (*Alnus glutinosa*).

### 2.3. *Gammarus sp.* exposure

Two experiments were conducted, the first experiment (E1) is examined PFAS accumulation kinetics and the second experiment (E2) PFAS elimination kinetics. Male gammarids were selected for the experiments. For E1, 450 individuals were added to nine sediment aquaria (50/aq.) and 150 organisms were added to three control aquaria (50/aq.). Gammarids were sacrificed at 7 (T1), 15 (T2) and 21 (T3) days. For E2, 450 organisms were added to three sediment aquaria (150/aq.). After 3 weeks of sediment exposure, the organisms were transferred to a clean media (about 450 organisms in three aquaria with groundwater only). The gammarids were sacrificed at 7 (Ta), 15 (Tb) and 21 (Tc) days. For each experiment, overlying water (OW) was continuously renewed (four times a day) under constant aeration. A 16:8 h light:dark photoperiod and a temperature of 12°C were maintained during the experiments. The organisms were fed ad libitum with alder leaves (*Alnus glutinosa*), previously conditioned for 3 days in groundwater. Each week the water quality parameters (pH, temperature, concentration of dissolved oxygen, conductivity, NO<sub>2</sub><sup>-</sup> and NH<sub>4</sub><sup>+</sup>) were monitored (experimental design shown in Fig. S2).

#### 2.4. Sample collection

Overlying water was sampled directly in a 1 L polyethylene (PE) bottle at T1, T2, T3, Ta, Tb, Tc and in the controls (in E1 and E2 experiments). Pore water (PW) was obtained with the Rhizon® system (SDEC, Reignac-sur-Indre) and was sampled at T1, T2 and T3 in the E1 experiment. Sediment was sampled at T1, T2 and T3 in the E1 experiment. In the E1 and E2 experiments, the leaves were sampled at T0, T1, T2, T3, Ta, Tb, Tc and in the controls. Before freezing, leaf samples were rinsed with groundwater in order to release the sediment particles. Like the leaf samples, organisms were sampled at T0, T1, T2, T3, Ta, Tb, Tc and in the controls in two experiments. They were split into two different batches for PFAS analysis (about 600 mg wet weight (ww), with about 40 gammarids). Then these biota samples were

cryopreserved in liquid nitrogen and stored at  $-21^{\circ}\text{C}$ ; like the other samples, they were frozen and kept at  $-21^{\circ}\text{C}$ .

## 2.5. PFAS extraction

For sediment, gammarid samples, leaf samples and the reference matrix (fish reference SRM 1947, Reiner et al., 2012), PFASs were extracted using sonication with a method adapted from Sun et al. (2011) as described by Bertin et al. (2014b). The overlying and pore water samples were processed using Strata-X-AW cartridges as described by Labadie and Chevreuil (2011).

## 2.6. LC-MS/MS analysis and chemicals

PFAS was analysed with LC-MS/MS using an Agilent 1200 LC system (Agilent Technologie, Massy, France) interfaced with an Agilent 6490 triple quadrupole mass spectrometer (details in Table S2). The chemicals purchase and their source are described in the supplementary data; most were purchased from Wellington Laboratories (via BCP Instruments, Irigny, France) and Sigma-Aldrich (St Quentin Fallavier, France).

## 2.7. Quality control and methods performance

Analyte recovery was determined using spiked samples for each matrix (surface and pore water, sediment and gammarid). Native PFAS recovery ranged from 73 to 122% with a relative standard deviation below 33% for fish and spiked sand except for perfluoropentanoic acid (PFPA) and perfluorobutane sulfonate (PFBS). Native PFAS recovery for spiked waters (overlying and pore) ranged from 65 to 118% with a relative standard deviation below 12% except for perfluorotridecanoic acid (PFTTrDA), perfluorotetradecanoic acid (PFTeDA), 6:2 fluorotelomer sulfonic acid (6:2 FTSA), N-Ethyl perfluorooctane sulfonamidoacetic acid

(EtFOSAA), N-Methyl perfluorooctane sulfonamide (MeFOSA) and N-Ethyl perfluorooctane sulfonamide (EtFOSA) (Table S3).

Replicate procedural blanks were analyzed for each series of samples. The predominant compound in overlying water blanks was PFPA (mean level: 160 pg) and for pore water blanks PFPA and the perfluorodecanoic acid (PFDA) (mean levels: 147 pg and 39 pg, respectively). For tissue, sediment and leaf samples, the prevailing analytes in blanks were PFPA (123 pg) and PFDA (31 pg). PFAS concentrations were therefore blank-corrected. For compounds present in blanks, the limits of detection (LDs) were defined as three times the standard deviation, and the limits of quantification (LQs) were set at 10 times the standard deviation of the blank. For analytes not detected in the blanks, LDs and LQs were determined as the concentration with a signal-to-noise ratio of 3 and 9, respectively. This was calculated on matrices spiked at 0.3-1.8 ng.g<sup>-1</sup> (sediment and *Gammarus sp.*) and 0.9-17.3 ng.L<sup>-1</sup> (Vittel® mineral water samples) (Table S4). The PFASs measured in SRM 1947 Lake Michigan Fish Tissue and compared with the NIST value are presented in SI (Table S5).

## 2.8. Data analyses and modeling

Data were checked for the normality test using the Shapiro-Wilk test and were analyzed using a non-parametric test, the Kruskal-Wallis test and the Mann-Whitney test using the RStudio 0.97.336 software package (R Development Core Team, 2013).

To evaluate PFAS bioaccumulation by the gammarids, accumulation data were adjusted to the one-compartment bioaccumulation model (Landrum, 1989; Spacie and Hamelink, 1985). Equation(1) was used to estimate the uptake and elimination coefficients ( $k_u$  and  $k_e$ , respectively).

$$\frac{dC_{org}}{dt} = k_u \times C_{sed} - k_e \times C_{org} \quad \text{Eq. (1)}$$

with  $C_{org}$  the PFAS concentration in organisms ( $\text{ng}\cdot\text{g}^{-1}_{ww}$ ),  $C_{sed}$  the PFAS concentration in sediment ( $\text{ng}\cdot\text{g}^{-1}_{dw}$ ), and  $k_u$  expressed in  $\text{g}\cdot\text{g}_{ww}\cdot\text{d}^{-1}$  and  $k_e$  in  $\text{d}^{-1}$ .

The biota-to-sediment accumulation factor ( $BSAF_{model}$ ) was then calculated from the uptake and elimination coefficient (Eq. 2):

$$BSAF_{model} = \frac{k_u}{k_e} \quad \text{Eq. (2)}$$

To calculate the half-life ( $T_{1/2}$ ), Eq. (3) was used:

$$T_{1/2} = \frac{\ln 2}{k_e'} \quad \text{Eq. (3)}$$

with  $k_e'$  representing the elimination coefficient from the exponential decrease model (Eq. 4):

$$C_{org}(t) = C_0 \cdot e^{-k_e't} \quad \text{eq. (4)}$$

where  $C_0$  is the PFAS concentration at the start of the elimination phase ( $\text{ng}\cdot\text{g}^{-1}_{ww}$ ).

Model calculations were performed under R language using the `<<ode>>` function, and  $k_u$  and  $k_e$  were simultaneously optimized with the least square method using the `<<optim>>` function implemented in the `<<Desolve>>` package (R Core Team, 2014).

### 3. Results

#### 3.1. PFAS distribution in water, sediment and leaves during the E1 experiment

Short- (perfluorobutanoic acid [PFBA], to perfluoroheptanoic acid [PFHpA]) and long-chain perfluorocarboxylic acid (PFCA) (perfluorooctanoic acid [PFOA], perfluorononanoic acid [PFNA], PFDA, perfluoroundecanoic acid [PFUnA] and PFTrDA), short- and long-chain perfluoroalkane sulfonate [PFSA] (PFBS, perfluorohexane sulfonate [PFHxS], perfluoroheptane sulfonate [PFHpS] and PFOS) and one fluorotelomer (6:2 FTSA) were

detected in test OW aquaria. PFBS was detected at a level comparable in control OW aquaria to the levels observed in test aquaria, and perfluorohexanoic acid (PFHxA), PFHpA, PFOA and PFHxS were measured at levels below the quantification limit (LQ) in control OW aquaria. The same compounds were observed in PW except PFBA, PFHpA, PFHpS and PFTTrDA, but two precursors (N-Methyl perfluorooctane sulfonamidoacetic acid [MeFOSAA] and FOSA) were also detected in this compartment: the levels in test aquaria were higher than in control aquaria. In sediment, short- (PFPA and PFHxA) and long-chain PFCAs (PFOA, PFNA, PFDA, PFUnA, perfluorododecanoic acid [PFDoA], PFTTrDA and PFTTeDA), one PFSA (PFOS), one fluorotelomer (6:2 FTSA) and five precursors (MeFOSAA, EtFOSAA, perfluorooctane sulfonamide [FOSA], MeFOSA and EtFOSA) were detected. In leaves at T0, PFOA, PFNA and PFHxS were present <LQ, and PFOS was detected at a low level ( $0.074 \pm \text{ng.g}^{-1}\text{dw}$ ). In leaves present in control aquaria, the same levels as PFHxA in test aquaria were found, while PFPA, PFOA and PFUnA were detected at levels below the LQ, but as at T0, PFOS was measured at a low level ( $0.038 \pm \text{ng.g}^{-1}\text{dw}$ ). Leaves present in test aquaria contained short- (PFPA) and long-chain PFCAs (PFOA, PFNA, PFDA, PFUnA, PFDoA and PFTTrDA), long-chain PFSAs (PFHxS and PFOS), one fluorotelomer (6:2 FTSA) and three precursors (MeFOSAA, EtFOSAA and FOSA) at levels higher than those found in control aquaria.

### 3.2. Gammarid survival, PFAS accumulation and elimination

Gammarid survival was greater than 80% in test aquaria except at Tc, the last point of the E2 experiment (54%, 66% and 6%) and greater than 75% in control aquaria.

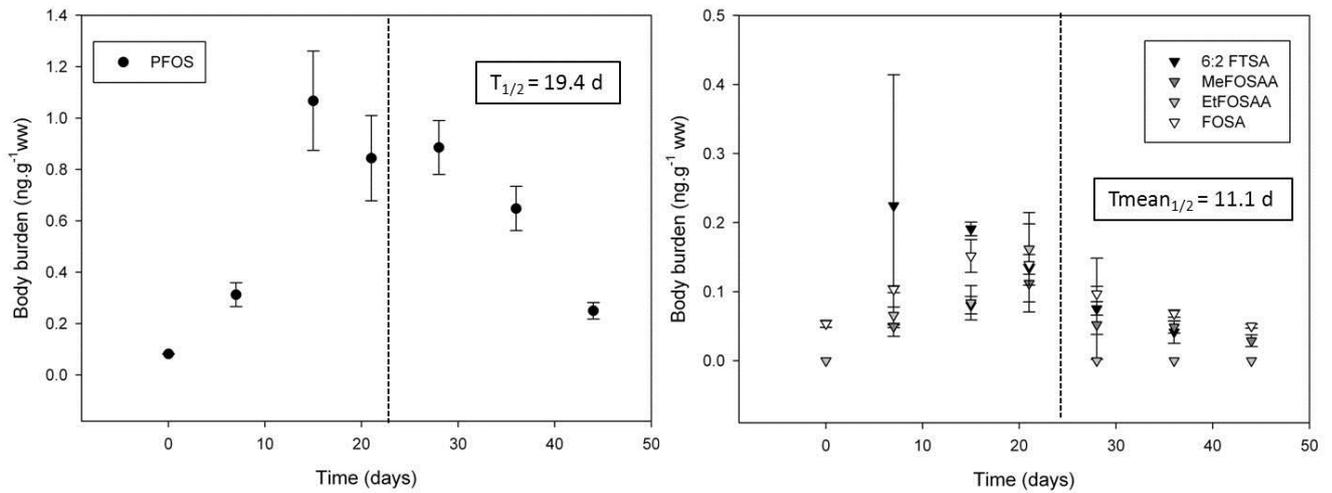
Gammarids accumulated five long-chain PFCAs from C<sub>8</sub> to C<sub>13</sub> (PFOA, PFNA, PFUnA, PFDoA, PFTTrDA), one PFSA (PFOS), three precursors (MeFOSAA, EtFOSAA, FOSA) and one fluorotelomer (6:2 FTSA). However, PFOA presented a similar level in the gammarid test

and control. The range of PFAS concentrations in this organism at T3, the end of the E1 experiment, and in the gammarid control are presented in Table 1.

**Table 1:** PFAS concentration in gammarids at T3 (last point of the accumulation part of experiment) and in gammarids in control aquaria (ng.g<sup>-1</sup>ww) with standard deviation (n=3). There is a significant difference between the gammarid test and control for all PFASs (p-value < 0.05) except PFOA (p-value > 0.05) (performed with Kruskal-Wallis test on Rstudio).

Compounds	Concentration at T3 in gammarids (ng.g <sup>-1</sup> ww)	Concentration in gammarids in control aquaria (ng.g <sup>-1</sup> ww)
PFOA	0.363 ± 0.039	0.425 ± 0.142
PFNA	0.196 ± 0.008	<0.090 (LQ)
PFUnA	2.290 ± 0.604	0.114 ± 0.018
PFD <sub>o</sub> A	0.394 ± 0.032	0.121 ± 0.013
PFT <sub>r</sub> DA	3.183 ± 0.192	<0.023 (LD)
PFOS	0.844 ± 0.166	0.165 ± 0.073
6:2 FTSA	0.134 ± 0.064	<0.012 (LD)
MeFOSAA	0.112 ± 0.027	<0.035 (LQ)
EtFOSAA	0.162 ± 0.053	< 0.024 (LD)
FOSA	0.139 ± 0.014	<0.019 (LQ)

The accumulation kinetics data showed that the steady state was not reached after 3 weeks of accumulation (Fig. 1 and Fig. 2).

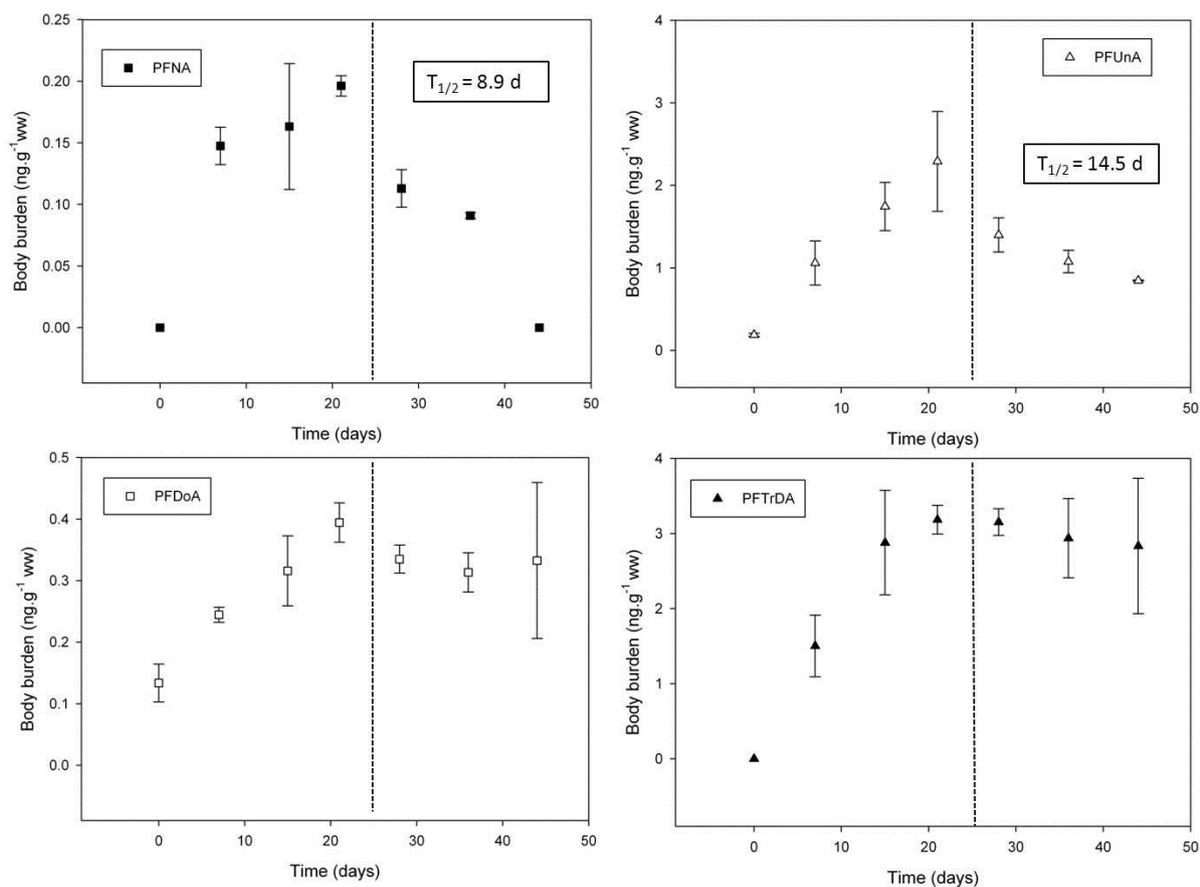


**Figure 1 :** Accumulation and elimination kinetics of PFOS, 6:2 FTSA the fluorotelomer and three precursors (MeFOSAA, EtFOSAA and FOSA). The dotted line separates accumulation and the elimination parts and  $T_{1/2}$  represents the half-life expressed in days.

The elimination of PFOS, 6:2 FTSA, precursors (MeFOSAA, EtFOSAA and FOSA) and PFNA was almost complete in 21 days (Figs. 1 and 2). For longer-chain PFCAs, the half-life increased with chain length, the elimination was not complete after 21 days and gammarids did not deplete PFDoA and PFTrDA (Fig. 2).

The application of the bioaccumulation model (Eq. 1) on the PFAS-gammarid data showed a fairly good fit (Figs. S3 and S4) with the distance between the observed and simulated data ranging from 0.0001 to 0.039), the  $R^2$  range from 0.78 to 0.97 except for FOSA ( $R^2 = 0.54$ ) and PFDoA ( $R^2 = 0.29$ ) (Table 2). The uptake coefficients ( $k_u$ ) ranged from 0.053 to 0.242  $\text{g.g}_{\text{ww}}.\text{d}^{-1}$  and the elimination coefficients ( $k_e$ ) from 0.042 to 0.276  $\text{d}^{-1}$  (Table

2).



**Figure 2:** Perfluoroalkyl carboxylate (PFCA) accumulation and elimination kinetics. The dotted line separates the accumulation and elimination parts,  $T_{1/2}$  represents the elimination half-life expressed in days, which was not calculated for PFDoA and PFTrDA because the depuration values have the same means (Mann-Whitney test on Rstudio software, p-value>0.05).

**Table 2:** Bioaccumulation model outcomes,  $k_u$  and  $k_e$  optimized simultaneously, the distance,  $R^2$  and  $R^2$  adjusted, and the calculation of the BSAF with model parameters. The grey cells correspond to  $k_e$  and  $BSAF_{\text{model}}$  not calculated for the PFDoA and PFTTrDA because elimination data showed no elimination.

Compounds	PFCA				PFSA, fluorotelomer and precursors				
	PFNA	PFUnA	PFDoA	PFTTrDA	PFOS	6:2 FTSA	MeFOSAA	EtFOSAA	FOSA
Distance	0.001	0.013	0.004	0.039	0.023	0.002	0.0001	0.001	0.001
$R^2$	0.899	0.965	0.290	0.968	0.804	0.782	0.947	0.821	0.537
$k_u$	0.094	0.141	0.078	0.089	0.202	0.242	0.129	0.053	0.218
$k_e$	0.087	0.048			0.042	0.276	0.060	0.215	0.066
$BSAF_{\text{model}}$	1.080	2.919			4.763	0.879	2.130	0.247	3.323
Number of fluorinated carbons	8	10	11	12	8	6	8	8	8

The  $BSAF_{\text{model}}$  values seem to increase with PFCA chain length. In addition, the  $BSAF_{\text{model}}$  value is higher for PFOS than for PFNA, which has the same number of perfluorinated carbons (Table 2).

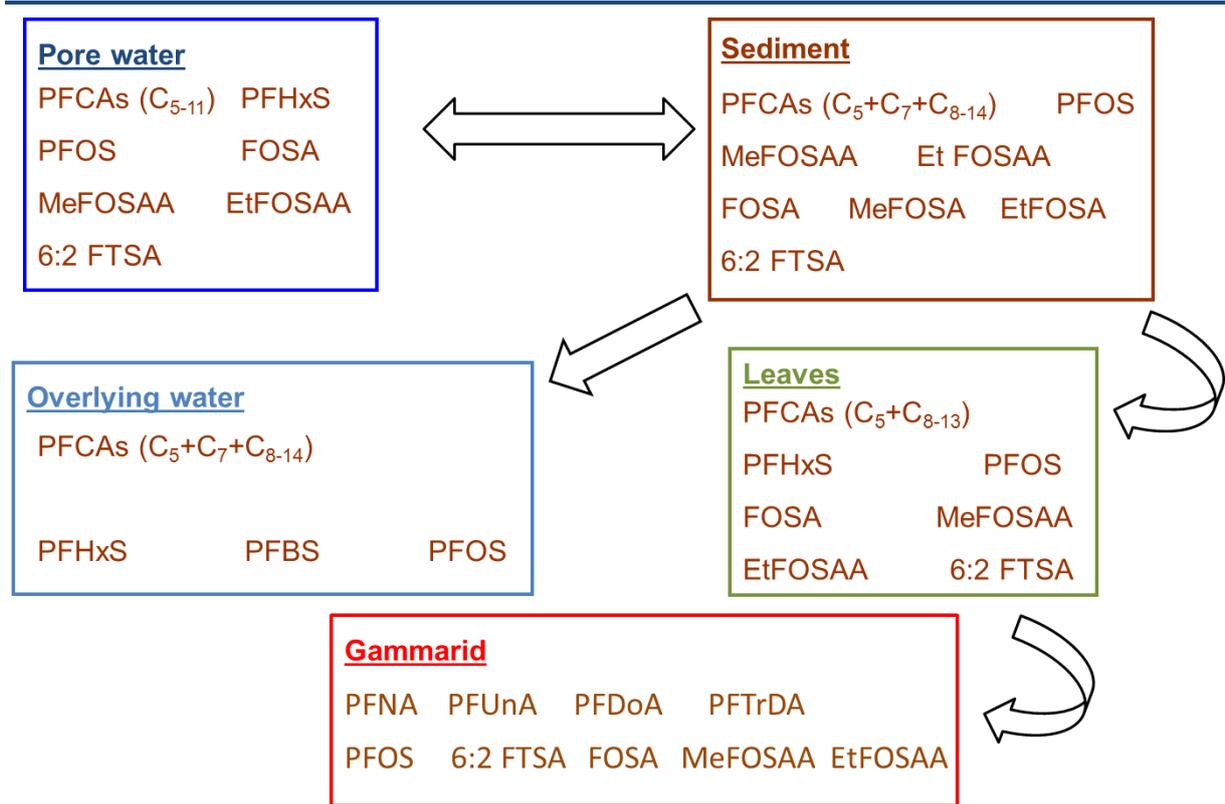
## 4. Discussion

### 4.1. PFAS distribution in water, sediment, food and *Gammarus sp.*

The sediment used for the experiments came from the same study site as previous studies (Bertin et al., 2014a; Bertin et al., 2014b), but it was sampled at different times. Nevertheless, the PFAS concentrations were similar in each sediment sample except for the PFDoA and PFTTeDA, which were lower in the present study than in previous studies (present study: PFDoA =  $0.298 \pm 0.125$  ng.g<sup>-1</sup><sub>dw</sub>, PFTTeDA =  $0.154 \pm 0.060$  ng.g<sup>-1</sup><sub>dw</sub>; previous studies (Bertin et al., 2014a; Bertin et al., 2014b): PFDoA =  $0.381 \pm 0.092$  ng.g<sup>-1</sup><sub>dw</sub> and  $1.538 \pm 0.626$  ng.g<sup>-1</sup><sub>dw</sub>, respectively, PFTTeDA =  $0.291 \pm 0.069$  ng.g<sup>-1</sup><sub>dw</sub> and  $0.990 \pm 0.576$  ng.g<sup>-1</sup><sub>dw</sub> respectively) and MeFOSAA and EtFOSAA, which were higher in the present study than in previous studies (present study: MeFOSAA =  $0.067 \pm 0.011$  ng.g<sup>-1</sup><sub>dw</sub>, EtFOSAA =  $0.463 \pm 0.046$  ng.g<sup>-1</sup><sub>dw</sub>; previous studies (Bertin et al., 2014a; Bertin et al., 2014b): MeFOSAA =

$<0.003 \text{ ng.g}^{-1}_{\text{dw}}$  and  $<0.028 \text{ ng.g}^{-1}_{\text{dw}}$ , respectively, EtFOSAA =  $<0.011 \text{ ng.g}^{-1}_{\text{dw}}$  and  $<0.061 \text{ ng.g}^{-1}_{\text{dw}}$ , respectively) (Table S7).

The comparison of PFAS concentrations in each middle compartment (only for PFAS present at levels higher in test aquaria than those in control), makes it possible to design a conceptual diagram of PFAS transport (Fig. 3). The PFAS concentrations are in equilibrium for most molecules in each compartment (except for PFNA, PFUnA and PFTrDA in OW, PFNA, PFUnA, PFDoA and FOSA in leaves). Each PFAS molecule present in any compartment was also present in sediment. During the test, the gammarid activity removed the sediment particles in the aquaria (epi-benthic species). As a result, these sediment particles were deposited at the leaf surfaces. Two PFAS transfer hypotheses through the leaves are possible: the first is a transfer by simple diffusion from water and the second is a diffusion from sediment particles and water. These transfers may occur via the microbial biofilm present on the leaf surface, because the leaf conditioning before their addition to the aquaria leads to the microorganism colonization at the leaf surface (Abelho, 2001; Aßmann et al., 2011). Indeed, the biofilm is known for its accumulation potential, essentially for metal accumulation (Farget et al., 1998; van Hullebusch et al., 2003), but some studies have shown organic molecule accumulation by the biofilm (Widenfalk et al., 2008; Writer et al., 2011). Recently, a study has shown the presence of PFASs in biofilm coming from the Seine River (France) (Labadie et al., 2014, in prep.), raising the possibility that PFAS contamination for gammarids may occur via the trophic pathway. However, PFASs accumulated by gammarids were shown in each media (OW, PW, sediment and leaves), suggesting that there is another PFAS pathway such as respiration by passive diffusion.



**Figure 3:** PFAS distribution between different compartments

#### 4.2. PFAS bioaccumulation

Gammarids bioaccumulated four long-chain PFCAs, one PFSA (PFOS), one fluorotelomer (6:2 FTSA) and three precursors from sediment. Few studies have measured PFASs in crustaceans, the data available cover, for the most part, marine species (crabs and shrimp) sampled in the field. Two studies have measured PFASs in amphipods: a freshwater amphipod (Kannan et al., 2005) where PFOA and FOSA concentrations (<5 and <2 ng.g<sup>-1</sup><sub>ww</sub>, respectively) were lower than those found in gammarids while PFOS concentrations were similar (<2-2.9 ng.g<sup>-1</sup><sub>ww</sub>); and marine gammarids (*Gammarus wilkitzkii*) where PFOS and PFOA concentrations were higher than those found in the present study (3.85 ± 1.17 and 3.15 ± 0.34 ng.g<sup>-1</sup><sub>ww</sub>, respectively). However, the fluorotelomer 6:2 FTSA were found at higher levels (0.48 ± 0.24 ng.g<sup>-1</sup><sub>ww</sub>) than the concentration found in gammarids (Haukås et al., 2007). Most PFASs with long chains have not been measured except in two species of shrimp (*Peneaus monodon* and *Metapenaeus ensis*) in the study reported by Loi et al. (2011).

However, it is difficult to compare measurements from biomonitoring studies and from gammarids exposed in the laboratory because the exposure concentration could be different (sediment in Loi et al. (2011): range of PFUnA, PFDoA and PFTeDA = 6.78-46.7 ng.g<sup>-1</sup><sub>ww</sub>; water in Kannan et al. (2005): PFOS = 3.5 ng.L<sup>-1</sup>; present study: sediment: range of PFUnA, PFDoA, PFTrDA and PFTeDA = 0.07–0.97 ng.g<sup>-1</sup><sub>ww</sub>, sediment PFOS mean = 0.17 ± 0.02 ng.g<sup>-1</sup><sub>ww</sub>).

However, the accumulation kinetics results show that the steady state was not reached after 3 weeks of exposure. In comparison with other bioaccumulation pollutant studies using *Gammarus sp.* the steady state was reached in a short time: between 48 and 72 h for several pharmaceuticals (5-fluorouracil, carbamazepine, diazepam, moclobemide, carvedilol and fluoxetine) (Meredith-Williams et al., 2012) and 2 days for the pesticides chlorpyrifos and pentachlorophenol (Ashauer et al., 2006). In spite of the failure to achieve the steady state, the determination of the uptake and elimination coefficients can characterize BSAF<sub>model</sub>. The results have shown a positive relation between the PFCA chain length and BSAF<sub>model</sub>, and for the same number of fluorinated carbons the BSAF for PFOS (PFSA) was higher than for the PFNA (PFCA) according to several studies (Lasier et al., 2011; Martin et al., 2003a, b).

#### 4.3. Comparison between gammarid and chironomid bioaccumulation

Previous studies have shown PFAS bioaccumulation from the Rhône River (Beurre Island, France) sediment in the midge *Chironomus riparius* (Bertin et al., 2014a). In spite of temporal variability, the PFAS concentrations are comparable between sediment used for these studies and the present study (Table S7). In addition, uptake and elimination coefficients were estimated simultaneously with the same least-square method. Accumulation and elimination present several differences between these two benthic invertebrates. The chironomid did not accumulate PFNA, unlike the gammarid, in spite of the same exposure concentration. Despite

a short PFAS time exposure (4 days versus 21 days for gammarids) due to its short life cycle, the chironomid accumulated PFUnA, PFDoA, PFTrDA, PFOS and FOSA ( $k_u$  in Table 3) more rapidly than the gammarid and the PFAS elimination was complete after 42 h and was faster for chironomids ( $k_e$  in Table 3). In addition, a clear long-chain PFCA effect was correlated with elimination for the gammarid and elimination was not complete for the PFCA with more than nine fluorinated carbons. The  $BSAF_{model}$  results showed a higher accumulation for all PFASs for gammarids than chironomids, which is in agreement with long or incomplete PFAS elimination in gammarids. These differences between these two invertebrates could be explained by different exposure routes related to the organisms' lifestyle. Indeed the chironomid is a benthic invertebrate feeding on the organic matter contained in sediment, whereas the gammarid is a shredder epi-benthic organism, therefore living in the water column with occasional contact with sediment. For chironomids, the main PFAS exposure pathway is trophic while for gammarids, due to their activity, the main PFAS exposure pathway could also be with a passive diffusion via respiration.

**Table 3:** Uptake and elimination coefficients estimated simultaneously (least-square method) with a bioaccumulation model, and  $BSAF_{model}$  for *Chironomus riparius* (Bertin et al., 2014a) and *Gammarus fossarum/pulex* (present study).

Compounds	PFCA				PFSA, fluorotelomer and precursors				
	PFNA	PFUnA	PFDoA	PFTrDA	PFOS	6:2 FTSA	MeFOSAA	EtFOSAA	FOSA
<b><u>Chironomus riparius</u></b>									
$k_u$ (g.g <sub>ww</sub> .d <sup>-1</sup> )		0.70		0.93	1.27				2.02
$k_e$ (d <sup>-1</sup> )		1.11		0.86	2.12				0.67
$BSAF_{model}$		0.63		1.08	0.60				2.99
<b><u>Gammarus fossarum/pulex</u></b>									
$k_u$ (g.g <sub>ww</sub> .d <sup>-1</sup> )	0.09	0.14	0.08	0.09	0.20	0.24	0.13	0.05	0.22
$k_e$ (d <sup>-1</sup> )	0.09	0.05			0.04	0.28	0.06	0.22	0.07
$BSAF_{model}$	1.08	2.92			4.76	0.88	2.13	0.25	3.32

## 5. Conclusion

The study results reported herein show an accumulation by gammarids of four long-chain PFCAs (PFNA, PFUnA, PFDoA and PFTrDA), one PFSA (PFOS), three precursors (MeFOSAA, EtFOSAA, FOSA) and one fluorotelomer (6:2 FTSA) from the sediment. The steady state was not reached after 3 weeks of exposure. In addition, the depuration of PFOS, precursors and 6:2 FTSA was almost complete in 21 days but not for the long-chain PFCAs. The PFCA depuration time increases with the chain length. Moreover, according to several studies (Lasier et al., 2011; Martin et al., 2003a, b), the PFCA BSAF values also seem to increase as the chain length increases. The PFAS pathway occur follows digestive and respiratory routes. In comparison with PFAS bioaccumulation by chironomids, where the PFAS accumulation and elimination were fast and complete after 42 h and the behavioral differences existing between these two organisms, it is clear that lifestyle has an impact on PFAS bioaccumulation.

## Acknowledgments

## References

- Abelho, M., 2001. From Litterfall to Breakdown in Streams: A Review. *TheScientificWorldJOURNAL* 1.
- Armitage, J., Cousins, I.T., Buck, R.C., Prevedouros, K., Russell, M.H., Macleod, M., Korzeniowski, S.H., 2006. Modeling global-scale fate and transport of perfluorooctanoate emitted from direct sources. *Environmental Science and Technology* 40, 6969-6975.
- Ashauer, R., Boxall, A., Brown, C., 2006. Uptake and elimination of chlorpyrifos and pentachlorophenol into the freshwater amphipod *Gammarus pulex*. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 51, 542-548.
- Aßmann, C., Rinke, K., Nechwatal, J., Elert, E.V., 2011. Consequences of the colonisation of leaves by fungi and oomycetes for leaf consumption by a gammarid shredder. *Freshwater Biology* 56, 839-852.
- Bertin, D., Ferrari, B.J.D., Labadie, P., Sapin, A., Beaudoin, R., Péry, A., Garric, J., Budzinski, H., Babut, M., 2014a. Accumulation and depuration of perfluoroalkyl compounds

(PFASs) by midge larvae (*Chironomus riparius*, Diptera, Chironomidae) exposed to contaminated sediments. in prep.

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

Dauchy, X., Boiteux, V., Rosin, C., Munoz, J.F., 2012. Relationship between industrial discharges and contamination of raw water resources by perfluorinated compounds. Part I: Case study of a fluoropolymer manufacturing plant. *Bull Environ Contam Toxicol* 89, 525–530.

Farag, A.M., Woodward, D.F., Goldstein, J.N., Brumbaugh, W., Meyer, J.S., 1998. Concentrations of metals associated with mining waste in sediments, biofilm, benthic macroinvertebrates, and fish from the Coeur d'Alene River Basin, Idaho. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 34, 119-127.

Giesy, J.P., Kannan, K., 2001. Global Distribution of Perfluorooctane Sulfonate in Wildlife. *Environmental Science & Technology* 35, 1339-1342.

Haukås, M., Berger, U., Hop, H., Gulliksen, B., Gabrielsen, G.W., 2007. Bioaccumulation of per- and polyfluorinated alkyl substances (PFAS) in selected species from the Barents Sea food web. *Environmental Pollution* 148, 360-371.

Higgins, C.P., McLeod, P.B., Macmanus-Spencer, L.A., Luthy, R.G., 2007. Bioaccumulation of perfluorochemicals in sediments by the aquatic oligochaete *Lumbriculus variegatus*. *Environmental Science and Technology* 41, 4600-4606.

Houde, M., Bujas, T.A.D., Small, J., Wells, R.S., Fair, P.A., Bossart, G.D., Solomon, K.R., Muir, D.C.G., 2006. Biomagnification of perfluoroalkyl compounds in the bottlenose dolphin (*Tursiops truncatus*) food web. *Environmental Science and Technology* 40, 4138-4144.

Houde, M., De Silva, A.O., Muir, D.C.G., Letcher, R.J., 2011. Monitoring of Perfluorinated Compounds in Aquatic Biota: An Updated Review. *Environmental Science & Technology* 45, 7962-7973.

Kannan, K., Tao, L., Sinclair, E., Pastva, S.D., Jude, D.J., Giesy, J.P., 2005. Perfluorinated compounds in aquatic organisms at various trophic levels in a Great Lakes food chain. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 48, 559-566.

Labadie, P., Chevreuil, M., 2011. Partitioning behaviour of perfluorinated alkyl contaminants between water, sediment and fish in the Orge River (nearby Paris, France). *Environmental Pollution* 159, 391-397.

Landrum, P.F., 1989. Bioavailability and toxicokinetics of polycyclic aromatic hydrocarbons sorbed to sediments for the amphipod *Pontoporeia hoyi*. *Environmental Science & Technology* 23, 588-595.

- Lasier, P.J., Washington, J.W., Hassan, S.M., Jenkins, T.M., 2011. Perfluorinated chemicals in surface waters and sediments from northwest Georgia, USA, and their bioaccumulation in *Lumbriculus variegatus*. *Environmental Toxicology and Chemistry* 30, 2194-2201.
- Loi, E.I.H., Yeung, L.W.Y., Taniyasu, S., Lam, P.K.S., Kannan, K., Yamashita, N., 2011. Trophic Magnification of Poly- and Perfluorinated Compounds in a Subtropical Food Web. *Environmental Science & Technology* 45, 5506-5513.
- MacNeil, C., Dick, J.T., Elwood, R.W., 1997. The trophic ecology of freshwater *Gammarus* spp.(Crustacea: Amphipoda): problems and perspectives concerning the functional feeding group concept. *Biological Reviews of the Cambridge Philosophical Society* 72, 349-364.
- MacNeil, C., Dick, J.T., Elwood, R.W., 1999. The dynamics of predation on *Gammarus* spp.(Crustacea: Amphipoda). *Biological Reviews* 74, 375-395.
- Martin, J.W., Mabury, S.A., Solomon, K.R., Muir, D.C.G., 2003a. Bioconcentration and tissue distribution of perfluorinated acids in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Environmental Toxicology and Chemistry* 22, 196-204.
- Martin, J.W., Mabury, S.A., Solomon, K.R., Muir, D.C.G., 2003b. Dietary accumulation of perfluorinated acids in juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Environmental Toxicology and Chemistry* 22, 189-195.
- Martin, J.W., Whittle, D.M., Muir, D.C.G., Mabury, S.A., 2004. Perfluoroalkyl contaminants in a food web from lake Ontario. *Environmental Science & Technology* 38, 5379-5385.
- Meredith-Williams, M., Carter, L.J., Fussell, R., Raffaelli, D., Ashauer, R., Boxall, A.B.A., 2012. Uptake and depuration of pharmaceuticals in aquatic invertebrates. *Environmental Pollution* 165, 250-258.
- R Core Team, 2014. R: A Language and Environment for Statistical Computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria.
- R Development Core Team, 2013. R: A language and environment for Statistical computing, in: R Foundation for Statistical Computing (Ed.), Vienna.
- Reiner, J., O'Connell, S., Butt, C., Mabury, S., Small, J., Silva, A., Muir, D.G., Delinsky, A., Strynar, M., Lindstrom, A., Reagen, W., Malinsky, M., Schäfer, S., Kwadijk, C.A.F., Schantz, M., Keller, J., 2012. Determination of perfluorinated alkyl acid concentrations in biological standard reference materials. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 404, 2683-2692.
- Spacie, A., Hamelink, J.L., 1985. Bioaccumulation, in: Rand, G.M., Petrocelli, S.R. (Eds.), *Fundamentals of Aquatic Toxicology*, pp. 495-519.
- Sun, H., Gerecke, A.C., Giger, W., Alder, A.C., 2011. Long-chain perfluorinated chemicals in digested sewage sludges in Switzerland. *Environmental Pollution* 159, 654.
- van Hullebusch, E.D., Zandvoort, M.H., Lens, P.N.L., 2003. Metal immobilisation by biofilms: Mechanisms and analytical tools. *Reviews in Environmental Science and Biotechnology* 2, 9-33.

Widenfalk, A., Lundqvist, A., Goedkoop, W., 2008. Sediment microbes and biofilms increase the bioavailability of chlorpyrifos in *Chironomus riparius* (Chironomidae, Diptera). *Ecotoxicology and Environmental Safety* 71, 490-497.

Writer, J.H., Ryan, J.N., Barber, L.B., 2011. Role of biofilms in sorptive removal of steroidal hormones and 4-nonylphenol compounds from streams. *Environmental Science and Technology* 45, 7275-7283.

### 3 Synthèse

Les résultats de bioaccumulation des PFASs par le gammare ont montré une accumulation de quatre composés carboxylate à longue chaîne (PFNA, PFUnA, PFDoA et PFTrDA), d'un composé sulfonate, le PFOS, de trois précurseurs (MeFOSAA, EtFOSAA et FOSA) et d'un fluorotélomère, le 6 :2 FTSA. L'état stable n'a, toutefois, pas été atteint après trois semaines d'exposition. L'élimination de ces composés a été presque complète pour le PFOS, les trois précurseurs et le fluorotélomère en 21 jours. Cependant l'élimination des composés carboxylates est positivement corrélée avec la longueur de la chaîne carbonée des composés. Le dosage dans tous les compartiments d'exposition des PFASs, ont permis de déterminer les voies d'expositions des PFASs pour les organismes. La première voie de contamination possible est la voie trophique, via les feuilles d'aulnes et le biofilm associé qui ont pu se contaminer soit à partir du sédiment soit à partir de l'eau de surface et du sédiment par une simple diffusion passive. La deuxième voie de contamination possible est celle de la respiration de l'organisme via la diffusion passive des composés par l'eau de surface. Lorsque l'on compare les différences d'accumulation et d'élimination des PFASs entre le chironome et le gammare, nous observons une accumulation et une élimination plus rapide des composés par le chironome. Ces différences sont alors liées aux voies d'expositions et à la physiologie qui diffèrent entre ces deux organismes.





## *Chapitre 6*

*Réalisme environnemental des données  
acquises au laboratoire*



## 1 Objectifs

Les processus biologiques (par exemple : la respiration, la croissance) dans l'environnement naturel sont influencés par de nombreux facteurs comme par exemple la température, le pH, la salinité, le taux d'oxygène dissous, les apports anthropiques et naturels (MO), ce qui peut engendrer malgré tout, des différences entre les expérimentations faites au laboratoire et la réalité observée sur le terrain (Vignati et al., 2007).

Plusieurs études discutent des différences laboratoire-terrain et des difficultés rencontrées à comparer ces résultats (Burkhard et al., 2012a, b; Selck et al., 2012; Weisbrod et al., 2009). En effet, Burkhard et al. (2012a) dans leur revue comparent les BSAFs obtenus à partir de données de terrain et ceux obtenus à partir de données de laboratoire chez deux types d'organismes : des oligochètes et des bivalves. Une différence d'un facteur 2 est mise en évidence chez les oligochètes entre deux BSAFs l'un estimé à partir de données de terrain, le second à partir de données de laboratoire. Le manque d'activité de nourrissage et le stress que les organismes peuvent subir lors des expérimentations au laboratoire ainsi que les modifications pouvant avoir lieu au sein des différents compartiments (sédiment, eaux de surface et interstitielle) influencent les données acquises au laboratoire. Cependant lorsque les expérimentations menées au laboratoire ont des conditions proches de celles du terrain, notamment en terme de composition de l'eau de surface, les BSAFs obtenus à partir de terrain sont proches de ceux obtenus au laboratoire chez les bivalves. Une autre approche utilisant un modèle probabiliste pouvant intégrer jusqu'à 56 paramètres (physico-chimiques, physiologie des organismes, écologie et environnementaux) a été étudiée afin de comprendre les différences entre les données obtenues sur le terrain et les données acquises au laboratoire (Selck et al., 2012). Ce modèle met en évidence que la variabilité de la bioaccumulation des composés chimiques chez les organismes de bas niveau trophique (polychètes et éphémères) est essentiellement conduite par l'exposition au sédiment, sa composition physico-chimique (et notamment en carbone réfractaire) et la répartition des composés chimiques au sein même de ce sédiment. La variabilité de la bioaccumulation des composés chimiques chez des organismes de haut niveau trophique est essentiellement reliée à la structure de la chaîne trophique et à la concentration en composés chimiques dans les organismes ingérés notamment pour les composés persistant comme le PCB-153.

Dans le but de vérifier le réalisme des résultats obtenus au laboratoire, ce chapitre confronte les résultats des tests d'accumulation réalisés au laboratoire aux mesures *in situ*. Il se découpe alors en plusieurs parties : (i) la première vise à décrire la variabilité spatio-temporelle des concentrations en PFASs présentes dans les sédiments, (ii) la deuxième à comparer les niveaux d'accumulation des PFASs entre chironomes autochtones et chironomes exposés au laboratoire, (iii) la troisième à tester l'influence de l'intégrité (i.e., sédiment intact ou homogénéisé) de la matrice sédimentaire sur l'accumulation des PFASs et (iv) la dernière à comprendre l'influence des autres sources de contaminations sur l'accumulation en PFASs. Le tableau 1 résume l'ensemble des expérimentations et des prélèvements sur le terrain permettant, par la suite, leur comparaison en suivant une logique temporelle cohérente.

**Tableau 1 : Dates des expérimentations et des prélèvements de chironomes réalisés au cours de la thèse**

Expérimentations ou prélèvements	Date
Cinétiques d'accumulation des PFASs par le chironome à partir de sédiment homogénéisé	Avril 2012
Prélèvement de chironomes autochtones	Octobre 2012
Cinétiques d'élimination des PFASs par le chironome à partir de sédiment homogénéisé	Mars 2013
Prélèvement de chironomes autochtones	Juin 2013
Encagement de chironomes sur le terrain	Juin 2013
Exposition de chironomes à des carottes de sédiment	Juillet 2013

## 2 Comparaison entre organismes autochtones et organismes exposés au laboratoire

### 2.1 Variabilité des concentrations dans les sédiments

Au cours de ce travail de thèse plusieurs prélèvements de sédiment ont eu lieu afin d'effectuer chaque expérimentation avec du sédiment frais. Cependant ces prélèvements effectués à des moments différents de l'année peuvent constituer une source de variabilité pour la bioaccumulation des PFASs. Afin de mieux décrire cette variabilité, les sédiments prélevés sont comparés entre eux en termes de leurs caractéristiques physico-chimiques

(pertes au feu, teneur en eau, teneur en  $\text{CO}_3^{2-}$  et en azote) mais aussi en termes de concentrations en PFASs.

Une seule analyse a été effectuée sur chaque échantillon de sédiment composite (excepté deux échantillons réalisés en triplicatas), les données ne sont donc pas en nombre suffisant pour effectuer une analyse statistique de la variance. Les tableaux 2 et 3 présentent les calculs de la médiane, de la moyenne, de l'écart-type et de la variance globale.

Les résultats présentés dans le tableau 2 montrent une faible variance pour les caractéristiques physico-chimiques (perte au feu : 1.65%, teneur en  $\text{CaCO}_3$  : 2.66%, teneur en azote : 0.004%) excepté la teneur en eau (28.11%), et une forte variance en ce qui concernent les sommes des concentrations en PFASs ( $44.07 \text{ ng}^2.\text{g}^{-1}$  poids sec), et de même lorsque l'on regarde une molécule caractéristique de la signature du site d'étude le PFTTrDA ( $21.20 \text{ ng}^2.\text{g}^{-1}$  poids sec). Le tableau 3 diffère du premier par le retrait d'un échantillon de sédiment (BER-12-04-SED-E6 prélevé le 26/04/2012) qui en raison d'une mauvaise météo a été prélevé en rive droite, tous les autres ayant été prélevés dans la même zone en rive gauche. La variance des paramètres physico-chimique est peu affectée alors qu'elle diminue fortement lorsque l'on s'intéresse à la somme des concentrations en PFASs et des concentrations en PFTTrDA : on observe une nette diminution des valeurs ( $\sum\text{PFASs}$  :  $11.64 \text{ ng}^2.\text{g}^{-1}$  poids sec, PFTTrDA :  $3.33 \text{ ng}^2.\text{g}^{-1}$  poids sec). Ces résultats illustrent bien la variabilité spatiale des concentrations en PFASs dans la lône.

**Tableau 2: Comparaison des différents prélèvements de sédiments composites au cours de la thèse, concentrations en PFASs et en PFTrDA exprimées en ng.g<sup>-1</sup> de poids secs (ps)**

Sédiments	Date d'échantillonnage	Pertes au feu (%)	Teneur en eau (%)	Teneur en carbonate (%)	Teneur en azote (%)	ΣPFASs	PFTrDA
BER-12-04-SED-E5	03/04/2012	4.3	43.4	27.4	0.19	11.97	6.215
BER-12-04-SED-E6	26/04/2012	6.9	53.3	26.1	0.29	23.44	14.586
BER-12-08-SED-E7	02/08/2012	3.54	44.7	24.2	0.11	8.33	3.362
BER-12-08-SED-E8	27/08/2012	3.76	45	23.8	0.12	11.97	4.414
BER-13-03-SED-E9	07/03/2013	5.38	51	23.7	0.15	4.64	1.642
BER-13-10-SED-E10	14/10/2013	6.4	53.8	25.9	0.2	6.00	2.069
BER-13-11-SED-E11	07/11/2013	5.2	56.8	27.5	0.15	4.63	1.673
<b>Médiane</b>		<b>5.200</b>	<b>51.000</b>	<b>25.900</b>	<b>0.150</b>	<b>8.33</b>	<b>3.362</b>
<b>Moyenne</b>		<b>5.069</b>	<b>49.714</b>	<b>25.514</b>	<b>0.173</b>	<b>10.14</b>	<b>4.852</b>
<b>Ecart type</b>		<b>1.283</b>	<b>5.302</b>	<b>1.630</b>	<b>0.061</b>	<b>6.64</b>	<b>4.604</b>
<b>Variance</b>		<b>1.647</b>	<b>28.108</b>	<b>2.658</b>	<b>0.004</b>	<b>44.07</b>	<b>21.197</b>

**Tableau 3: Comparaison des différents prélèvements de sédiments composites au cours de la thèse après avoir retiré un point d'échantillonnage prélevé à un endroit différent de la lône (le BER-12-04-SED-E6), concentrations en PFASs et en PFTrDA exprimées en ng.g<sup>-1</sup> de poids secs (ps)**

Sédiments	Date d'échantillonnage	Pertes au feu (%)	Teneur en eau (%)	Teneur en carbonate (%)	Teneur en azote (%)	ΣPFASs	PFTrDA
BER-12-04-SED-E5	03/04/2012	4.3	43.4	27.4	0.19	11.97	6.215
BER-12-08-SED-E7	02/08/2012	3.54	44.7	24.2	0.11	8.33	3.362
BER-12-08-SED-E8	27/08/2012	3.76	45	23.8	0.12	11.97	4.414
BER-13-03-SED-E9	07/03/2013	5.38	51	23.7	0.15	4.64	1.642
BER-13-10-SED-E10	14/10/2013	6.4	53.8	25.9	0.2	6.00	2.069
BER-13-11-SED-E11	07/11/2013	5.2	56.8	27.5	0.15	4.63	1.673
<b>Médiane</b>		<b>4.75</b>	<b>48.00</b>	<b>25.05</b>	<b>0.15</b>	<b>7.17</b>	<b>2.72</b>
<b>Moyenne</b>		<b>4.76</b>	<b>49.12</b>	<b>25.42</b>	<b>0.15</b>	<b>7.92</b>	<b>3.23</b>
<b>Ecart type</b>		<b>1.09</b>	<b>5.54</b>	<b>1.76</b>	<b>0.04</b>	<b>3.41</b>	<b>1.82</b>
<b>Variance</b>		<b>1.19</b>	<b>30.73</b>	<b>3.11</b>	<b>0.001</b>	<b>11.64</b>	<b>3.32</b>

Par ailleurs, les concentrations en PFASs et en PFTrDA dans les tableaux 2 et 3 diminuent entre les années 2012 et 2013. Cela peut s'expliquer par un événement ponctuel comme une chasse du Rhône, représentant 1.7 millions de m<sup>3</sup> de sédiments retenu, par les sociétés de gestion des barrages suisse du Rhône ayant eu lieu le 11 Juin 2012 (actualité IRSTEA), ou par la variabilité du rejet industriel.

## 2.2 Organismes autochtones et organismes exposés au laboratoire

En octobre 2012 et en juin 2013 des chironomes autochtones ont été prélevés à l'île du Beurre ; des dosages de PFASs ont alors été effectués sur ces organismes. La figure 1 présente une comparaison des concentrations en PFASs entre organismes autochtones et organismes exposés au laboratoire. Compte tenu de l'existence d'une variabilité temporelle de la contamination en PFASs nous comparons les organismes prélevés sur le terrain et les organismes exposés au laboratoire entre eux en 2012 et en 2013. Nous observons la même distribution de PFASs (excepté pour le PFOA, le PFNA et le PFDoA) chez les chironomes. Cependant si nous comparons les niveaux d'accumulation entre les organismes autochtones et les organismes exposés au laboratoire nous observons de plus fortes teneurs en PFASs chez les chironomes autochtones.

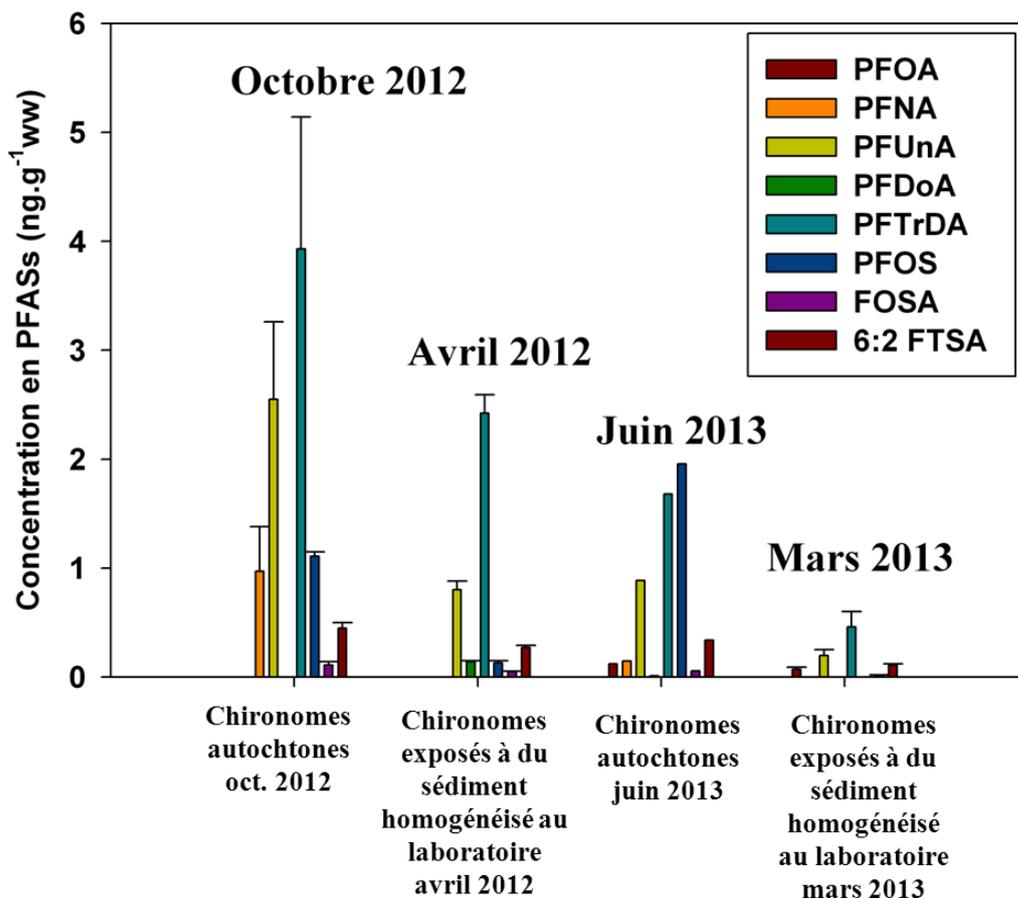


Figure 1: Comparaison des concentrations en PFASs entre chironomes autochtones et chironomes exposés pendant le stade 4 à du sédiment homogénéisé au laboratoire.

Ces différences de niveaux d'accumulation peuvent s'expliquer de diverses manières comme par (i) la variabilité spatio-temporelle de la contamination (Dauvin, 2008), (ii) des espèces différentes échantillonnées sur le terrain de celles utilisées au laboratoire (Martin et al., 2008), (iii) la nourriture ajoutée au laboratoire, (iv) l'intégrité de la matrice sédimentaire et (v) les sources de contaminations (MES, eau de surface).

La variabilité spatio-temporelle de la contamination semble influencer l'accumulation des PFASs par les organismes mais si nous comparons des organismes exposés ou prélevés entre eux au cours d'une même année cela n'explique pas les différences de niveaux observés. Nous avons donc exploré deux hypothèses parmi celles évoquées ci-dessus : (i) celle de l'influence de l'intégrité de la matrice sédimentaire en exposant des chironomes au laboratoire à des carottes de sédiments prélevées sur site et (ii) celle de l'influence des autres sources de contaminations, en dehors de celle du sédiment, en encageant des chironomes sur le terrain.

### **3 Influence de l'intégrité de la matrice sédimentaire sur la bioaccumulation des PFASs par les chironomes**

#### **3.1 Introduction**

L'homogénéisation des sédiments est une pratique courante et recommandée pour les tests d'accumulation et de toxicité afin de maximiser l'exposition (OCDE, 2008; USEPA, 2000). Cependant il a été montré que l'homogénéisation conduit à une modification de la répartition des contaminants entre les compartiments (particules sédimentaires, eau interstitielle et eau de surface). Par exemple Burgess and McKinney (1997) montrent que l'homogénéisation augmente les concentrations en PCB dans les phases dissoutes et colloïdales (PCB) ; de même Anderson et al. (2001) montrent que l'homogénéisation des sédiments a pour effet de diminuer les concentrations en métaux présentes dans l'eau de surface et de diminuer également la toxicité de ces métaux sur des embryons d'oursins . Le tamisage qui vise à éliminer les organismes autochtones présents dans le sédiment peut également avoir un impact sur les caractéristiques physico-chimiques des sédiments (ASTM, 2004). Les organismes *in situ* sont couramment exposés aux 5 premiers centimètres du sédiment (organismes benthique comme les chironomes) et plus rarement aux 10 premiers centimètres (oligochètes, quelques mollusques). Un test d'accumulation respectant la structure du sédiment reflètera d'une manière plus précise l'exposition des organismes du milieu.

## **3.2 Matériel et Méthode**

### **3.2.1 Echantillonnage des carottes de sédiments sur le terrain et mise en place du système d'exposition**

Les systèmes d'échantillonnage des carottes de sédiments servent également pour l'exposition des organismes. Ils sont constitués de tubes cylindriques en polychlorure de vinyle (PVC) (hauteur: 35 cm, diamètre externe 90 mm, diamètre interne: 81 mm) et de bouchons en polyéthylène (PE) (Fig. 2). En Juin 2013, 13 carottes de sédiments de 22 cm ont été collectées sur la lône de l'île du Beurre, puis conservées à 4°C dans une glacière et rapportées au laboratoire. Les carottes de sédiments sont gardées à 21°C (correspondant à la température d'exposition des chironomes) pendant 10 jours avant l'ajout des organismes. Afin d'estimer la quantité d'organismes autochtones présents dans les carottes, une carotte de sédiments a été tamisée (à 2 mm) directement sur le terrain. Les organismes retrouvés ont été essentiellement des corbicules et des oligochètes. Une autre carotte de sédiments a été sacrifiée au laboratoire pour la caractérisation physico-chimique et pour l'analyse des PFASs à T0. Cette carotte de sédiments a été découpée en 6 couches (0-0.5 cm, 0.5-2 cm, 2-3.5 cm, 3.5-5 cm, 5-6.5 m et 6.5-8 cm) et chaque couche a été caractérisée par sa teneur en eau, sa teneur en CaCO<sub>3</sub>, sa teneur en azote, la perte au feu et sa concentration en PFASs. La distribution granulométrique des particules a également été déterminée pour chaque couche par diffractométrie laser (Cilas 1190). Trois systèmes d'exposition ont été utilisés pour les témoins, pour cela de la silice a été ajoutée jusqu'à une hauteur de 22 cm dans chaque système. Afin de récupérer de l'eau interstitielle, 3 systèmes Rhizon® ont été ajoutés à trois carottes de sédiments et aux trois carottes témoins à -2 cm, -4.5 cm et à -9.5 cm (Fig. 3).

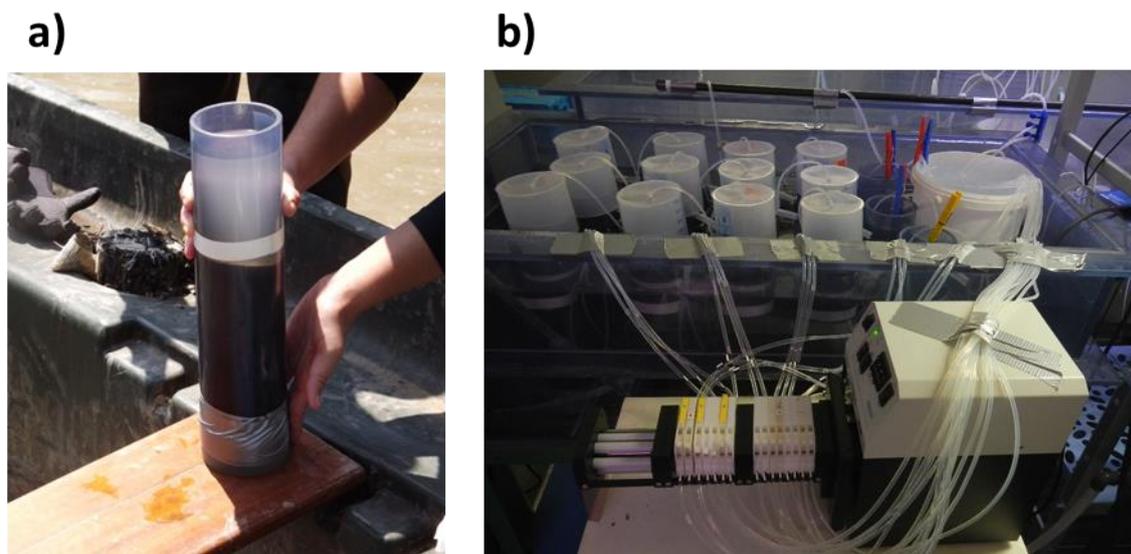


Figure 2: Système de collecte des carottes de sédiments (a) et d'exposition des organismes au laboratoire (b)



Figure 3: Système Rhizon® installé sur une carotte de sédiments

### 3.2.2 Exposition des organismes au laboratoire

1200 larves de chironome de stade 4 (7 jours post-éclosion) sont ajoutées à 12 carottes de sédiments (100 larves par carotte). En parallèle, 300 larves sont ajoutées à 3 carottes de silice (100 larves par carotte : témoins). Les chironomes sont exposés à 21°C, l'eau de surface est continuellement renouvelée (4 fois par jour) grâce à l'utilisation d'une pompe péristaltique afin de maintenir une qualité de l'eau et une oxygénation adéquate, avec une photopériode de 16 :8h jour :nuit pendant l'expérimentation. Les paramètres garantissant une bonne qualité de l'eau (ammonium  $\text{NH}_4^+$ , Nitrite  $\text{NO}_2^-$ , pH, température et conductivité) sont mesurés en début et fin d'exposition. Les larves sont nourries ad libitum avec 1mg de Tetramin® par jour et par organisme. Deux cinétiques sont réalisées, une d'accumulation (E1) où les organismes sont

sacrifiés au bout de 2 (T1), 3 (T2) et 4 (T3) jours d'accumulation, 2 carottes de sédiments contenant chacune 100 organismes sont sacrifiées par temps d'échantillonnage. Une autre cinétique d'élimination (E2), après deux jours d'exposition, les organismes présents dans 6 carottes de sédiments sont transférés dans 3 aquariums de silice (environ 200 larves par aquarium). Les organismes sont alors sacrifiés après 6 (Ta), 18 (Tb) et 42 (Tc) heures de dépuratation. Les organismes témoins sont sacrifiés 4 jours après leur introduction dans les carottes de silice (Te) (Tableau 4, Figure 4).

**Tableau 4 : Tableau explicatif de l'utilisation de chacune des carottes de sédiments avant et pendant l'expérimentation menée au laboratoire**

Carottes de sédiments	Temps d'exposition (j)	Temps d'élimination après 2 jours d'exposition (h)	Utilisation
C1	0	0	tamassage sur le terrain afin d'estimer la quantité d'organismes autochtones présents
C2	0	0	carotte T0: découpée en 6 couches pour la caractérisation physico-chimique du sédiment et la teneur en PFASs à T0
C3	2	0	carottes T1: pool des deux carottes, premier point d'accumulation
C4			
C5	3	0	carottes T2: pool des deux carottes, deuxième point d'accumulation
C6			
C7	4	0	carottes T3: pool des deux carottes, troisième point d'accumulation et découpage d'une des deux carottes en 6 couches pour la caractérisation physico-chimique du sédiment et la teneur en PFASs à T3
C8			
C9	2	6	carottes Ta: pool des deux carottes, premier point de dépuratation
C10			
C11	2	18	carottes Tb: pool des deux carottes, deuxième point de dépuratation
C12			
C13	2	42	carottes Tc: pool des deux carottes, troisième point de dépuratation
C14			

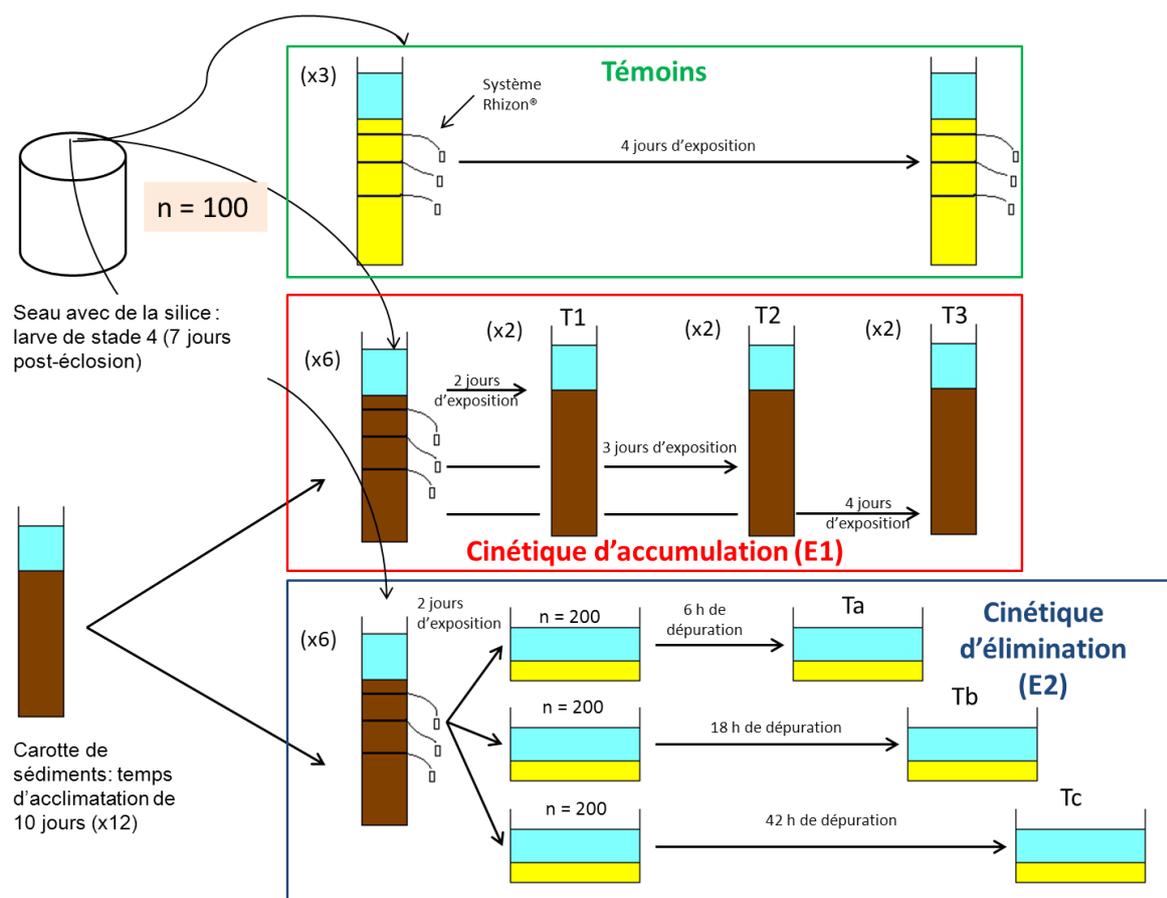


Figure 4: Design expérimental des chironomes exposés à des carottes de sédiments.

### 3.2.3 Collecte des échantillons et mesure des traits de vie

L'eau de surface est échantillonnée à chaque temps (pour chaque cinétique et pour les témoins, tandis que l'eau interstitielle n'est échantillonnée qu'au temps T1 de la cinétique d'accumulation et 4 jours après l'introduction des chironomes dans les carottes de silice (à Te). Les sédiments sont récupérés à T1, T2 et T3 de la cinétique d'accumulation, à T1 et T2 seule la surface du sédiment est échantillonnée, mais à T3 la carotte est découpée en 6 couches comme pour la carotte T0 afin de mesurer dans chaque couche, les concentrations en PFASs. Afin de suivre l'évolution de la croissance des chironomes pendant l'expérimentation, les organismes sont photographiés et pesés par groupe de 10 (4x) à chaque temps d'échantillonnage, dans les témoins et au début de l'expérimentation. La taille est alors mesurée à l'aide d'un logiciel d'analyse d'images (J-Micro Vision®). La survie est également notée à chaque temps d'échantillonnage et dans les témoins.

### 3.2.4 Dosage des PFASs

Les PFASs ont été extraits et purifiés de la même manière que dans les publications 2 et 3 (Chapitre 4 et 5) et dosés par LC-MS/MS.

### 3.2.5 Traitement des données et modélisation

Les données ont été traitées en vérifiant la normalité des données avec le test de Shapiro et en utilisant le test t-de Student, et pour la modélisation en utilisant le package « DeSolve » sous le logiciel R.

Le modèle de bioaccumulation utilisé est un système de deux équations différentielles prenant en compte la croissance des chironomes pendant les expérimentations (Eq. 1 et 2).

$$\frac{d(C_{org})}{dt} = \left( \frac{1}{L} \cdot k_u \cdot C_{sed} - \frac{1}{L} \cdot k_e \cdot C_{org} \right) - C_{org} \times \frac{d(V)}{dt} \times \frac{1}{V} \quad \text{Eq. (1)}$$

Avec  $C_{org}$ , la concentration en PFAS dans les organismes ( $\text{ng} \cdot \text{g}^{-1}$  poids frais, pf) ;  $k_u$  et  $k_e$ , les coefficients d'accumulation et d'élimination ( $\text{g} \cdot \text{g}_{\text{pf}}^{-1} \cdot \text{j}^{-1}$  et  $\text{j}^{-1}$  respectivement) ;  $L$ , la longueur des chironomes en cm et  $V$ , le volume de l'organisme (en unité volumique).

$$\frac{d(L)}{dt} = r \quad \text{Eq. (2)}$$

Avec  $r$  le taux de croissance de l'organisme en  $\text{cm} \cdot \text{j}^{-1}$ .

## 3.3 Résultats et discussion

### 3.3.1 Caractérisation physico-chimique des sédiments

La teneur en carbone organique (perte au feu) et la teneur en eau diminuent avec la profondeur de la carotte (perte au feu : 8.2 % entre 0 et 0.5 cm ; 4.8 % entre 6.5 et 8 cm ; teneur en eau : 65.3 % entre 0 et 0.5 cm ; 34.2 % entre 6.5 et 8 cm ) ainsi que la teneur en carbonate (22.2 % entre 0 et 0.5 cm) jusqu'à 3.5 cm (19.8 % entre 2 et 3.5 cm) mais cette dernière augmente entre 3.5 et 8 cm (26.4 % entre 6.5 et 8 cm). La teneur en azote diminue également avec la profondeur (0.25 % entre 0 et 0.5 cm ; 0.14 % entre 6.5 et 8 cm) (Figure 5 B). Les résultats granulométriques montrent qu'entre 0 et 3.5 cm les particules sédimentaires sont plus fines par rapport aux derniers centimètres (entre 3.5 et 8 cm) (Figure 5 D).

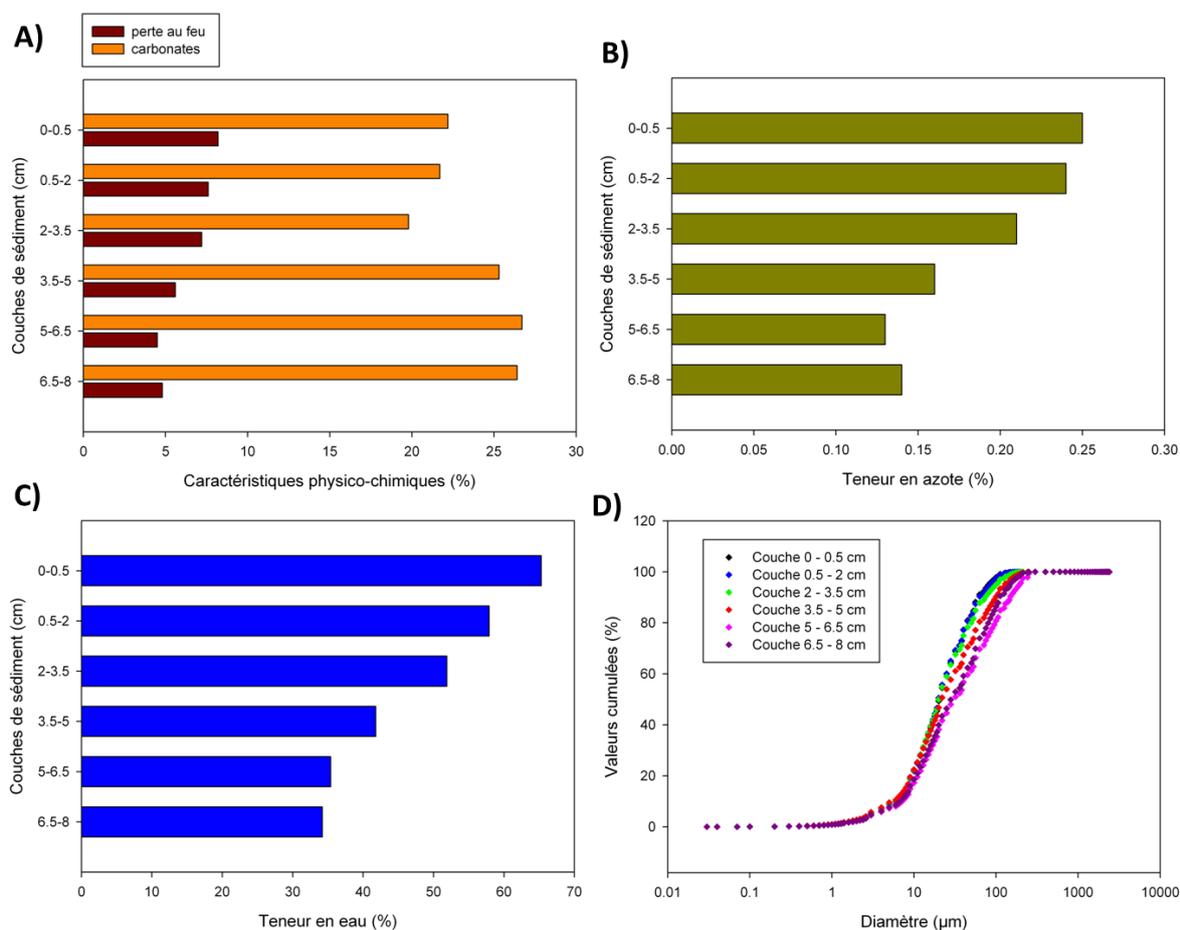


Figure 5: Caractéristiques physico-chimique de la carotte de sédiments à T0, A) perte au feu et teneur en carbonates, B) teneur en azote, C) teneur en eau et D) granulométrie.

### 3.3.2 Répartition des PFASs dans les eaux et les sédiments

L'eau de surface présente plusieurs composés perfluorés à concentration équivalente dans les essais et dans les témoins (PFBA, PFPA, PFHxA, PFOA, PFBS, PFHxS, PFHpS et PFOS). D'autres composés sont présents uniquement dans les essais (PFDA, PFUnA, PFTrDA, 6:2 FTSA, FOSA, MeFOSAA et EtFOSAA). 2 composés sont présents dans les tests et dans les témoins mais à des niveaux plus faibles que dans les essais (PFHpA et PFNA). De la même manière que pour l'eau de surface, certains composés sont retrouvés dans l'eau interstitielle des carottes témoins à des niveaux équivalents à ceux dosés dans les essais (PFPA, PFHpA, PFOA, PFBS, PFHxS et PFOS). Certains composés sont retrouvés uniquement dans l'eau interstitielle des carottes de sédiments (PFNA, PFUnA, 6:2 FTSA, MeFOSAA et EtFOSAA), seul le PFHxA est retrouvé à la fois dans les témoins et dans les essais dans des concentrations plus fortes dans les essais que dans les témoins.

Les PFASs présents dans les carottes de sédiment sont présentés sur la figure 6 avec une carotte prélevée à T0 (Figure 6 A) et une à T3 (Figure 6 B). Les carottes témoins présentent de très faibles valeurs en PFDA, PFUnA et PFOS (<LQ à 0.002 ng.g<sup>-1</sup>dw) et aucun autre composé n'a été détecté. Nous observons un profil similaire en PFASs au niveau de toutes les couches de la carotte à T0 avec une diminution des concentrations (sommées des PFASs) en fonction de l'augmentation de la profondeur. La carotte prélevée après 10 jours de stabilisation au laboratoire et 4 jours d'exposition à 21°C (carotte T3) présente un profil similaire à celui de la carotte à T0 pour les 3 premiers centimètres (de 0 à 3.5 cm). Cependant, les concentrations en PFDA, PFDoA, PFTeDA et en EtFOSAA augmentent avec la profondeur tandis que celles en PFTrDA diminuent avec la profondeur. De manière générale les concentrations en PFASs augmentent avec la profondeur avec des concentrations maximales entre 5 et 6.5 cm, ce qui est conforme avec les résultats de Raux J. et al. (in prep.).

**Tableau 5 : Concentrations en PFASs exprimées en ng.g<sup>-1</sup>ps au niveau des différentes couches sédimentaire de la carottes T3.**

Couches sédimentaire (cm)	PFDA	PFDoA	PFTrDA	PFTeDA	EtFOSAA
0-0.5	0.12 ± 0.02	0.23 ± 0.03	2.55 ± 0.33	0.12 ± 0.02	0.18 ± 0.02
0.5-2	0.57 ± 0.08	0.35 ± 0.04	2.26 ± 0.30	0.19 ± 0.03	0.24 ± 0.03
2-3.5	0.22 ± 0.03	0.29 ± 0.03	1.88 ± 0.25	0.16 ± 0.02	0.37 ± 0.04
3.5-5	2.16 ± 0.30	1.62 ± 0.19	1.24 ± 0.16	0.74 ± 0.11	0.76 ± 0.09
5-6.5	4.96 ± 0.68	3.07 ± 0.37	0.94 ± 0.12	1.43 ± 0.21	0.76 ± 0.09
6.5-8	3.55 ± 0.49	2.65 ± 0.32	0.96 ± 0.13	1.37 ± 0.20	1.26 ± 0.15

Cette modification des concentrations après le 3<sup>ème</sup> centimètre de la carotte de sédiments peut être liée à la variabilité du rejet industriel et à la variabilité spatio-temporelle de l'échantillonnage des carottes de sédiments (Raux J. et al., in prep.). Cependant l'activité bioturbatrice (mais aussi bio-irrigatrice) des organismes autochtones (corbicules et oligochètes) peut également modifier l'oxygénation et la répartition des composés dans les sédiments (Mermillod-Blondin et al., 2013).

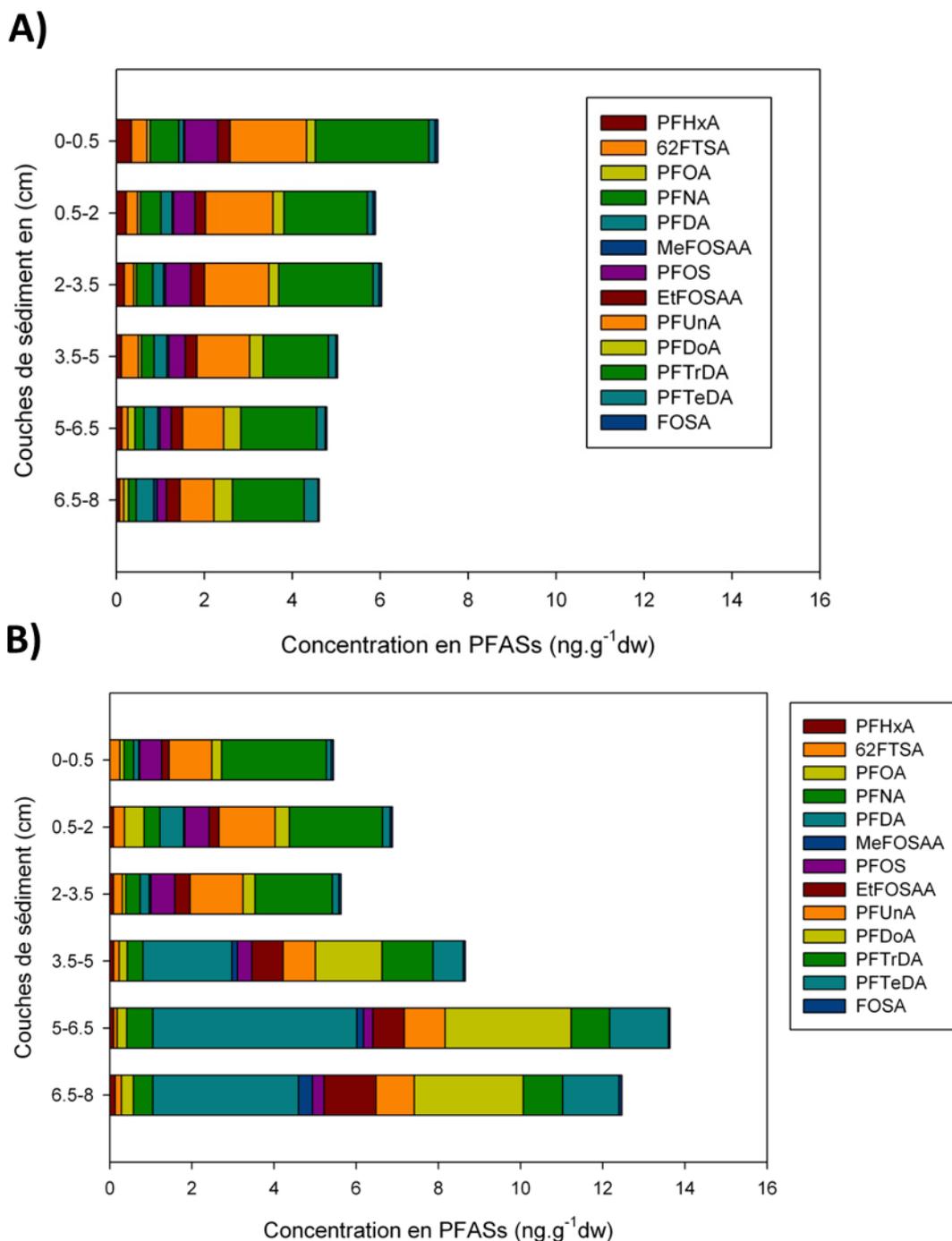


Figure 6: Concentration en PFASs dans les carottes de sédiments à T0 (A) et à T3 (B) en ng.g<sup>-1</sup>dw

### 3.3.3 Survie et croissance des chironomes

La survie des chironomes pendant les expérimentations est supérieure à 70% et supérieure à 80% dans les témoins. La croissance suit un modèle linéaire pendant les expérimentations d'accumulation et d'élimination (Figure 7). Ces résultats sont en accord

avec ceux observés lors des cinétiques d'accumulation et d'élimination des PFASs à partir de sédiment homogénéisé (Publication 2, Chapitre 4) et avec l'étude de Péry et al. (2002).

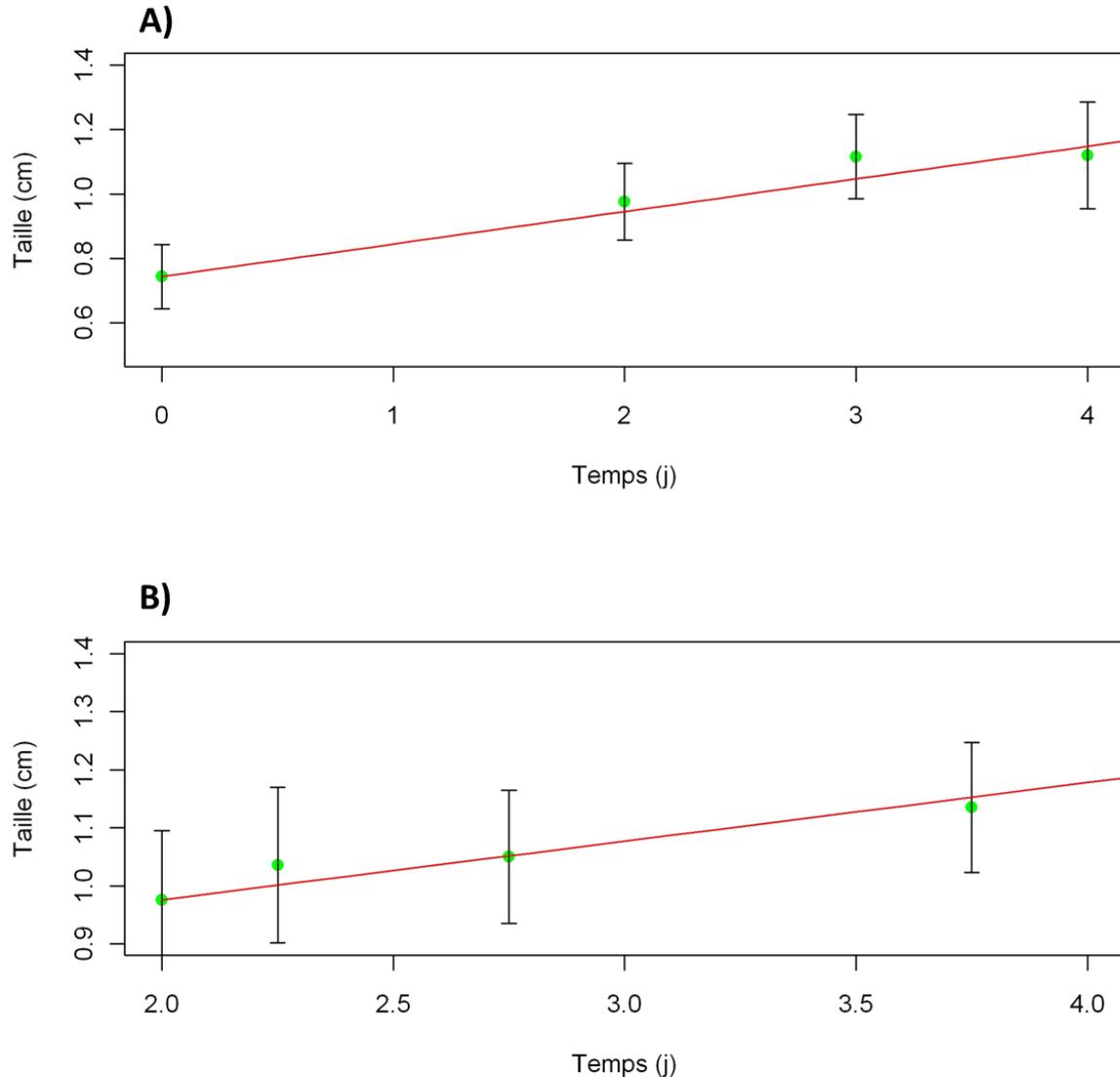
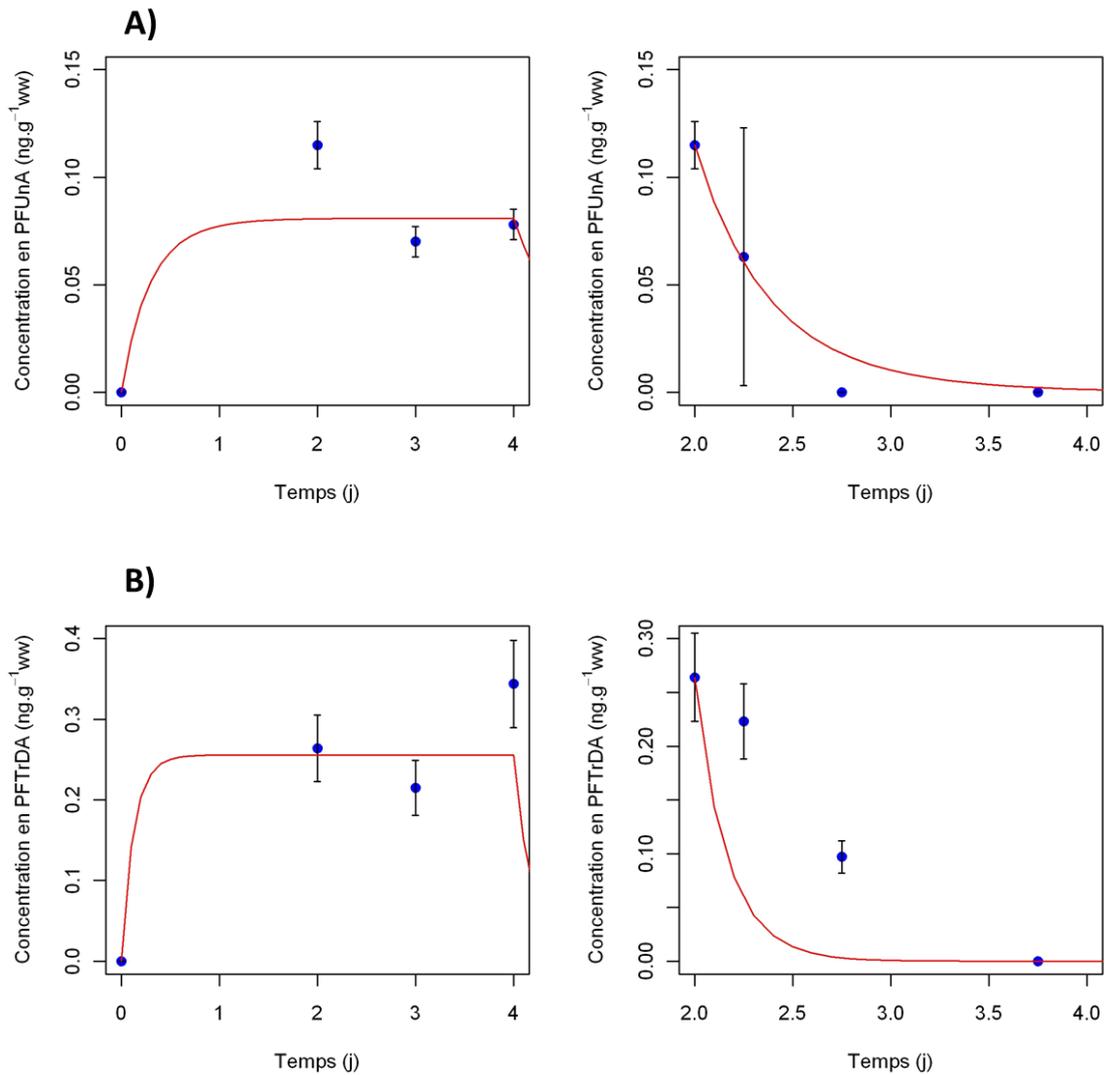


Figure 7: Croissance des chironomes pendant la cinétique d'accumulation (A) et pendant la cinétique d'élimination (B), (A)  $R^2 = 0.94$ ,  $p$ -value = 0.03 et (B)  $R^2 = 0.94$ ,  $p$ -value = 0.03.

### 3.3.4 Cinétiques d'accumulation et d'élimination des PFASs

Les chironomes ont accumulé les deux composés carboxylates représentatifs de la signature du sédiment d'exposition : le PFUnA et le PFTrDA (Figure 8). Ils ont également accumulé, mais dans des concentrations très proches des limites de quantifications, du FOSA et du 6:2 FTSA et aussi du PFOS. Cependant, les valeurs de PFOS accumulées par les

chironomes sont similaires entre témoins et essais, le PFOS étant présent dans les eaux de surface et interstitielle à des niveaux équivalents pour les essais et les témoins. Les cinétiques d'accumulation et d'élimination du PFUnA et du PFTrDA suivent un modèle exponentiel. Les lignes rouges de la figure 8 représentent les données simulées du modèle et les points bleus, les données observées. Les données simulées de la cinétique d'élimination du PFTrDA ne s'ajustent pas d'une manière optimale aux données, un décalage est visible entre le modèle et les données (Figure 8). Ce modèle permet de calculer des constantes d'accumulation et d'élimination d'une manière simultanée par la méthode des moindres carrés pondérés. Les conditions d'expositions des organismes entre les sédiments homogénéisés et les carottes de sédiments étant les mêmes (même température, même quantité de nourriture, même eau de surface) nous pouvons admettre que la physiologie des chironomes et donc l'élimination des composés par ces derniers, est la même dans ces deux expérimentations. Cette hypothèse nous permet alors de contraindre les constantes d'élimination aux valeurs de celles obtenues avec l'exposition des organismes aux sédiments homogénéisés. Les données d'accumulation montrent un état stable rapidement atteint pour les deux substances et une élimination complète en 18h pour le PFUnA et en 42h pour le PFTrDA en accord avec les résultats observés à partir de sédiment homogénéisé (Publication 2, Chapitre 4). La variabilité que l'on peut observer au niveau des points d'accumulation des PFASs par le chironome peuvent être en lien avec l'hétérogénéité spatiale existante au sein des carottes de sédiments (Ferrari et al., 2014).



**Figure 8: Cinétiques d'accumulation et d'élimination du PFUnA (A) et du PFTrDA (B) par des chironomes exposés à des carottes de sédiments. Les lignes rouges correspondent aux données simulées par le modèle et les points bleus aux données observées.**

En revanche, les constantes d'accumulation, sont plus faible que celles obtenues avec du sédiment homogénéisé (Publication 2, Chapitre 4). Tandis ce que les temps de demi-vie mesurés ( $T_{1/2}$  de 2.4h pour le PFTrDA et de 7.2h pour le PFUnA) reflètent une accumulation et une élimination rapide des composés (Tableau 6). Les constantes  $k_u$  et  $k_e$  sont également faibles en comparaison de celles obtenues par Higgins et al. (2007) dans leur étude utilisant un oligochète (*Lumbriculus variegatus*) ( $k_u$  et  $k_e$  PFUnA =  $11.6 \pm 1.2 \cdot 10^4$  g<sub>oc</sub>.g<sub>ww</sub><sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup> et  $18.8 \pm 3.2 \cdot 10^4$  h<sup>-1</sup> respectivement (Higgins et al., 2007) ;  $k_u$  et  $k_e$  PFUnA =  $0.004$  g.g<sub>ww</sub><sup>-1</sup>.h<sup>-1</sup> et  $0.002$  h<sup>-1</sup> respectivement dans cette étude) (Tableau 6). Cela peut notamment s'expliquer par les différences de traits de vie entre *C. riparius* et *Lumbriculus variegatus* (Nogaro et al.,

2009). D'ailleurs les oligochètes prélevés à l'île du Beurre sont plus contaminés que les chironomes prélevés sur le même site (Babut et Labadie, communication personnelle).

**Tableau 6: Paramètres de sortie du modèle avec une constante d'élimination fixée à 0.002 h<sup>-1</sup>, et BSAF<sub>modèle</sub> calculé à partir des constantes k<sup>u</sup> et k<sup>e</sup>.**

Composés	PFTTrDA	PFUnA
k <sub>u</sub> (g·g <sub>ww</sub> <sup>-1</sup> ·h <sup>-1</sup> )	0.007	0.004
k <sub>e</sub> (h <sup>-1</sup> )	0.002	0.002
T <sub>1/2</sub> (h)	2.4	7.2
BSAF <sub>modèle</sub>	4.25	1.8

### 3.3.5 Comparaison entre le chironome exposé à du sédiment homogénéisé et du sédiment non déstructuré

Nous comparons deux expérimentations menées dans les mêmes conditions (avec des chironomes exposés pendant 4 jours du début à la fin du stade 4 à 21°C), une réalisée avec du sédiment homogénéisé (correspondant à l'expérimentation réalisée en avril 2012- chapitre 3) et une réalisée avec du sédiment non-déstructuré (juillet 2013). Les résultats des dosages de PFASs dans les deux premiers centimètres des carottes de sédiments et ceux réalisés dans le sédiment homogénéisé sont présentés sur la figure 9A. Les concentrations en PFASs (mis à part le PFOS et le FOSA) sont similaires (t-test, *p*-value < 0.05) dans le sédiment homogénéisé et dans les carottes de sédiments. Nous pouvons donc considérer ces deux expérimentations comme comparables en termes de concentration d'exposition en PFASs. Cependant les concentrations en PFASs dans des organismes exposés au sédiment homogénéisé sont plus élevées comparé à des organismes exposés au sédiment non déstructuré (Figure 9B). Les valeurs de k<sub>u</sub>, du temps de demi-vie et de BSAFs (Tableau 7) sont également moins élevée dans le cas d'une exposition à des carottes de sédiments par rapport à celles obtenues avec une exposition à du sédiment homogénéisé. Ces observations confirment donc la maximisation de l'exposition existante avec l'utilisation de sédiment homogénéisé.

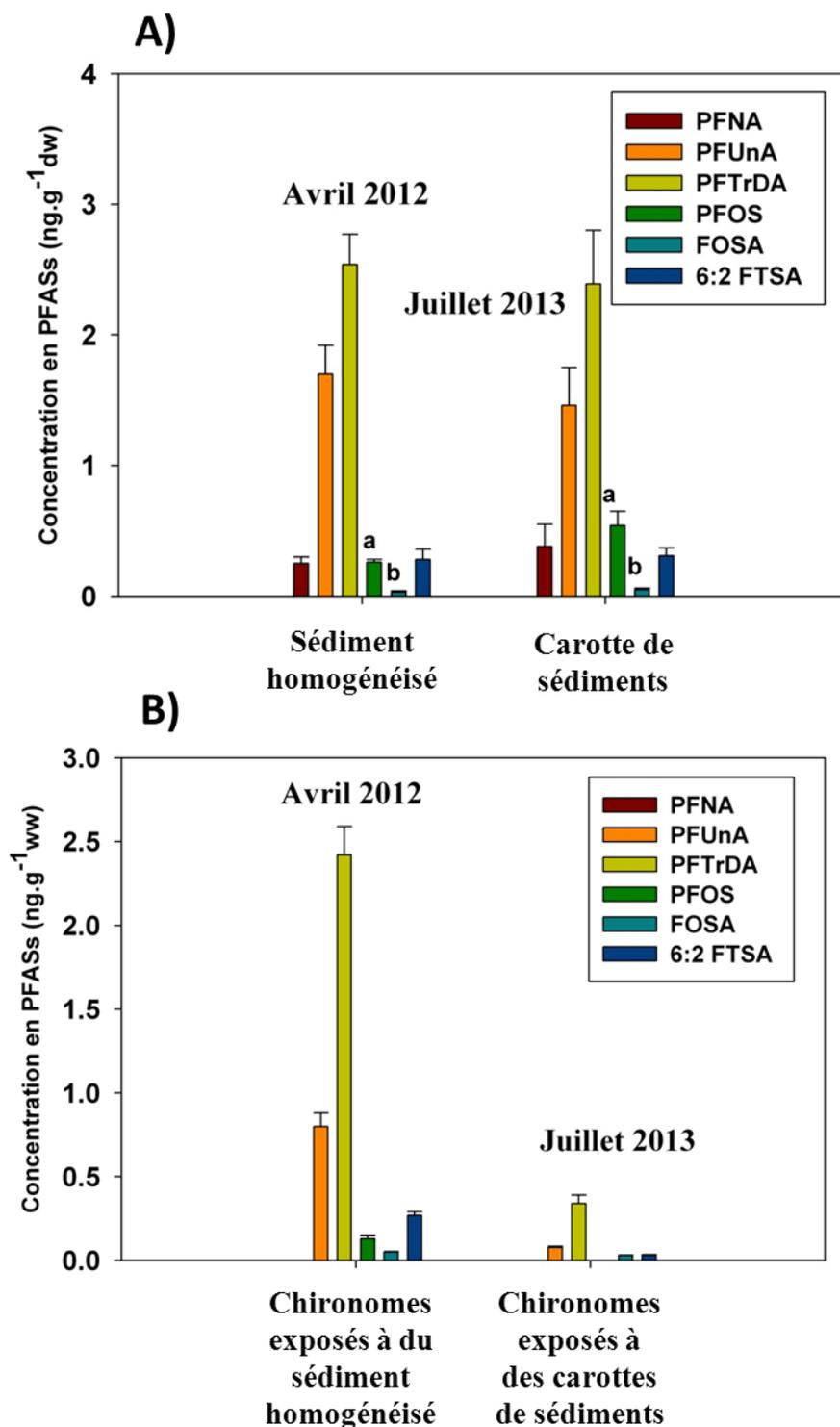


Figure 9: Concentrations en PFASs dans les sédiments et dans les chironomes : A) concentrations en PFASs dans des sédiments homogénéisés et dans les 2 premiers centimètres des carottes de sédiments. Les lettres *a* et *b* indiquent une différence significative des concentrations en PFASs entre le sédiment homogénéisé et les carottes de sédiments ( $p$ -value <0.05, t-test sur le logiciel Statistica 9®). Et B) concentrations en PFASs dans des chironomes exposés à du sédiment homogénéisé et à des carottes de sédiments, le PFOS n'est pas présent pour les chironomes exposés aux carottes car les valeurs n'étaient pas différentes des témoins.

**Tableau 7: Comparaison de différentes variables caractérisant la bioaccumulation des PFASs chez le chironome à partir de sédiment homogénéisé (chapitre 3 et 4) et à partir de carottes de sédiments**

Composés	Sédiment homogénéisé		Carotte de sédiments	
	PUnA	PTrDA	PUnA	PTrDA
$k_u(\text{g} \cdot \text{g}_{\text{ww}}^{-1} \cdot \text{h}^{-1})$	0.03	0.04	0.004	0.007
$k_e(\text{h}^{-1})$	0.05	0.04	0.002	0.002
BSAF <sub>modèle</sub>	0.63	1.08	0.14	0.29
$T_{1/2}(\text{h})$	12	16.8	7.2	2.4

### 3.4 Conclusion

Dans des conditions d'expositions similaires, les concentrations accumulées par les organismes sont plus faibles dans le cas d'une exposition à du sédiment non-déstructuré en comparaison avec une exposition à du sédiment homogénéisé. L'homogénéisation a donc pour effet de maximiser l'exposition des PFASs en modifiant la redistribution des composés par une augmentation de la fraction dissoute diminuant l'accumulation effective par les organismes.

## 4 Influence des matières en suspension (MES) et de l'eau de surface comme sources complémentaires de PFASs

### 4.1 Introduction

Les sédiments sont une des sources de transfert des PFASs vers les organismes benthiques (Bertin et al., 2014b), cependant ce ne sont pas les seuls, les PFASs peuvent également être présents dans l'eau de surface et/ou associés aux matières en suspension (Ahrens and Bundschuh, 2014; Labadie and Chevreuil, 2011). Afin d'estimer le rôle des différentes sources dans le transfert des PFASs aux invertébrés benthiques, des chironomes ont été encagés sur le terrain. Ces organismes ne sont alors exposés qu'aux MES et à l'eau de surface du site.

## 4.2 Matériel et Méthode

### 4.2.1 Encagement des organismes sur le terrain

Deux campagnes d'encagement de chironomes sur le terrain ont été réalisées en 2013, une au mois de juin et une autre au mois d'octobre. A chaque campagne, 8 cages ont été préparées avec un fond de silice. 100 chironomes en début de stade 4 (7 jours post-éclosion) ont été ajoutés dans chaque cage. Les cages ont ensuite été placées dans une caisse lestée (avec des pierres) puis plongée dans l'eau du site de l'île du Beurre et solidement accrochées (Fig. 10). Le temps d'exposition des organismes est fonction de la température du site. Pour la campagne du mois de juin, la température a été de  $17.2 \pm 1.3^{\circ}\text{C}$ , tandis que pour celle du mois d'octobre la température a été de  $18.2 \pm 0.9^{\circ}\text{C}$ , les durées d'exposition des organismes ont été ajustées d'après la relation existante entre la température et la croissance des organismes (Péry and Garric, 2006) (4 jours pour les deux campagnes). Les chironomes ont été nourris pendant l'exposition à l'aide d'une seringue et d'une solution de Tetramin® à 100g/L. 2 mL de cette solution ont été introduits dans chaque cage lors de leur pose sur site, puis deux jours après leur pose. L'eau du site a été prélevée dans des flacons en polyéthylène (PE) lors de la deuxième campagne afin d'y doser les PFASs. La taille et le poids des organismes ont été mesurés avant et après l'exposition sur le terrain par lot de 15 organismes (x2). Un lot de 400 larves de chironomes a servi de point de référence (T0) pour les analyses de PFASs et des isotopes du  $^{13}\text{C}$  et de  $^{15}\text{N}$ . Les organismes à Tfinal (au moment du retrait des cages) ont également été conditionnés pour le dosage des PFASs et des isotopes du  $^{13}\text{C}$  et de  $^{15}\text{N}$ .

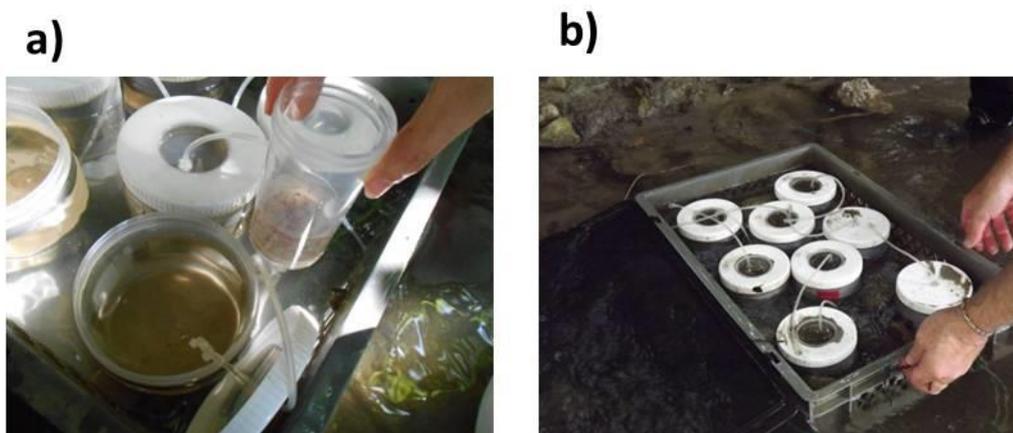


Figure 10 : Système d'encagement des chironomes sur le terrain : a) mis en place des chironomes dans le système et b) cages fermées avec leurs tubes flexibles permettant le nourrissage des organismes

### 4.2.2 Dosage des PFASs

Les PFASs ont été extraits et purifiés de la même manière que dans les publications 2 et 3 (Chapitre 4 et 5) et dosés par LC-MS/MS.

## 4.3 Résultats et discussion

### 4.3.1 Survie et croissance des organismes

La survie des organismes était supérieure à 90% pour chaque campagne, et leurs taux de croissance ont été respectivement de  $0.099 \pm 0.041 \text{ cm.j}^{-1}$  et de  $0.084 \pm 0.026 \text{ cm.j}^{-1}$  (juin et octobre).

### 4.3.2 Accumulation des PFASs chez le chironome

Les chironomes engagés aux mois de juin et d'octobre 2013 ont accumulé les deux composés carboxylates à longue chaîne caractéristiques de la contamination du site (PFUnA et PFTrDA), un composé sulfonate (le PFOS), son précurseur le FOSA et un fluorotélomère le 6:2 FTSA. L'accumulation des PFASs lors des deux campagnes présente la même distribution et les mêmes concentrations exceptées pour le 6:2 FTSA accumulé à une concentration plus forte par les chironomes engagés au mois d'octobre (Figure 11).

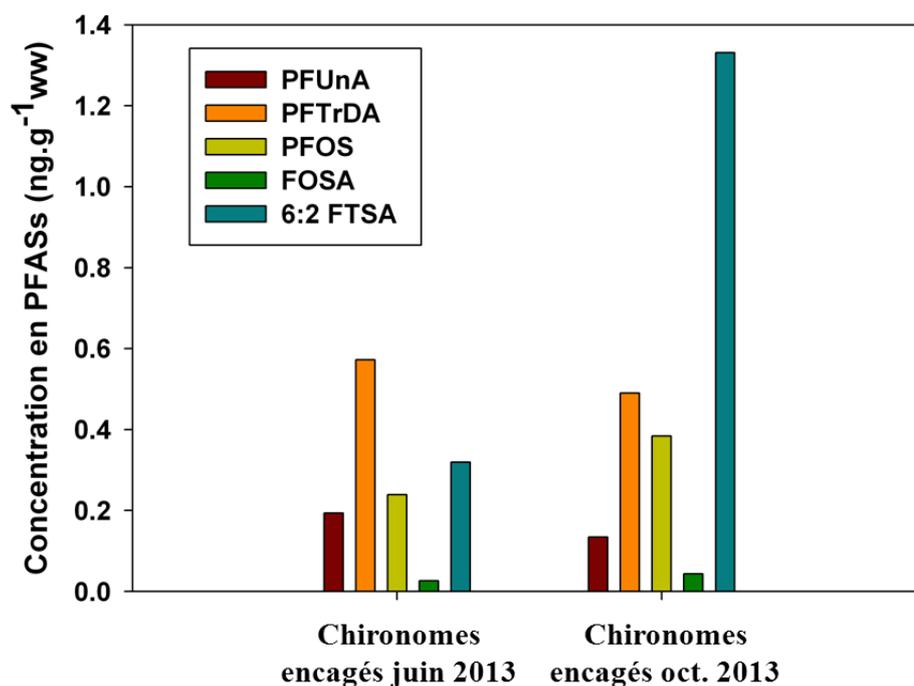


Figure 11 : Concentrations en PFASs dans les chironomes engagés en juin et en octobre 2013

Les résultats des dosages de PFASs dans l'eau du site prélevée en octobre 2013 montrent la présence de composés carboxylates à courte et à longue chaîne (C<sub>4</sub> à C<sub>11</sub>) ainsi que de composés sulfonates à courte et à longue chaînes (C<sub>4</sub> à C<sub>8</sub>). De fortes concentrations en PFHxA ( $352.4 \pm 153.5 \text{ ng.L}^{-1}$ ) et en 6 :2 FTSA ( $26.09 \pm 0.03 \text{ ng.L}^{-1}$ ) ont notamment été mesurées (Figure 12). Malgré ces fortes concentrations le chironome ne présente pas d'accumulation du PFHxA. Cependant la forte concentration en 6 :2 FTSA dans l'eau peut potentiellement expliquer la concentration en 6 :2 FTSA accumulée à un niveau plus élevé par les chironomes engagés en octobre 2013 (Figure 11). La mesure des concentrations en PFASs dans l'eau du site en juin 2013 n'a pas été réalisée, nous ne pouvons donc pas confirmer cette observation.

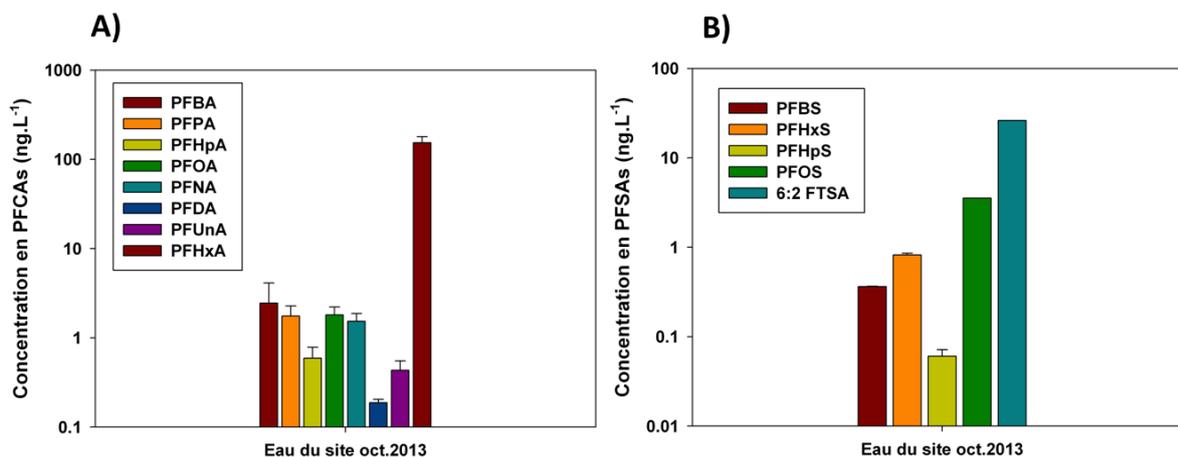


Figure 12: Concentrations en PFASs dans l'eau du site échantillonnée en octobre 2013, A) concentrations en PFCAs et B) concentrations en PFSA et en 6 :2 FTSA.

### 4.3.3 Caractérisation des sources de contaminations

Les figures 13, 14 et 15 présentent des comparaisons entre les différents cas de figure expérimentés. Ces comparaisons se font entre des expositions réalisées la même année dans le but de s'affranchir, du moins en partie, de la variabilité temporelle.

La figure 13, permet de comparer des chironomes exposés à du sédiment non déstructuré au laboratoire (juin 2013) et des chironomes engagés sur le terrain (juin et octobre 2013). Les profils de contamination et les concentrations en PFASs accumulées sont similaires, voire légèrement plus faibles pour les chironomes exposés aux carottes de sédiments. Mais ceci n'est pas vrai pour le 6 :2 FTSA qui présente une concentration plus élevée chez les organismes engagés en octobre 2013. La contamination des chironomes par le 6 :2 FTSA, qui est un composé constitué de seulement 6 carbones fluorés, donc plus hydrophile, et qui est présent en forte concentration dans l'eau de surface, se fait via l'eau de surface, donc par la voie tégumentaire.

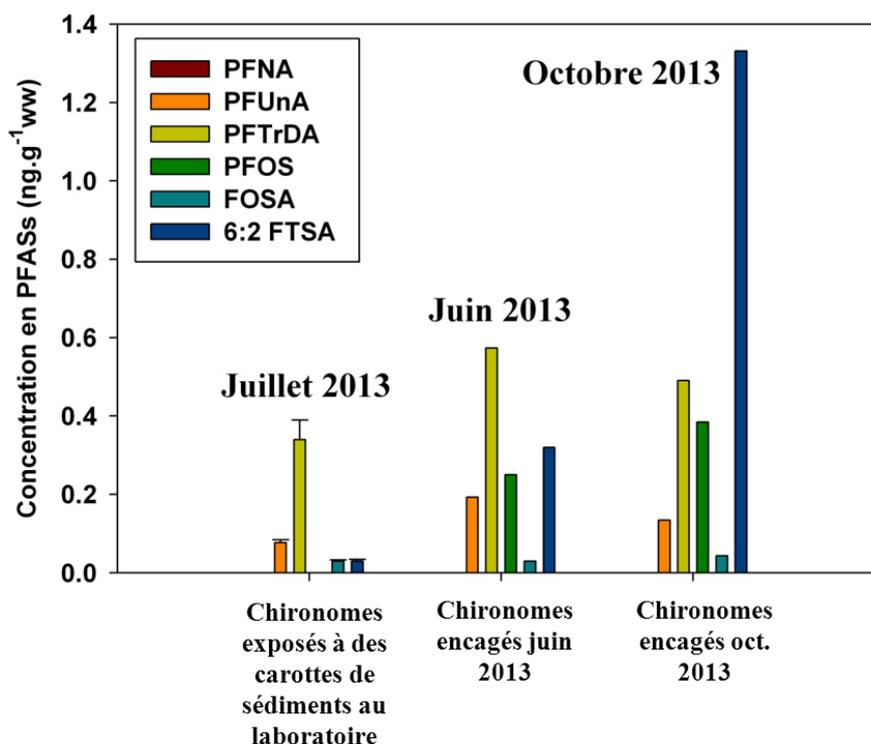


Figure 13: Concentrations en PFASs dans des chironomes exposés à des carottes de sédiment au laboratoire et des chironomes engagés sur le terrain en juin et en octobre 2013.

La figure 14 présente les concentrations en PFASs accumulées par des organismes exposés à du sédiment homogénéisé au laboratoire (mars 2013) et des organismes engagés sur le terrain (juin et octobre 2013). Les profils de contamination et les concentrations en PFASs sont similaires, excepté pour le PFOS et le 6:2 FTSA qui présentent de plus fortes concentrations chez les chironomes engagés. Comme le 6:2 FTSA, le PFOS est plus hydrophile que les autres composés, les chironomes se contaminent donc via l'eau de surface pour ces deux composés. Ces résultats soulignent donc l'intérêt d'effectuer des expositions d'organismes *in situ*.

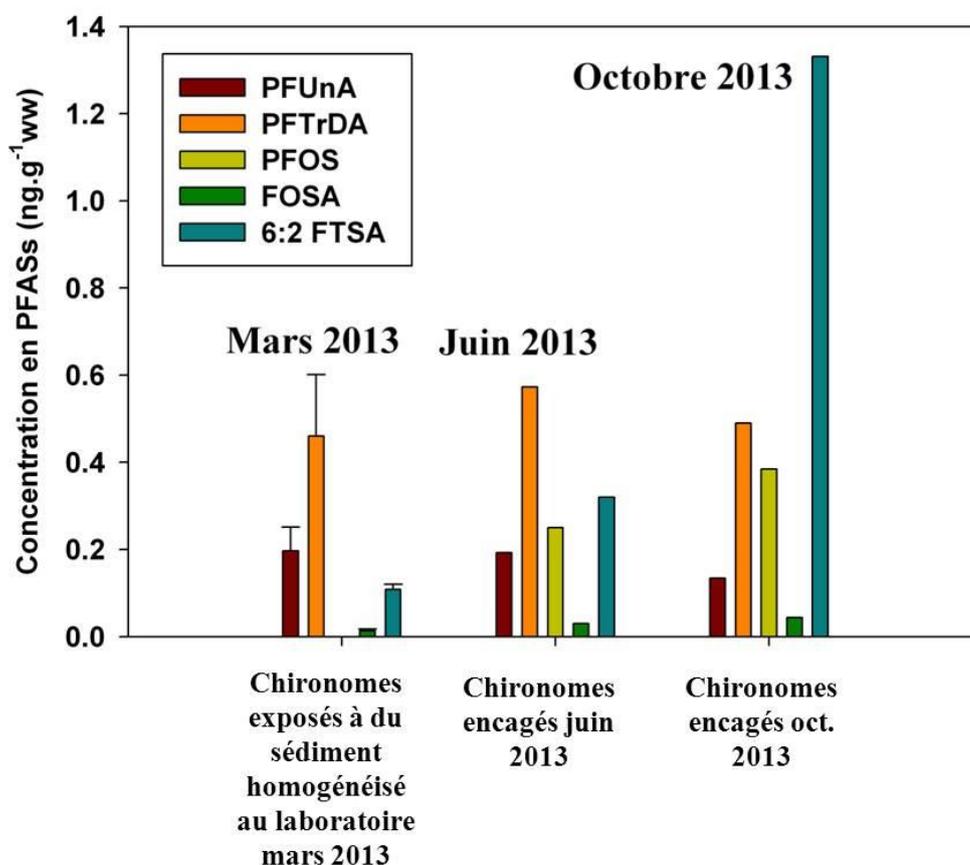


Figure 14: Concentrations en PFASs dans des chironomes exposés à du sédiment homogénéisé au laboratoire et des chironomes encagés sur le terrain en juin et en octobre 2013.

La figure 15 compare les concentrations en PFASs accumulées par des chironomes autochtones (prélevés en octobre 2012 et en juin 2013) et encagés (en juin et en octobre 2013). Les profils de contamination ne sont pas les mêmes, les organismes autochtones accumulent du PFOA, du PFNA et de faibles concentrations en PFDoA contrairement aux organismes encagés. Les concentrations en PFASs sont plus élevées chez les chironomes autochtones, cela est surtout vrai pour le PFUnA, le PFTrDA et le PFOS. Ces derniers sont exposés à toutes les sources de contaminations, les sédiments, les MES, l'eau interstitielle et de surface, tandis que les chironomes encagés ne sont exposés qu'aux PFASs contenus dans les MES et l'eau de surface. Les composantes « sédiment » et « eau interstitielle » apportent donc une part non négligeable de PFASs aux organismes notamment pour les composés à longues chaînes. De plus les chironomes encagés sont nourris, ce qui peut sous-estimer la contamination des organismes.

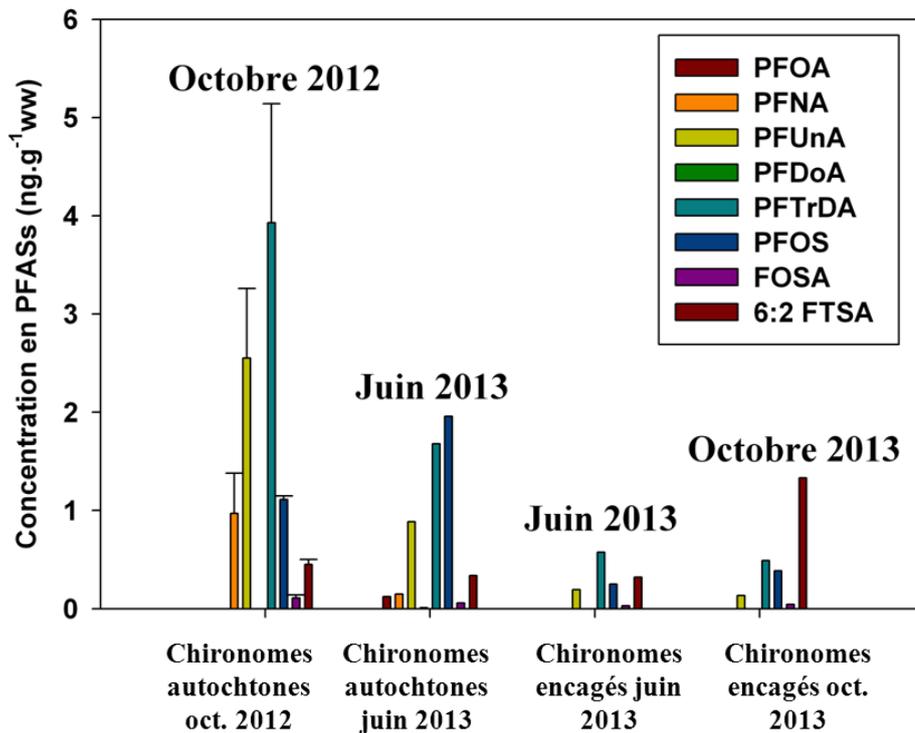


Figure 15: Concentrations en PFASs dans des chironomes autochtones prélevés en octobre 2012 et en juin 2013, ainsi que dans des chironomes engagés en juin et en octobre 2013.

#### 4.4 Conclusion

Les organismes autochtones présentent des concentrations en PFASs plus élevées que les organismes exposés au laboratoire. Les résultats montrent que la contamination en PFASs ne se fait pas uniquement par le sédiment et l'eau interstitielle mais aussi via les matières en suspension et l'eau de surface.

### 5 Discussion - conclusion

La question du réalisme des données obtenues au laboratoire en comparaison des données obtenues dans le milieu est complexe. Ce chapitre a eu pour but d'explorer les différentes voies d'exposition des PFASs mais aussi les constantes d'accumulation et d'élimination ( $k_u$  et  $k_e$ ), des temps de demi-vie et des BSAFs, en tenant compte de la variabilité temporelle de la contamination. En effet les concentrations en PFASs dans les sédiments peuvent varier au cours du temps. Ce qui s'explique par les variations temporelles

des apports en PFASs étroitement liés à l'irrégularité du rejet industriel mais aussi pouvant être liés à des événements ponctuels comme une chasse des sédiments du Rhône par exemple.

Deux questions distinctes ont été mises en évidence dans ce chapitre, celle des voies d'expositions réduites au laboratoire et celle du réalisme des constantes  $k_u$  et  $k_e$ , du temps de demi-vie et des BSAFs.

Deux hypothèses ont été explorées, celle de l'effet de la manipulation des sédiments avant une exposition au laboratoire en exposant des chironomes à du sédiment non-déstructuré et celle des matières en suspension et de l'eau de surface comme sources de contamination en PFASs pour les organismes.

Les analyses de PFASs sur des organismes autochtones ont montré des niveaux plus élevés sur ces organismes que sur ceux exposés au laboratoire. Les résultats d'une des deux hypothèses explorées montrent une influence de l'homogénéisation des sédiments avant une exposition d'organismes au laboratoire sur l'accumulation des PFASs par une maximisation de l'exposition via une augmentation de la fraction dissoute. Cependant cela n'explique pas les niveaux de PFASs plus élevés chez les organismes autochtones. L'hypothèse des MES et de l'eau de surface comme sources de contaminations prend alors tout son sens. L'encagement de chironomes sur le terrain a permis de mettre en évidence la part des MES et de l'eau de surface dans la contamination en PFASs par comparaison des niveaux de PFASs entre des organismes autochtones et des organismes encagés dans le milieu. Les résultats montrent des niveaux plus élevés chez les organismes autochtones révélant la part importante des MES et de l'eau de surface dans l'accumulation des PFASs par les organismes se rajoutant à celle des sédiments. D'autre part la comparaison entre des organismes exposés à des sédiments et des organismes encagés sur le terrain a permis de mettre en évidence la voie d'exposition préférentielle du PFOS et du 6:2 FTSA via l'eau. Ces résultats confirment l'hypothèse émise lors de la publication 1 (chapitre 3) qui visait à décrire l'accumulation et les voies de transfert des PFASs par les chironomes à partir de sédiment naturel, révélant la présence de PFOS et de 6:2 FTSA dans l'eau interstitielle du sédiment et donc d'une contamination par ces composés via la voie tégumentaire (Bertin et al., 2014b).

D'autres paramètres non explorés dans ce chapitre peuvent également potentiellement jouer un rôle dans la bioaccumulation des PFASs comme les différences de traits biologiques et écologiques entre les espèces autochtones présentes et l'espèce utilisée au laboratoire (ici *C. riparius*). La bioturbation des organismes autochtones, les assemblages microbiens des

biofilms, la température, la conductivité du milieu et l'effet des autres polluants présents sur site (métaux, PCB...) peuvent également influencer la bioaccumulation. Cependant, il apparaît tout de même que l'apport des MES et de l'eau de surface explique de manière significative les différences entre des organismes exposés au laboratoire et des organismes autochtones.

Le système S-WISS1 développé par Ferrari et al. (2014), permettant une exposition des chironomes au sédiment de surface en altérant au minimum sa structure, à son eau interstitielle mais également à l'eau de surface permettrait de se rapprocher de la réalité d'une exposition dans l'environnement.



## *Chapitre 7*

*Synthèse et perspectives*



Les études menées sur les PFASs sont récentes, la première concernant la distribution globale de ces composés ne datant que de 2001 (Giesy and Kannan, 2001). C'est pourquoi la plupart des études ont été menées dans un but de description de l'ampleur de la contamination par l'utilisation du biomonitoring (Ahrens and Bundschuh, 2014; Houde et al., 2011; Houde et al., 2006) mais aussi dans un but de localisation et de compréhension des sources de cette contamination (Prevedouros et al., 2006; Wang et al., 2014a, b). Ces substances ont été montrées être bioaccumulables, persistantes et présentes dans tous les milieux avec un pouvoir de distribution à large échelle. De par leurs caractéristiques physico-chimiques particulières, les indicateurs (Kow, affinité pour les lipides, etc.) rendant habituellement compte de la bioaccumulation des composés persistants ne peuvent être appliqués à ces substances. De plus plusieurs études ont désignés les sédiments comme une source potentielle de contamination en PFASs (Armitage et al., 2006; Martin et al., 2004; Prevedouros et al., 2006), mais les voies de transfert et les facteurs contrôlant la bioaccumulation à partir de ces sédiments sont encore mal connus.

## **1 Objectifs de la thèse**

Deux principales questions ont été abordées dans ce manuscrit de thèse :

(i) celle du rôle du compartiment sédimentaire dans l'accumulation des composés perfluorés dans le biote.

(ii) et celle de l'effet de la variabilité interspécifique sur la bioaccumulation des PFASs.

La première question visait à décrire les cinétiques d'accumulation et d'élimination des PFASs chez deux organismes benthiques, le chironome et le gammare, et de comprendre les voies de transfert de ces composés à l'organisme. Cette question a fait l'objet de trois chapitres dans la thèse, le chapitre 3 visait à décrire les cinétiques d'accumulation et les voies de transfert des PFASs chez le chironome, tandis que le chapitre 4 a eu pour but de décrire les cinétiques d'élimination des PFASs et de mettre en place un modèle de bioaccumulation adapté à la fois au chironome, en y intégrant la croissance, et à la fois aux PFASs, en tenant compte de leurs comportements pendant l'accumulation (test de dépendance à la concentration). Le chapitre 5 a eu pour but de décrire les cinétiques d'accumulation et d'élimination des PFASs ainsi que les voies de transfert de ces composés chez le gammare.

Des constantes d'accumulation et d'élimination ont pu être définies chez ces deux organismes ainsi que des facteurs de bioaccumulation (BSAF).

La deuxième question a eu pour but de comparer les données de bioaccumulation obtenues chez le chironome et chez le gammare. Afin de pouvoir évaluer l'effet de la variabilité interspécifique dans la bioaccumulation des PFASs. Ces deux organismes ayant un comportement dans le milieu très différent : le chironome se nourrit essentiellement de la matière organique contenue dans les sédiments tandis que le gammare est un organisme détritivore. Cette comparaison a fait également l'objet du chapitre 5.

Un autre volet dans ce manuscrit de thèse a été abordé celui du réalisme environnemental des données acquises au laboratoire. Ce volet a fait l'objet du chapitre 6 et visait à comparer et à décrire les différences entre des données obtenues au laboratoire et des données acquises directement sur le terrain. La variabilité spatio-temporelle de la contamination des sédiments, les différences entre des organismes exposés au laboratoire et des organismes autochtones, l'influence de l'intégrité de la structure sédimentaire et de celle des matières en suspension et de l'eau de surface comme sources de contamination en PFASs ont été explorées dans ce chapitre.

## 2 Synthèse des résultats

### 2.1 Modèle conceptuel

Afin de pouvoir évaluer le transfert des PFASs du sédiment aux organismes, un modèle conceptuel a été mis en place. Il s'agissait de pouvoir reconstituer, en quelque sorte, l'historique de la contamination de l'organisme dans le système d'exposition. Pour cela nous avons échantillonné et mesuré les PFASs dans chaque compartiment pouvant entrer en contact avec l'organisme, sachant que l'unique source de contamination était les sédiments. Ainsi, les mesures de PFASs réalisées dans l'eau de surface, les sédiments, l'eau interstitielle, la nourriture apportée aux organismes et les organismes eux même, ont permis de dessiner un modèle de contamination des organismes.

## 2.2 Rôle du compartiment sédimentaire dans la bioaccumulation des PFASs chez le chironome

La description des cinétiques d'accumulation des PFASs chez le chironome a mis en évidence une accumulation rapide d'acides perfluoroalkyles carboxyliques (PFCA) à longue chaîne de C<sub>11</sub> à C<sub>14</sub> (PFUnA, PFDoA, PFTrDA et PFTeDA), du PFOS, de son précurseur, le FOSA et d'un fluorotélomère, le 6:2 FTSA. L'état stable a été atteint rapidement et les cinétiques suivent un modèle exponentiel. L'accumulation de ces composés a eu principalement lieu pendant le stade 4 de cet organisme qui correspond à une période de croissance rapide et linéaire. La présence de tous les composés accumulés par le chironome dans les sédiments et de trois composés dans l'eau interstitielle a permis de déduire deux voies de transfert possibles pour ces composés : une voie trophique pour tous les composés et une voie tégumentaire pour les trois composés présents dans l'eau interstitielle qui sont le PFUnA, le PFOS et le 6:2 FTSA (Figure 1). Cependant, dans un deuxième temps, des tests d'accumulation avec des sédiments dopés en PFUnA ont mis en évidence une augmentation des concentrations de ce composé uniquement dans l'eau interstitielle mais aucune augmentation de l'accumulation de ce composé par le chironome. Il est alors possible que ce composé ait été éliminé par l'organisme mais nous pouvons également évoquer l'hypothèse que le transfert du PFUnA ait lieu uniquement par la voie trophique et non plus par la voie tégumentaire.

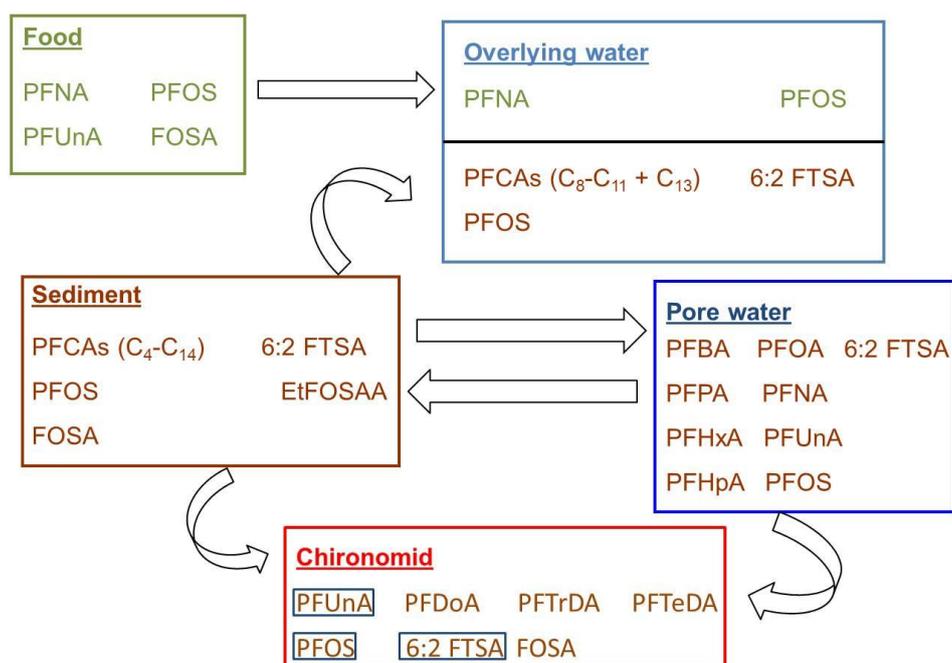


Figure 1: Modèle conceptuel de la contamination en PFASs du chironome

Les résultats décrivant les cinétiques d'élimination des PFASs par les chironomes montrent une élimination rapide ( $T_{1/2}$  compris entre 7.2 et 19.2h) de tous les composés accumulés par ces derniers suivant un modèle exponentiel. Des tests d'accumulation sur sédiment dopé ont permis de mettre en évidence une possible dépendance à la concentration du PFTrDA, le dopage des autres molécules testées, PFUnA, PFOS et FOSA, ne nous ayant pas permis de conclure à une dépendance ou non à la concentration de ces molécules, de part une faible adsorption de ces composés aux particules sédimentaire. Un modèle de bioaccumulation intégrant à la fois la dilution par la croissance de l'accumulation des composés et la dépendance à la concentration du PFTrDA a donc été développé. Cette dépendance à la concentration suggère une bioaccumulation via un système d'adsorption à la surface ou à l'intérieur du chironome pour le PFTrDA. Pour les autres composés, PFUnA, PFOS et FOSA, un modèle de partition a été appliqué en intégrant la croissance des organismes durant les tests. Des constantes d'accumulation ( $k_u$ ) et d'élimination ( $k_e$ ) ont ainsi pu être calculées de manière simultanée. A partir de ces constantes des BSAFs ont pu être déduits. Les valeurs des BSAFs obtenues sont corrélées positivement avec la longueur de chaîne des composés carboxylates, ce qui est en accord avec plusieurs études (Lasier et al., 2011; Martin et al., 2003a, b). Toutefois, ces constantes et ces BSAFs sont faibles en comparaison avec ceux de deux études utilisant l'oligochète, *Lumbriculus variegatus* (Higgins et al., 2007; Lasier et al., 2011). Néanmoins, ces différences peuvent s'expliquer par le mode de nutrition de *L.variegatus* qui diffère de celui du chironome, en effet le chironome se nourrit de la matière organique contenue dans les premiers centimètres et à la surface du sédiment, tandis que les oligochètes se nourrissent plus profondément dans les sédiments (jusqu'à 20 cm) (Nogaro et al., 2009). Le mode de vie des organismes semble donc avoir un rôle dans la bioaccumulation des PFASs.

### **2.3 Influence de la variabilité interspécifique sur la bioaccumulation des PFASs : utilisation du gammare**

Les gammares ont accumulé quatre composés carboxylates à longue chaîne (PFNA, PFUnA, PFDoA et PFTrDA), le PFOS, trois précurseurs (MeFOSAA, EtFOSAA et FOSA) et un fluorotélomère, le 6 :2 FTSA. Les cinétiques d'accumulation ne présentent pas d'état stable après trois semaines d'exposition, ceci peut être dû à une vitesse d'accumulation pas suffisamment rapide et/ou en lien direct avec la physiologie de l'organisme. La présence de tous les composés accumulés par le gammare dans les sédiments, dans les feuilles, dans l'eau

interstitielle et la plupart des composés dans l'eau de surface (absence des précurseurs et du fluorotélomère) indique que les voies d'exposition se font chez le gammare via la nourriture et via la respiration par diffusion passive (Figure 2).

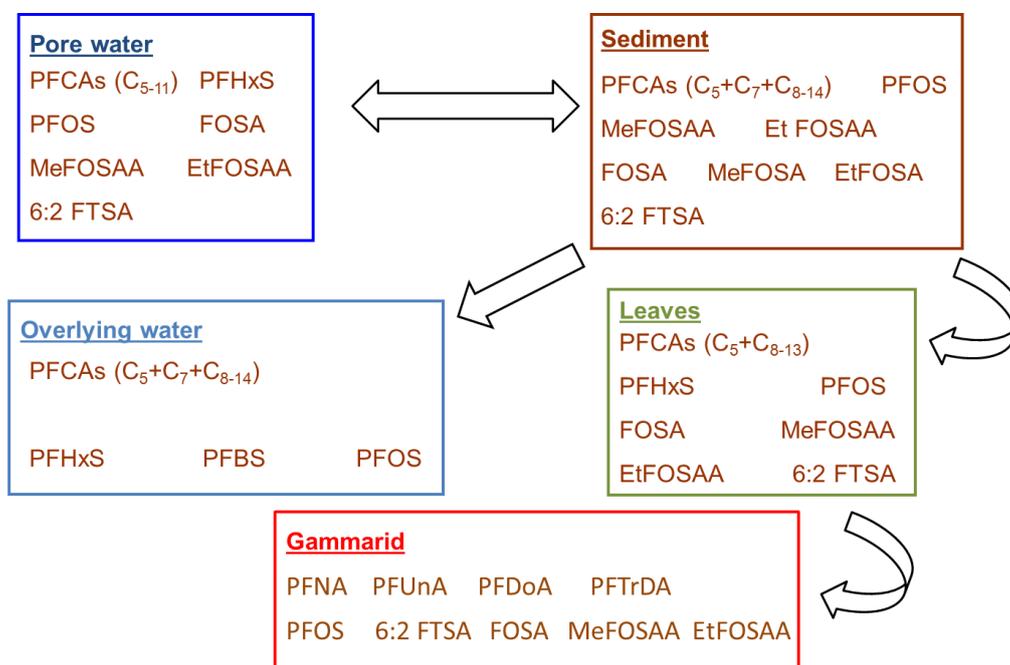


Figure 2: Modèle conceptuel de la contamination en PFASs des gammarses

Les cinétiques d'élimination montrent une élimination lente et presque complète pour le PFOS, les trois précurseurs et le 6:2 FTSA. Néanmoins, l'élimination des composés carboxylates est corrélée avec la longueur de chaîne des composés, avec une élimination de plus en plus lente puis non visible (PFD<sub>o</sub>A et PFTrDA) en 21 jours lorsque la longueur de chaîne des PFCAs augmente. Un modèle de bioaccumulation de partition a été appliqué aux données et a permis de calculer des constantes d'accumulation et d'élimination de manière simultanée. Les valeurs des BSAFs calculés à partir de ces constantes montrent également une corrélation positive avec la longueur de chaîne. De plus, en accord avec la littérature, la valeur de BSAF du PFOS est plus élevée que celle du PFNA qui présente un même nombre de carbone mais un groupement fonctionnel différent (-SO<sub>3</sub>H et -COOH respectivement) (Lasier et al., 2011; Martin et al., 2003a, b).

## 2.4 Comparaison de la bioaccumulation en PFASs entre chironome et gammare

Le comportement de ces deux organismes dans le milieu est bien différent, le chironome est un organisme exclusivement benthique qui se nourrit de la matière organique contenue dans le sédiment, tandis que le gammare est un organisme épi-benthique qui va plutôt vivre dans la colonne d'eau et avoir un contact ponctuel avec le sédiment, avec un mode de nutrition majoritairement détritivore.

Les différences observées dans la bioaccumulation des PFASs chez le chironome et le gammare sont résumées dans le Tableau 1. La principale différence observée est celle de la vitesse d'accumulation et d'élimination des composés et notamment des composés carboxylate. Le chironome accumulant et éliminant rapidement tous les composés sans effet visible de la longueur de chaîne. Tandis que le gammare accumule plus lentement ces composés et surtout plus la longueur de la chaîne des composés carboxylates augmente plus l'élimination est lente voire non visible en 21 jours de dépuración. Nous pouvons alors évoquer deux hypothèses pouvant expliquer ces différences de bioaccumulation des PFASs, la première étant le mode de fonctionnement dans le milieu de ces deux organismes qui diffère et la deuxième pouvant être la physiologie des organismes.

**Tableau 1 : Principales différences dans la bioaccumulation des PFASs chez le chironome et le gammare**

<i>Chironomus riparius</i>	<i>Gammarus sp.</i>
pas d'accumulation du PFNA	accumulation du PFNA
accumulation rapide des PFCAs (PFUnA, PFDoA, PFTTrDA et PFTeDA), du PFOS, du FOSA et du 6:2 FTSA avec atteinte de l'état stable	accumulation sans avoir atteint de l'état stable après 3 semaines d'exposition des PFCAs, du PFOS, de 3 précurseurs et du 6:2 FTSA
élimination rapide de tous les composés et notamment ceux à longue chaîne	élimination plus lente du PFOS, des précurseurs et du 6:2 FTSA; élimination des PFCAs corrélée de manière positive avec la longueur de chaîne
voies d'exposition trophique pour tous les composés et tégumentaire pour le 6:2 FTSA et le PFOS	voies d'exposition trophique et par diffusion passive via la respiration

## **2.5 Réalisme environnemental des données acquises au laboratoire**

Nous avons observé des différences dans l'accumulation des composés perfluorés entre les chironomes autochtones et les chironomes que nous avons exposés au laboratoire. En effet, les organismes autochtones présentent des niveaux de PFASs plus élevés que les organismes exposés au laboratoire. Plusieurs hypothèses explicatives ont été émises et trois d'entre elles ont pu être vérifiées : (i) des espèces différentes échantillonnées sur le terrain de celles utilisées au laboratoire, (ii) la nourriture ajoutée au laboratoire, (iii) la variabilité spatio-temporelle de la contamination, (iv) l'intégrité de la matrice sédimentaire et (v) les sources de contaminations (MES, eau de surface).

Nous avons exploré les trois dernières hypothèses :

→ La contamination en PFASs du site varie effectivement au cours du temps, nous avons observé une différence des niveaux dans les sédiments entre 2012 et 2013 pouvant s'expliquer par la variabilité du rejet industriel et par des évènements d'apports sédimentaires ponctuels (comme la chasse du Rhône par exemple). Cependant lorsque nous comparons des données, provenant de prélèvements ou d'exposition, de la même année, nous observons encore ces différences d'accumulation entre des organismes autochtones et des organismes exposés au laboratoire. La variation temporelle de la contamination n'explique donc pas les différences de niveaux de PFASs entre des chironomes autochtones et des chironomes exposés au laboratoire.

→ Nous avons donc exposé des organismes à des carottes de sédiments afin de se placer dans des conditions d'exposition proches de celles existantes dans le milieu. La comparaison avec des niveaux d'accumulation chez des chironomes exposés à du sédiment homogénéisé et tamisé au préalable ont montré que ces manipulations avaient pour effet d'augmenter les concentrations en PFASs dans les organismes. Le remaniement des sédiments a donc un effet sur l'accumulation des PFASs, cependant les niveaux supérieurs observés dans les organismes autochtones ne peuvent s'expliquer par l'hypothèse de l'intégrité de la structure sédimentaire (sédiment intact).

→ Afin d'estimer l'influence des matières en suspension et de l'eau de surface comme sources de PFASs supplémentaire à celle des sédiments, nous avons exposé des chironomes dans des cages sur le terrain. Ces derniers n'étaient alors exposés qu'aux MES et à l'eau de surface. La comparaison des niveaux de PFASs chez des chironomes encagés et des

chironomes exposés à du sédiment homogénéisé au laboratoire ne montrent pas de différence dans les niveaux de contamination excepté pour le 6 :2 FTSA et le PFOS, ce qui confirme la contamination des chironomes par ces deux contaminants par la voie tégumentaire via l'eau de surface. La comparaison des niveaux de contamination entre des organismes autochtones et des organismes encagés dans le milieu montrent des niveaux plus élevés chez les chironomes autochtones, ce qui signifie que les organismes exposés à toutes les sources de contamination (MES, sédiment, eaux de surface et interstitielle) présentent des niveaux en PFASs plus élevés en comparaison à des organismes exposés d'une manière partielle aux différentes sources (uniquement le sédiment et son eau interstitielle ou bien uniquement les MES et l'eau de surface). Ces résultats nous démontrent alors l'importance combinée de toutes les sources de contamination et de la part des MES et de l'eau de surface dans la contamination en PFASs pour cet organisme benthique.

## **2.6 Limites des techniques et méthodes utilisées**

Au cours de ce travail de thèse nous avons pu rencontrer plusieurs limites liées aux organismes d'étude et aux molécules dosées. Dans un souci de pertinence environnementale, nous avons choisi le chironome et le gammare. Tous deux sont des organismes ayant un grand intérêt écologique de par leur place importante dans la chaîne trophique, leur présence dans nos rivières et leur rapport avec le sédiment. Cependant le choix de ces organismes pour l'étude de la bioaccumulation des PFASs a entraîné certaines difficultés.

En effet, le dosage de ces molécules organiques nécessite l'utilisation d'une grande quantité de matériel biologique par la méthode utilisée: 800 mg de poids frais. Le chironome est un organisme ne pesant en moyenne que 6 mg en fin de stade 4, cela a donc nécessité l'utilisation de 200 organismes par dosage et entraîné un choix dans notre stratégie expérimentale, nous contraignant à 1 échantillon par point de mesure, à l'utilisation d'un grand espace par l'usage d'aquariums comme chambres expérimentales et donc à une limitation des possibilités d'exposition. Nous avons également rencontré une autre difficulté avec cet organisme : l'apport de nourriture nécessaire à leur survie en plus des apports contenus dans les sédiments. Sans cet apport de nourriture, les organismes ne survivaient pas lorsqu'ils étaient exposés aux sédiments. L'ajout de nourriture a donc été un paramètre à prendre en compte dans l'accumulation des PFASs par les organismes car cet ajout peut conduire les organismes à se nourrir préférentiellement avec la nourriture commerciale plutôt qu'avec les particules sédimentaires pouvant ainsi diminuer la contamination. Cela est

d'autant plus important que nous avons mis en évidence la voie trophique comme une des voies de contamination des PFASs pour le chironome. De plus le cycle de vie court de cet organisme a nécessité (stade 4 de 4 jours seulement) une adaptation du design expérimental notamment lors de la mise en place des cinétiques d'élimination des PFASs par un raccourcissement du temps d'exposition aux sédiments à 2 jours afin de pouvoir laisser le temps aux organismes de dépurifier. Cependant, la courte durée du cycle de vie du chironome a tout de même permis de rapidement observer un état stable dans l'accumulation de ces composés.

L'amélioration de la technique analytique permettrait certainement une réduction de la quantité de matériel biologique nécessaire à l'analyse. En fin de thèse nous avons pu réduire de moitié notre quantité de matériel biologique grâce à nos connaissances acquises sur les niveaux de contamination de nos organismes. Cependant l'utilisation d'une nouvelle technique de nano-LC-MS/MS constituerait une méthode de choix et permettrait d'estimer la quantité de PFASs par individus.

L'utilisation des gammarès comme organisme d'étude nous a posé une autre difficulté. En effet, les PFASs étant des composés persistants, bioaccumulables et présents dans tous les milieux, la nécessité de récolter des organismes dans leur milieu nous a donc conduits à une recherche de populations peu impactées par la contamination en PFASs. Une possibilité d'élevage de ces organismes au laboratoire nous permettrait d'éviter et de contourner cette difficulté. Nous avons rencontrée une autre difficulté avec ces organismes, celle de l'absence de plateau lors de l'accumulation des PFASs, ne nous permettant pas de déterminer un BSAF classique ( $BSAF = C_{org}/C_{sed}$  à l'état stable).

### **3 Conclusion générale**

Ce travail de thèse nous éclaire sur le rôle du sédiment dans le transfert des PFASs aux invertébrés benthiques et sur les facteurs pouvant influencer la bioaccumulation de ces composés par les organismes.

En effet la réponse à notre première question, celle du rôle du compartiment sédimentaire dans l'accumulation des PFASs dans le biote peut se résumer ainsi : lorsque les sédiments sont l'unique source de la contamination en PFASs, un transfert est constaté entre ce dernier et les organismes, aussi bien chez le chironome que chez le gammaré. Pour le chironome, la contamination se fait essentiellement par l'ingestion des particules

sédimentaires mais aussi par l'eau interstitielle du sédiment pour deux composés (PFOS et 6 :2 FTSA) ayant une affinité plus grande pour l'eau que les autres composés. L'influence du compartiment sédimentaire dans l'accumulation des PFASs chez le gammare peut se faire par la remise en suspension des particules dans le milieu contaminant l'eau de surface et la nourriture des organismes par diffusion passive des composés.

En deuxième lieu, la réponse à la question traitant de l'influence de la variabilité interspécifique des organismes sur la bioaccumulation des PFASs à partir du sédiment peut également se résumer ainsi : nous avons observé des différences dans l'accumulation et surtout l'élimination des composés entre le chironome et le gammare. Et cela s'explique par leurs modes de fonctionnement, leurs modes de nutrition et leurs physiologies très différentes l'un de l'autre. Dans une démarche de réalisme environnemental, il est donc important de tenir compte de l'organisme test en tant qu'organisme dans son milieu c'est à dire de bien comprendre sa niche écologique et son mode de fonctionnement lorsque nous interprétons des données de bioaccumulation.

Pour finir, nous avons voulu comparer nos données de bioaccumulation obtenues au laboratoire et celle relevées sur le terrain afin de mieux déterminer, les facteurs pouvant influencer la contamination en PFASs dans le milieu. Nous avons mis en évidence des différences de niveaux de PFASs entre les organismes autochtones et les organismes exposés au laboratoire. Ces différences s'expliquent par la combinaison de l'exposition à toutes les sources de contaminations de ces composés qui sont les sédiments, les matières en suspension et l'eau de surface. Nous avons également remarqué que l'apport en PFASs dans les sédiments pouvait varier en fonction du lieu de prélèvement et du temps. De plus en testant l'influence de l'intégrité de la structure sédimentaire sur l'accumulation des PFASs par les chironomes nous avons observé que l'homogénéisation des sédiments avant l'exposition des organismes avait pour effet de maximiser l'exposition des composés.

## 4 Perspectives

### 4.1 Ouverture de la thèse

Au début de ce travail de thèse nous avons voulu, à chaque expérimentation, mesurer les teneurs en protéines totales et en lipides totaux dans les organismes. La littérature nous informait sur l'affinité des PFASs avec les tissus riches en protéines comme le sang, les

muscles et le foie chez les vertébrés (Kelly et al., 2009; Luebker et al., 2002). Nous avons donc dans l'idée d'exploiter ces données et de les comparer avec les niveaux de PFASs mesurés dans nos organismes. Cependant, une étude montre que le PFOS est lié à une protéine spécifique dans le plasma d'un poisson (Honda et al., 2014). Et une autre étude montre par le biais d'un modèle qu'il existe un lien potentiel entre les protéines liées aux acides gras et l'accumulation des PFASs par les vertébrés, mais qu'il est encore nécessaire d'approfondir les connaissances sur le sujet (Ng and Hungerbühler, 2014). Les protéines totales n'apparaissent pas apporter suffisamment d'informations sur la relation PFASs-protéines.

Nous avons également mesuré les isotopes du  $^{13}\text{C}$  et du  $^{15}\text{N}$  dans la plupart de nos échantillons. Les premières données isotopiques chez les chironomes nous ont révélé que la nourriture commerciale avait un impact important sur le niveau trophique des chironomes. En effet cette dernière étant composée de poissons, de mollusques et de crustacés a pour effet d'augmenter le niveau trophique des chironomes, en comparaison avec celui des chironomes autochtones, et donc de fausser son interprétation. Cependant les résultats préliminaires obtenus avec les gammars montrent bien une relation trophique entre les gammars, les sédiments et les feuilles d'aulnes. Ces résultats mériteraient d'être approfondis et complétés par l'obtention de l'analyse isotopique du biofilm microbien présent à la surface des feuilles données aux gammars.

Trois autres points pourraient être approfondis : le premier serait d'approfondir la question de la dépendance à la concentration, en effet, cette dernière a été observé chez un organisme filtreur (moule verte) (Liu et al., 2011) mais ne l'a pas été chez un poisson (Inoue et al., 2012), ce qui ouvre de nombreuses questions, notamment en termes de voies d'exposition, mais aussi de physiologie de l'organisme.

Le deuxième point que nous pourrions approfondir serait celui de la comparaison des données obtenues au laboratoire et de celles obtenues sur le terrain. En effet, nous nous sommes seulement concentrés sur les données concernant les chironomes, il serait alors intéressant de regarder si nous observons des résultats similaires avec les tests réalisés sur les gammars. De plus, afin de confirmer notre hypothèse sur la part importante que représente les MES et l'eau de surface dans l'apport en PFASs aux organismes autochtones (en plus de celui des sédiments), l'encagement de chironomes à l'aide du système SWISS-1 serait une

option à envisager. Car ce système permettrait l'exposition simultanée des organismes au sédiment, à son eau interstitielle et à l'eau de surface (Ferrari et al., 2014).

Pour finir, le dernier point à approfondir pourrait être celui de l'impact de la température sur la bioaccumulation des PFASs chez le chironome et chez le gammare. Nous avons mené un premier test préliminaire, présenté en Annexe 5, de tests d'accumulation des PFASs chez le chironome à 12 et 17°C. Nous avons alors également comparé les niveaux obtenus avec ces deux températures avec les niveaux obtenus à 21°C. Cependant, les sédiments utilisés à 12, 17°C et à 21°C n'avaient pas été prélevés en même temps. Les résultats préliminaires montrent un effet probablement positif de la température sur l'accumulation des PFASs chez le chironome. Il apparaîtrait donc pertinent de poursuivre ces expérimentations en augmentant le nombre de températures testées et en utilisant le même sédiment pour toutes les températures. Nous pourrions également tester l'influence de la température sur l'accumulation des PFASs chez le gammare.

#### **4.2 Rôle du biofilm microbien dans la bioaccumulation des PFASs**

Le biofilm microbien est un système complexe et hétérogène constitué de microorganismes (bactéries, de champignons, d'algues et d'eucaryotes unicellulaires). Ces microorganismes sont encastrés dans une matrice polymérique extracellulaire appelée EPS. La matrice EPS est un système dynamique envahissant les espaces entre les cellules, responsable de l'adhésion et de la cohésion du biofilm. Cette matrice est sécrétée par les microorganismes et est constituée essentiellement d'exo-polysaccharides mais également de protéines, d'acides nucléiques, de lipides et de biopolymères comme des acides humiques (Flemming and Wingender, 2010). Le biofilm, dans son environnement, joue un rôle fondamental dans les cycles biogéochimiques, dans la dynamique des écosystèmes aquatiques et dans la stabilisation de la matrice sédimentaire. Il représente notamment le premier maillon de la chaîne trophique et constitue donc une source de nourriture importante pour les invertébrés benthiques et épi-benthiques (France, 2011; Majdi et al., 2012). Les biofilms sont également connus pour avoir la capacité de d'accumuler les polluants inorganiques et organiques (Kohušová et al., 2011; Schorer and Eisele, 1997; Scott et al., 1995). Ils augmenteraient la disponibilité des polluants pour les organismes prédateurs comme le démontre une étude sur la biodisponibilité du chlorpyrifos chez *Chironomus riparius* en présence de biofilm et de sédiments enrichis en microorganismes (Widenfalk et al., 2008). Compte tenu de l'importance de ce maillon dans le milieu et de son implication dans le

transfert des polluants aux organismes, il serait intéressant de regarder quel pourrait être le rôle du biofilm dans la bioaccumulation des PFASs. De plus il apparaîtrait que les organismes ayant un lien avec le sédiment seraient plus contaminés en PFASs que ceux les organismes pélagiques (Martin et al., 2004b). L'apport en PFASs par les sédiments est une des explications mais leurs compositions en microorganismes sous la forme de biofilm pourraient également contribuer au transfert de ces composés aux organismes benthiques. La présence de biofilm à la surface des feuilles, par exemple, pour les organismes détritivores, pourraient également influencer le transfert de ces composés aux organismes. De plus, il serait également intéressant de tester si la modification de la structuration de ce biofilm, en termes de population microbienne, peut avoir un impact sur le transfert et la disponibilité des PFASs pour les organismes.

#### **4.3 Influence de la bioturbation sur la bioaccumulation des PFASs**

L'homogénéisation des sédiments avant l'exposition (d'organismes) au laboratoire a entraîné une maximisation de l'exposition des PFASs chez les organismes. La bioturbation, qui consiste en une « homogénéisation » naturelle des sédiments par les organismes vivant dans ce compartiment, pourrait donc avoir un impact potentiel sur la bioaccumulation des PFASs. En effet la bioturbation des sédiments modifie la répartition des composés entre les différentes phases constituantes du compartiment sédimentaire (les particules, l'eau interstitielle) et la répartition des particules et des flux d'eau à l'interface eau-sédiment (Mermillod-Blondin et al., 2004). Cela pourrait alors conduire, comme dans le cas de l'homogénéisation artificielle des sédiments, à une maximisation de l'exposition des PFASs. La bioturbation modifie également la teneur en oxygène, les potentiels d'oxydo-réduction et la distribution de la biomasse microbienne.

Il serait donc intéressant d'évaluer l'influence de la bioturbation des sédiments par les invertébrés benthiques sur la biodisponibilité des PFASs pour les organismes. Mais aussi d'évaluer l'effet de la bioturbation sur la modification de la structure des biofilms microbiens et donc de l'impact que cette modification pourrait avoir sur la bioaccumulation des PFASs. L'utilisation de deux organismes bioturbateurs pour caractériser cet effet potentiel sur la bioaccumulation des PFASs pourrait être envisagée. Le chironome et l'oligochète, *Lumbriculus variegatus*, sont deux organismes benthiques accumulant les PFASs (Higgins et al., 2007; Lasier et al., 2011). Le chironome a un effet bioturbateur sur les premiers centimètres du sédiment tandis que *Lumbriculus variegatus* va pouvoir agir plus en

profondeur (jusqu'à 20 cm). L'utilisation combinée de ces deux organismes apparaîtraient être un choix judicieux pour étudier l'impact de la bioturbation sur la bioaccumulation des PFASs. Nous pourrions mettre en place des microcosmes au laboratoire contenant des sédiments et à leur surface y ajouter une couche de billes fluorescentes, avant l'insertion des organismes, permettant d'estimer la bioturbation des organismes (Mahaut and Graf, 1987). L'utilisation de différentes densités d'organismes couplés au dosage des PFASs dans les organismes, les sédiments, l'eau interstitielle et l'eau de surface permettrait d'estimer l'effet de la bioturbation sur la bioaccumulation des PFASs.

#### **4.4 Potentiel de bioamplification des PFASs le long de la chaîne trophique**

Nous avons montré que les sédiments jouaient un rôle dans le transfert des PFASs aux invertébrés benthiques. En effet, les chironomes et les gammares accumulent les PFASs à partir de ce sédiment. Nous avons également montré que la physiologie des organismes faisait partie des facteurs pouvant influencer l'accumulation des PFASs, et cela est bien visible dans le cas des gammares qui n'éliminent que très peu les composés carboxylates à longue chaîne après 3 semaines en milieu non contaminé. Dans un but d'évaluation des risques de ces composés sur l'environnement aquatique d'eau douce, il apparaît nécessaire de s'intéresser à la bioamplification possible de ces contaminants dans la chaîne trophique et notamment dans le cas des composés carboxylate à longue chaîne. Plusieurs études sur la bioamplification des PFASs dans les chaînes trophiques ont utilisé le facteur d'amplification trophique (TMF) comme indicateur (Loi et al., 2011; Martin et al., 2004b; Tomy et al., 2004). Le calcul de ce facteur permettant une évaluation entre plusieurs niveaux trophique, semblerait être une bonne approche pour caractériser la bioamplification de ces composés.





## **Références bibliographique**

- 3M, 2000. Phase-Out Plan for POSF-based products. U.S. EPA Docket OPPT-2002-0043; Specialty Materials Markets Group, 3M, St. Paul, MN.
- 3M, 2014. 3M's Phase Out and New Technologies, [http://solutions.3m.com/wps/portal/3M/en\\_US/PFOS/PFOA/Information/phase-out-technologies/](http://solutions.3m.com/wps/portal/3M/en_US/PFOS/PFOA/Information/phase-out-technologies/).
- Abelho, M., 2001. From Litterfall to Breakdown in Streams: A Review. *TheScientificWorldJOURNAL* 1.
- AFNOR, 1994. Determination of kjekldahl nitrogen - Method after mineralization with selenium Water quality.
- AFNOR, 2000. Determination of dry residue and water content Characterization of sludges.
- AFNOR, 2007. Determination of loss on ignition in waste, sludge and sediments Characterization of waste.
- AFNOR, 2010. Determination of the toxicity of fresh water sediments to Chironomous riparius - Part 1 : natural sediments Water quality
- Ahrens, L., 2011. Polyfluoroalkyl compounds in the aquatic environment: a review of their occurrence and fate. *Journal of Environmental Monitoring* 13, 20-31.
- Ahrens, L., Bundschuh, M., 2014. Fate and effects of poly- and perfluoroalkyl substances in the aquatic environment - A review. *Environmental Toxicology and Chemistry* 33, 1921-1929.
- Ahrens, L., Yamashita, N., Yeung, L.W.Y., Taniyasu, S., Horii, Y., Lam, P.K.S., Ebinghaus, R., 2009. Partitioning Behavior of Per- and Polyfluoroalkyl Compounds between Pore Water and Sediment in Two Sediment Cores from Tokyo Bay, Japan. *Environmental Science & Technology* 43, 6969-6975.
- American Chemical Society, 2006. The long and the short of perfluorinated replacements. *Environmental Science and Technology*, 12-13.
- Amiard, J.C., Amiard-Triquet, C., Berthet, B., Metayer, C., 1987. Comparative study of the patterns of bioaccumulation of essential (Cu, Zn) and non-essential (Cd, Pb) trace metals in various estuarine and coastal organisms. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology* 106, 73-89.
- Anderson, B.S., Hunt, J.W., Phillips, B.M., Fairey, R., Puckett, H.M., Stephenson, M., Taberski, K., Newman, J., Tjeerdema, R.S., 2001. Influence of sample manipulation on contaminant flux and toxicity at the sediment-water interface. *Marine Environmental Research* 51, 191-211.
- Anderson, N.H., Cummins, K.W., 1979. Influences of Diet on the Life Histories of Aquatic Insects. *Journal of the Fisheries Research Board of Canada* 36, 335-342.

- Ankley, G.T., Cook, P.M., Carlson, A.R., Call, D.J., Swenson, J.A., Corcoran, H.F., Hoke, R.A., 1992. Bioaccumulation of PCBs from Sediments by Oligochaetes and Fishes: Comparison of Laboratory and Field Studies. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 49, 2080-2085.
- Armitage, J., Cousins, I.T., Buck, R.C., Prevedouros, K., Russell, M.H., Macleod, M., Korzeniowski, S.H., 2006. Modeling global-scale fate and transport of perfluorooctanoate emitted from direct sources. *Environmental Science and Technology* 40, 6969-6975.
- Armitage, J.M., Arnot, J.A., Wania, F., 2012. Potential Role of Phospholipids in Determining the Internal Tissue Distribution of Perfluoroalkyl Acids in Biota. *Environmental Science & Technology* 46, 12285-12286.
- Armitage, P.D., Cranston, P., Pinder, L., 1995. *The Chironomidae: biology and ecology of non-biting midges*. Springer.
- Arnot, J.A., Gobas, F.A.P.C., 2006. A review of bioconcentration factor (BCF) and bioaccumulation factor (BAF) assessments for organic chemicals in aquatic organisms. *Environ. Rev.* 14, 40.
- Arsenault, G., Chittim, B., McAlees, A., McCrindle, R., Riddell, N., Yeo, B., 2008. Some issues relating to the use of perfluorooctanesulfonate (PFOS) samples as reference standards. *Chemosphere* 70, 616-625.
- Ashauer, R., Boxall, A., Brown, C., 2006. Uptake and elimination of chlorpyrifos and pentachlorophenol into the freshwater amphipod *Gammarus pulex*. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 51, 542-548.
- Ashauer, R., Caravatti, I., Hintermeister, A., Escher, B.I., 2010. Bioaccumulation kinetics of organic xenobiotic pollutants in the freshwater invertebrate *Gammarus pulex* modeled with prediction intervals. *Environmental Toxicology and Chemistry* 29, 1625-1636.
- Aßmann, C., Rinke, K., Nechwatal, J., Elert, E.V., 2011. Consequences of the colonisation of leaves by fungi and oomycetes for leaf consumption by a gammarid shredder. *Freshwater Biology* 56, 839-852.
- ASTM, 2004. *Standard Guide for Collection, Storage, Characterization, and Manipulation of Sediments for Toxicological Testing and for Selection of Samplers Used to Collect Benthic Invertebrates*. American Society for Testing and Materials.
- Banks RE, S.B., Tatlow JC, 1994. *Organofluorine chemistry: Principles and commercial applications*, in: Plenum (Ed.), New York.
- Bao, J., Jin, Y., Liu, W., Ran, X., Zhang, Z., 2009. Perfluorinated compounds in sediments from the Daliao River system of northeast China. *Chemosphere* 77, 652-657.
- Bao, J., Liu, W., Liu, L., Jin, Y., Ran, X., Zhang, Z., 2010. Perfluorinated compounds in urban river sediments from Guangzhou and Shanghai of China. *Chemosphere* 80, 123-130.

- Barnard, J., Barnard, C., 1983. Freshwater Amphipods of the World. I. Evolutionary patterns. II. Handbook and bibliography. Hayfield Associates: Mt. Vernon, Virginia.
- Belden, J.B., Ownby, D.R., Lotufo, G.R., Lydy, M.J., 2005. Accumulation of trinitrotoluene (TNT) in aquatic organisms: Part 2 - Bioconcentration in aquatic invertebrates and potential for trophic transfer to channel catfish (*Ictalurus punctatus*). *Chemosphere* 58, 1161-1168.
- Benskin, J.P., Ikonou, M.G., Gobas, F.A.P.C., Woudneh, M.B., Cosgrove, J.R., 2012. Observation of a Novel PFOS-Precursor, the Perfluorooctane Sulfonamido Ethanol-Based Phosphate (SAMPAP) Diester, in Marine Sediments. *Environmental Science & Technology* 46, 6505-6514.
- Bertin, D., Ferrari, B.J.D., Labadie, P., Sapin, A., Beaudoin, R., Péry, A., Garric, J., Budzinski, H., Babut, M., 2014a. Accumulation and depuration of perfluoroalkyl compounds (PFASs) by midge larvae (*Chironomus riparius*, Diptera, Chironomidae) exposed to contaminated sediments. in prep.
- Bertin, D., Ferrari, B.J.D., Labadie, P., Sapin, A., Garric, J., Budzinski, H., Houde, M., Babut, M., 2014b. Bioaccumulation of perfluoroalkyl compounds in midge (*Chironomus riparius*) larvae exposed to sediment. *Environmental Pollution* 189, 27-34.
- Bervoets, L., Blust, R., Verheyen, R., 1996. Effect of temperature on cadmium and zinc uptake by the midge larvae *Chironomus riparius*. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 31, 502-511.
- Bervoets, L., Int Panis, L., Verheyen, R., 1994. Trace metal levels in water, sediments and *Chironomus* gr. *thummi*, from different water courses in Flanders (Belgium). *Chemosphere* 29, 1591-1601.
- Bervoets, L., Meregalli, G., De Cooman, W., Goddeeris, B., Blust, R., 2004. Caged midge larvae (*Chironomus riparius*) for the assessment of metal bioaccumulation from sediments in situ. *Environmental Toxicology and Chemistry* 23, 443-454.
- Besser, J.M., Ingersoll, C.G., Giesy, J.P., 1996. Effects of spatial and temporal variation of acid-volatile sulfide on the bioavailability of copper and zinc in freshwater sediments. *Environmental Toxicology and Chemistry* 15, 286-293.
- Besser, J.M., Rabeni, C.F., 1987. Bioavailability and toxicity of metals leached from lead-mine tailings to aquatic invertebrates. *Environmental Toxicology and Chemistry* 6, 879-890.
- Betts, K.S., 2007. Perfluoroalkyl acids: What is the evidence telling us? *Environmental Health Perspectives* 115, A250-A256.
- Biegel, L.B., Hurtt, M.E., Frame, S.R., O'Connor, J.C., Cook, J.C., 2001. Mechanisms of extrahepatic tumor induction by peroxisome proliferators in male CD rats. *Toxicological Sciences* 60, 44-55.

- Blockwell, S.J., Taylor, E.J., Jones, I., Pascoe, D., 1998. The Influence of Fresh Water Pollutants and Interaction with *Asellus aquaticus* (L.) on the Feeding Activity of *Gammarus pulex* (L.). *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 34, 41-47.
- Bloor, M.C., Banks, C.J., Krivtsov, V., 2005. Acute and sublethal toxicity tests to monitor the impact of leachate on an aquatic environment. *Environment International* 31, 269-273.
- Bossi, R., Riget, F.F., Dietz, R., Sonne, C., Fauser, P., Dam, M., Vorkamp, K., 2005. Preliminary screening of perfluorooctane sulfonate (PFOS) and other fluorochemicals in fish, birds and marine mammals from Greenland and the Faroe Islands. *Environmental Pollution* 136, 323-329.
- Bousfield, E.L., 1973. Shallow-water gammaridean amphipoda of New England. Comstock Pub. Associates Ithaca, New York.
- Buck, R.C., Franklin, J., Berger, U., Conder, J.M., Cousins, I.T., de Voogt, P., Jensen, A.A., Kannan, K., Mabury, S.A., van Leeuwen, S.P., 2011. Perfluoroalkyl and polyfluoroalkyl substances in the environment: terminology, classification, and origins. *Integr Environ Assess Manag* 7, 513-541.
- Bundschuh, M., Hahn, T., Gessner, M.O., Schulz, R., 2009. Antibiotics as a chemical stressor affecting an aquatic decomposer–detritivore system. *Environmental Toxicology and Chemistry* 28, 197-203.
- Burgess, R.M., McKinney, R.A., 1997. Effects of Sediment Homogenization on Interstitial Water PCB Geochemistry. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 33, 125-129.
- Burkhard, L.P., Arnot, J.A., Embry, M.R., Farley, K.J., Hoke, R.A., Kitano, M., Leslie, H.A., Lotufo, G.R., Parkerton, T.F., Sappington, K.G., Tomy, G.T., Woodburn, K.B., 2012a. Comparing laboratory- and field-measured biota–sediment accumulation factors. *Integrated Environmental Assessment and Management* 8, 32-41.
- Burkhard, L.P., Arnot, J.A., Embry, M.R., Farley, K.J., Hoke, R.A., Kitano, M., Leslie, H.A., Lotufo, G.R., Parkerton, T.F., Sappington, K.G., Tomy, G.T., Woodburn, K.B., 2012b. Comparing laboratory and field measured bioaccumulation endpoints. *Integrated Environmental Assessment and Management* 8, 17-31.
- Burton Jr, G.A., Greenberg, M.S., Rowland, C.D., Irvine, C.A., Lavoie, D.R., Brooker, J.A., Moore, L., Raymer, D.F.N., McWilliam, R.A., 2005. In situ exposures using caged organisms: a multi-compartment approach to detect aquatic toxicity and bioaccumulation. *Environmental Pollution* 134, 133-144.
- Butt, C.M., Berger, U., Bossi, R., Tomy, G.T., 2010. Levels and trends of poly- and perfluorinated compounds in the arctic environment. *Science of The Total Environment* 408, 2936-2965.
- Chapman, P.M., 1981. Measurements of the short-term stability of interstitial salinities in subtidal estuarine sediments. *Estuarine, Coastal and Shelf Science* 12, 67-81.

- Charron, L., Geffard, O., Chaumot, A., Coulaud, R., Jaffal, A., Gaillet, V., Dedourge-Geffard, O., Geffard, A., 2014. Influence of Molting and Starvation on Digestive Enzyme Activities and Energy Storage in *Gammarus fossarum*. PLoS ONE 9, e96393.
- Clara, M., Gans, O., Weiss, S., Sanz-Escribano, D., Scharf, S., Scheffknecht, C., 2009. Perfluorinated alkylated substances in the aquatic environment: An Austrian case study. Water Research 43, 4760-4768.
- Clements, W.H., Oris, J.T., Wissing, T.E., 1994. Accumulation and food chain transfer of fluoranthene and benzo[a]pyrene in *Chironomus riparius* and *Lepomis macrochirus*. Archives of Environmental Contamination and Toxicology 26, 261-266.
- Conder, J.M., Hoke, R.A., De Wolf, W., Russell, M.H., Buck, R.C., 2008. Are PFCAs bioaccumulative? A critical review and comparison with regulatory criteria and persistent lipophilic compounds. Environmental Science and Technology 42, 995-1003.
- Cook, J.C., Murray, S.M., Frame, S.R., Hurtt, M.E., 1992. Induction of leydig cell adenomas by ammonium perfluorooctanoate: A possible endocrine-related mechanism. Toxicology and Applied Pharmacology 113, 209-217.
- Covich, A.P., Palmer, M.A., Crowl, T.A., 1999. The Role of Benthic Invertebrate Species in Freshwater Ecosystems: Zoobenthic species influence energy flows and nutrient cycling. BioScience 49, 119-127.
- Craig, A., Hare, L., Charest, P.-M., Tessier, A., 1998. Effect of exposure regime on the internal distribution of cadmium in *Chironomus staegeri* larvae (Insecta, Diptera). Aquatic Toxicology 41, 265-275.
- Credland, P.F., 1973. The taxonomic status of *Chironomus riparius* MEIGEN and *Chironomus thummi* KIEFFER (Diptera: Chironomidae). Journal of Natural History 7, 209-216.
- Curry, L., 1962. A survey of environmental requirements for the midge (Diptera: Tendipedidae), Third seminar in biological problems in water pollution, CM Tarzwell, ed, pp. 127-141.
- Dabrin, A., Durand, C.L., Garric, J., Geffard, O., Ferrari, B.J.D., Coquery, M., 2012. Coupling geochemical and biological approaches to assess the availability of cadmium in freshwater sediment. Science of The Total Environment 424, 308-315.
- Dangles, O., Guérol, F., 2000. Structural and functional responses of benthic macroinvertebrates to acid precipitation in two forested headwater streams (Vosges Mountains, northeastern France). Hydrobiologia 418, 25-31.
- Dauchy, X., Boiteux, V., Rosin, C., Munoz, J.F., 2012. Relationship between industrial discharges and contamination of raw water resources by perfluorinated compounds. Part I: Case study of a fluoropolymer manufacturing plant. Bull Environ Contam Toxicol 89, 525-530.

- Dauvin, J.-C., 2008. Effects of heavy metal contamination on the macrobenthic fauna in estuaries: The case of the Seine estuary. *Marine Pollution Bulletin* 57, 160-169.
- DCE, 2013. Directive 2013/39/UE du parlement européen et du conseil, in: européenne, J.o.d.l.U. (Ed.).
- De Lange, H.J., Noordoven, W., Murk, A.J., Lürling, M., Peeters, E.T.H.M., 2006. Behavioural responses of *Gammarus pulex* (Crustacea, Amphipoda) to low concentrations of pharmaceuticals. *Aquatic Toxicology* 78, 209-216.
- Dedourge-Geffard, O., Palais, F., Biagiante-Risbourg, S., Geffard, O., Geffard, A., 2009. Effects of metals on feeding rate and digestive enzymes in *Gammarus fossarum*: An in situ experiment. *Chemosphere* 77, 1569-1576.
- Ding, G.-H., Frömel, T., van den Brandhof, E.-J., Baerselman, R., Peijnenburg, W.J.G.M., 2012. Acute toxicity of poly- and perfluorinated compounds to two cladocerans, *Daphnia magna* and *Chydorus sphaericus*. *Environmental Toxicology and Chemistry* 31, 605-610.
- Dinglasan, M.J.A., Ye, Y., Edwards, E.A., Mabury, S.A., 2004. Fluorotelomer Alcohol Biodegradation Yields Poly- and Perfluorinated Acids. *Environmental Science & Technology* 38, 2857-2864.
- Dreyer, A., Weinberg, I., Temme, C., Ebinghaus, R., 2009. Polyfluorinated Compounds in the Atmosphere of the Atlantic and Southern Oceans: Evidence for a Global Distribution. *Environmental Science & Technology* 43, 6507-6514.
- Dupont, 2013. Qu'est-ce que Teflon® ?  
[http://www2.dupont.com/Teflon/fr\\_FR/products/safety/what\\_is\\_it.html](http://www2.dupont.com/Teflon/fr_FR/products/safety/what_is_it.html)
- Durand, C.L., 2012. Développement d'une batterie de mesures biologiques pour l'évaluation du risque associé aux sédiments contaminés. Université de Lorraine.
- EPA, U., 2000a. Chironomus tentans 10-d Survival and Growth Test for Sediments, Methods for Measuring the Toxicity and Bioaccumulation of Sediment-associated Contaminants with Freshwater Invertebrates, pp. 55- 62.
- EPA, U., 2000b. Life-cycle Test for Measuring the Effects of Sediment-associated Contaminants on Chironomus tentans, Methods for Measuring the Toxicity and Bioaccumulation of Sediment-associated Contaminants with Freshwater Invertebrates, pp. 84- 96.
- EPA, U., 2013. 2010/2015 PFOA Stewardship Program,  
<http://www.epa.gov/oppt/pfoa/pubs/stewardship/>.
- Farag, A.M., Woodward, D.F., Goldstein, J.N., Brumbaugh, W., Meyer, J.S., 1998. Concentrations of metals associated with mining waste in sediments, biofilm, benthic macroinvertebrates, and fish from the Coeur d'Alene River Basin, Idaho. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 34, 119-127.

- Felten, V., 2003. Effets de l'acidification des ruisseaux vosgiens sur la biologie, l'écologie et l'écophysiole de *Gammarus fossarum* Koch, 1835 (Crustacea Amphipoda) : Approche intégrée à différents niveaux d'organisation. Université de Metz.
- Felten, V., Guérold, F., 2006. Short-term physiological responses to a severe acid stress in three macroinvertebrate species: A comparative study. *Chemosphere* 63, 1427-1435.
- Fenchel, T.M., Kolding, S., 1979. Habitat Selection and Distribution Patterns of Five Species of the Amphipod Genus *Gammarus*. *Oikos* 33, 316-322.
- Ferrari, B.J.D., Vignati, D.A.L., Dominik, J., 2014. Bioaccumulation kinetics and effects of sediment-bound contaminants on chironomids in deep waters: New insights using a low-disturbance in situ system. *Environmental Technology (United Kingdom)* 35, 456-469.
- Fialkowski, W., Fialkowska, E., Smith, B.D., Rainbow, P.S., 2003. Biomonitoring Survey of Trace Metal Pollution in Streams of a Catchment Draining a Zinc and Lead Mining Area of Upper Silesia, Poland Using the Amphipod *Gammarus fossarum*. *International Review of Hydrobiology* 88, 187-200.
- Fielding, N.J., MacNeil, C., Dick, J.T.A., Elwood, R.W., Riddell, G.E., Dunn, A.M., 2003. Effects of the acanthocephalan parasite *Echinorhynchus truttae* on the feeding ecology of *Gammarus pulex* (Crustacea: Amphipoda). *Journal of Zoology* 261, 321-325.
- Flemming, H.-C., Wingender, J., 2010. The biofilm matrix. *Nat Rev Micro* 8, 623-633.
- Folck J., Lees M., S., S.H., 1957. A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. 497-509.
- Ford, A.T., Fernandes, T.F., Read, P.A., Robinson, C.D., Davies, I.M., 2004. The costs of intersexuality: a crustacean perspective. *Marine Biology* 145, 951-957.
- Forrow, D.M., Maltby, L., 2000. Toward a mechanistic understanding of contaminant-induced changes in detritus processing in streams: Direct and indirect effects on detritivore feeding. *Environmental Toxicology and Chemistry* 19, 2100-2106.
- Förstner, U., 1987. Sediment-associated contaminants — an overview of scientific bases for developing remedial options. *Hydrobiologia* 149, 221-246.
- France, R., 2011. Leaves as “crackers”, biofilm as “peanut butter”: Exploratory use of stable isotopes as evidence for microbial pathways in detrital food webs. *Oceanological and Hydrobiological Studies* 40, 110-115.
- Fu, J., Mai, B., Sheng, G., Zhang, G., Wang, X., Peng, P.a., Xiao, X., Ran, R., Cheng, F., Peng, X., Wang, Z., Wa Tang, U., 2003. Persistent organic pollutants in environment of the Pearl River Delta, China: an overview. *Chemosphere* 52, 1411-1422.
- Gaskell, P.N., Brooks, A.C., Maltby, L., 2007. Variation in the bioaccumulation of a sediment-sorbed hydrophobic compound by benthic macroinvertebrates: Patterns and mechanisms. *Environmental Science and Technology* 41, 1783-1789.

- Geffard, O., Xuereb, B., Chaumot, A., Geffard, A., Biagianti, S., Noël, C., Abbaci, K., Garric, J., Charmantier, G., Charmantier-Daures, M., 2010. Ovarian cycle and embryonic development in *Gammarus fossarum*: Application for reproductive toxicity assessment. *Environmental Toxicology and Chemistry* 29, 2249-2259.
- Gerhardt, A., Carlsson, A., Ressemann, C., Stich, K.P., 1998. New Online Biomonitoring System for *Gammarus pulex* (L.) (Crustacea): In Situ Test Below a Copper Effluent in South Sweden. *Environmental Science & Technology* 32, 150-156.
- Giesy, J.P., Kannan, K., 2001. Global Distribution of Perfluorooctane Sulfonate in Wildlife. *Environmental Science & Technology* 35, 1339-1342.
- Gillis, P.L., Wood, C.M., 2008. Investigating a potential mechanism of Cd resistance in *Chironomus riparius* larvae using kinetic analysis of calcium and cadmium uptake. *Aquatic Toxicology* 89, 180-187.
- Goss, K.-U., 2007. The pKa Values of PFOA and Other Highly Fluorinated Carboxylic Acids. *Environmental Science & Technology* 42, 456-458.
- Gossiaux, D.C., Landrum, P.F., Fisher, S.W., 1996. Effect of temperature on the accumulation kinetics of PAHs and PCBs in the zebra mussel, *Dreissena polymorpha*. *Journal of Great Lakes Research* 22, 379-388.
- Gower, A.M., Buckland, P.J., 1978. Water quality and the occurrence of *Chironomus riparius* Meigen (Diptera: Chironomidae) in a stream receiving sewage effluent. *Freshwater Biology* 8, 153-164.
- Grassé, P., Poisson, R., Tuzet, O., 1961. Précis de Zoologie-Tome 1 Invertébrés. Précis de Sciences Biologiques Masson et Cie Editeurs, Paris.
- Gross, M.Y., Maycock, D.S., Thorndyke, M.C., Morritt, D., Crane, M., 2001. Abnormalities in sexual development of the amphipod *Gammarus pulex* (L.) found below sewage treatment works. *Environmental Toxicology and Chemistry* 20, 1792-1797.
- Harkey, G.A., Landrum, P.F., Klaine, S.J., 1994. Comparison of whole-sediment, elutriate and pore-water exposures for use in assessing sediment-associated organic contaminants in bioassays. *Environmental Toxicology and Chemistry* 13, 1315-1329.
- Harrahy, E.A., Clements, W.H., 1997. Toxicity and bioaccumulation of a mixture of heavy metals in *Chironomus tentans* (Diptera: Chironomidae) in synthetic sediment. *Environmental Toxicology and Chemistry* 16, 317-327.
- Haukås, M., Berger, U., Hop, H., Gulliksen, B., Gabrielsen, G.W., 2007. Bioaccumulation of per- and polyfluorinated alkyl substances (PFAS) in selected species from the Barents Sea food web. *Environmental Pollution* 148, 360-371.
- Heinonen, J., Honkanen, J., Kukkonen, J.V.K., Holopainen, I.J., 2002. Bisphenol A accumulation in the freshwater clam *Pisidium amnicum* at low temperatures. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 43, 50-55.

- Heiri, O., Lotter, A., Lemcke, G., 2001. Loss on ignition as a method for estimating organic and carbonate content in sediments: reproducibility and comparability of results. *Journal of Paleolimnology* 25, 101-110.
- Hervant, F., 1996. Réponses comportementales, respiratoires et métaboliques à l'hypoxie de crustacés souterrains. Comparaison avec des crustacés superficiels. Université de Lyon 1.
- Heugens, E.H.W., Jager, T., Creyghton, R., Kraak, M.H.S., Hendriks, A.J., Van Straalen, N.M., Admiraal, W., 2003. Temperature-dependent effects of cadmium on daphnia magna: Accumulation versus sensitivity. *Environmental Science and Technology* 37, 2145-2151.
- Higgins, C.P., Field, J.A., Criddle, C.S., Luthy, R.G., 2005. Quantitative determination of perfluorochemicals in sediments and domestic sludge. *Environmental Science and Technology* 39, 3946-3956.
- Higgins, C.P., Luthy, R.G., 2006. Sorption of perfluorinated surfactants on sediments. *Environmental Science and Technology* 40, 7251-7256.
- Higgins, C.P., McLeod, P.B., Macmanus-Spencer, L.A., Luthy, R.G., 2007. Bioaccumulation of perfluorochemicals in sediments by the aquatic oligochaete *Lumbriculus variegatus*. *Environmental Science and Technology* 41, 4600-4606.
- Higgins, C.P., Paesani, Z.J., Chalew, T.E.A., Halden, R.U., 2009. Bioaccumulation of triclocarban in *Lumbriculus variegatus*. *Environmental Toxicology and Chemistry* 28, 2580-2586.
- Hoke, R.A., Bouchelle, L.D., Ferrell, B.D., Buck, R.C., 2012. Comparative acute freshwater hazard assessment and preliminary PNEC development for eight fluorinated acids. *Chemosphere* 87, 725-733.
- Honda, M., Muta, A., Akasaka, T., Inoue, Y., Shimasaki, Y., Kannan, K., Okino, N., Oshima, Y., 2014. Identification of perfluorooctane sulfonate binding protein in the plasma of tiger pufferfish *Takifugu rubripes*. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 104, 409-413.
- Houde, M., Bujas, T.A.D., Small, J., Wells, R.S., Fair, P.A., Bossart, G.D., Solomon, K.R., Muir, D.C.G., 2006a. Biomagnification of perfluoroalkyl compounds in the bottlenose dolphin (*Tursiops truncatus*) food web. *Environmental Science and Technology* 40, 4138-4144.
- Houde, M., De Silva, A.O., Muir, D.C.G., Letcher, R.J., 2011. Monitoring of Perfluorinated Compounds in Aquatic Biota: An Updated Review. *Environmental Science & Technology* 45, 7962-7973.
- Houde, M., Martin, J.W., Letcher, R.J., Solomon, K.R., Muir, D.C.G., 2006b. Biological monitoring of polyfluoroalkyl substances: A review. *Environmental Science and Technology* 40, 3463-3473.

- Howard, P.H., Muir, D.C.G., 2010. Identifying New Persistent and Bioaccumulative Organics Among Chemicals in Commerce. *Environmental Science & Technology* 44, 2277-2285.
- Howard, P.H., Muir, D.C.G., 2011. Identifying New Persistent and Bioaccumulative Organics Among Chemicals in Commerce II: Pharmaceuticals. *Environmental Science & Technology* 45, 6938-6946.
- Howe, G.E., Marking, L.L., Bills, T.D., Rach, J.J., Mayer, F.L., 1994. Effects of water temperature and pH on toxicity of terbufos, trichlorfon, 4-nitrophenol and 2,4-dinitrophenol to the amphipod *Gammarus pseudolimnaeus* and rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Environmental Toxicology and Chemistry* 13, 51-66.
- Hwang, H., Fisher, S.W., Kim, K., Landrum, P.F., 2004. Comparison of the Toxicity Using Body Residues of DDE and Select PCB Congeners to the Midge, *Chironomus riparius*, in Partial-Life Cycle Tests. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 46, 32-42.
- Hynes, H., 1956. British freshwater shrimps. *New Biology* 21, 25-42.
- Illies, J., 1978. *Limnofauna europaea*. Fischer Stuttgart, Germany.
- Ineichen, H., Riesen-Willi, U., Fischer, J., 1979. Experimental contributions to the ecology of *Chironomus* (Diptera). *Oecologia* 39, 161-183.
- Ingersoll, C., Nelson, M., 1990. Testing sediment toxicity with *Hyaella azteca*(amphipoda) and *Chironomus riparius*(diptera). ASTM Special Technical Publication, 93-109.
- Inoue, Y., Hashizume, N., Yakata, N., Murakami, H., Suzuki, Y., Kikushima, E., Otsuka, M., 2012. Unique Physicochemical Properties of Perfluorinated Compounds and Their Bioconcentration in Common Carp *Cyprinus carpio* L. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 62, 672-680.
- J. Lawrence, A., Poulter, C., 1998. Development of a sub-lethal pollution bioassay using the estuarine amphipod *Gammarus duebeni*. *Water Research* 32, 569-578.
- J.R. Parsons, M. Sáez, J. Dolfing, Voogt., P.d., 2008. Biodegradation of Perfluorinated Compounds. *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology* 196, 53-71.
- Jeffries, M., Mills, D., 1990. *Freshwater ecology: principles and applications*. Belhaven Press.
- Jeon, J., Kannan, K., Lim, H.K., Moon, H.B., Kim, S.D., 2010a. Bioconcentration of perfluorinated compounds in blackrock fish, *Sebastes schlegeli*, at different salinity levels. *Environmental Toxicology and Chemistry* 29, 2529-2535.
- Jeon, J., Kannan, K., Lim, H.K., Moon, H.B., Ra, J.S., Kim, S.D., 2010b. Bioaccumulation of perfluorochemicals in pacific oyster under different salinity gradients. *Environmental Science and Technology* 44, 2695-2701.

- Jeyasingham, K., Ling, N., 2000. Acute Toxicity of Arsenic to Three Species of New Zealand Chironomids: *Chironomus zealandicus*, *Chironomus* sp. a and *Polypedilum pavidus* (Diptera, Chironomidae). *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 64, 708-715.
- Ji, K., Kim, Y., Oh, S., Ahn, B., Jo, H., Choi, K., 2008. Toxicity of perfluorooctane sulfonic acid and perfluorooctanoic acid on freshwater macroinvertebrates (*Daphnia magna* and *Moina macrocopa*) and fish (*Oryzias latipes*). *Environmental Toxicology and Chemistry* 27, 2159-2168.
- Jones, K.C., de Voogt, P., 1999. Persistent organic pollutants (POPs): state of the science. *Environmental Pollution* 100, 209-221.
- Kannan, K., Corsolini, S., Falandysz, J., Fillmann, G., Kumar, K.S., Loganathan, B.G., Mohd, M.A., Olivero, J., Wouwe, N.V., Yang, J.H., Aldous, K.M., 2004. Perfluorooctanesulfonate and Related Fluorochemicals in Human Blood from Several Countries. *Environmental Science & Technology* 38, 4489-4495.
- Kannan, K., Tao, L., Sinclair, E., Pastva, S.D., Jude, D.J., Giesy, J.P., 2005. Perfluorinated compounds in aquatic organisms at various trophic levels in a Great Lakes food chain. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 48, 559-566.
- Karaman, G.S., Pinkster, S., 1977a. Freshwater Gammarus species from Europe, North Africa and adjacent regions of Asia (Crustacea-Amphipoda) Part. I: *Gammarus pulex*-group and related species. *Bijdragen tot de Dierkunde*.
- Karaman, G.S., Pinkster, S., 1977b. Freshwater Gammarus species from Europe, North Africa and adjacent regions of Asia (Crustacea-Amphipoda). Part. II: *Gammarus roeselii*-group and related species. *Bijdragen tot de Dierkunde*.
- Kedwards, T.J., Blockwell, S.J., Taylor, E.J., Pascoe, D., 1996. Design of an Electronically Operated Flow-Through Respirometer and Its Use to Investigate the Effects of Copper on the Respiration Rate of the Amphipod *Gammarus pulex* (L.). *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 57, 610-616.
- Kelly, B.C., Ikonomou, M.G., Blair, J.D., SurrIDGE, B., Hoover, D., Grace, R., Gobas, F.A.P.C., 2009. Perfluoroalkyl contaminants in an arctic marine food web: Trophic magnification and wildlife exposure. *Environmental Science and Technology* 43, 4037-4043.
- Kissa, E., 1994. Fluorinated surfactants: Synthesis-Properties-Applications, Surfactant science series, Marcel Dekker ed, New York.
- Kissa, E., 2001. Fluorinated surfactants and repellents (2nd edition revised and expanded), Surfactant science series, Marcel Dekker ed, New York, p. 640.
- Kohušová, K., Havel, L., Vlasák, P., Tonika, J., 2011. A long-term survey of heavy metals and specific organic compounds in biofilms, sediments, and surface water in a heavily affected river in the Czech Republic. *Environmental Monitoring and Assessment* 174, 555-572.

- Kunz, P.Y., Kienle, C., Gerhardt, A., 2010. Gammarus spp. in Aquatic Ecotoxicology and Water Quality Assessment: Toward Integrated Multilevel Tests, in: Whitacre, D.M. (Ed.), Reviews of Environmental Contamination and Toxicology Volume 205. Springer New York, pp. 1-76.
- Kwadijk, C.J.A.F., Korytár, P., Koelmans, A.A., 2010. Distribution of perfluorinated compounds in aquatic systems in the netherlands. Environmental Science and Technology 44, 3746-3751.
- Labadie, P., Chevreuil, M., 2011. Partitioning behaviour of perfluorinated alkyl contaminants between water, sediment and fish in the Orge River (nearby Paris, France). Environmental Pollution 159, 391-397.
- Lacaze, E., Geffard, O., Bony, S., Devaux, A., 2010. Genotoxicity assessment in the amphipod Gammarus fossarum by use of the alkaline Comet assay. Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis 700, 32-38.
- Landrum, P.F., 1989. Bioavailability and toxicokinetics of polycyclic aromatic hydrocarbons sorbed to sediments for the amphipod Pontoporeia hoyi. Environmental Science & Technology 23, 588-595.
- Lasier, P.J., Washington, J.W., Hassan, S.M., Jenkins, T.M., 2011. Perfluorinated chemicals in surface waters and sediments from northwest Georgia, USA, and their bioaccumulation in Lumbriculus variegatus. Environmental Toxicology and Chemistry 30, 2194-2201.
- Lau, C., Anitole, K., Hodes, C., Lai, D., Pfahles-Hutchens, A., Seed, J., 2007. Perfluoroalkyl acids: A review of monitoring and toxicological findings. Toxicological Sciences 99, 366-394.
- Lauridsen, R.B., Friberg, N., 2005. Stream macroinvertebrate drift response to pulsed exposure of the synthetic pyrethroid lambda-cyhalothrin. Environmental Toxicology 20, 513-521.
- Lebrun, J.D., Perret, M., Uher, E., Tusseau-Vuillemin, M.H., Gourlay-Francé, C., 2011. Waterborne nickel bioaccumulation in Gammarus pulex: Comparison of mechanistic models and influence of water cationic composition. Aquatic Toxicology 104, 161-167.
- Lehmler, H.-J., 2005. Synthesis of environmentally relevant fluorinated surfactants—a review. Chemosphere 58, 1471-1496.
- Leppänen, M.T., Landrum, P.F., Kukkonen, J.V.K., Greenberg, M.S., Burton Jr, G.A., Robinson, S.D., Gossiaux, D.C., 2003. Investigating the role of desorption on the bioavailability of sediment-associated 3,4,3',4'-tetrachlorobiphenyl in benthic invertebrates. Environmental Toxicology and Chemistry 22, 2861-2871.

- Leslie, H.A., Ter Laak, T.L., Busser, F.J.M., Kraak, M.H.S., Hermens, J.L.M., 2002. Bioconcentration of organic chemicals: Is a solid-phase microextraction fiber a good surrogate for biota? *Environmental Science and Technology* 36, 5399-5404.
- Lincoln, R.J., 1979. *British marine amphipoda: Gammaridea*. British Museum (Natural History).
- Lincoln, R.J., Boxshall, G.A., 1987. *The Cambridge illustrated dictionary of natural history*. Cambridge University Press.
- Lindstrom, A.B., Strynar, M.J., Libelo, E.L., 2011. Polyfluorinated Compounds: Past, Present, and Future. *Environmental Science & Technology* 45, 7954-7961.
- Liu, C., Gin, K.Y.H., Chang, V.W.C., Goh, B.P.L., Reinhard, M., 2011. Novel Perspectives on the Bioaccumulation of PFCs – the Concentration Dependency. *Environmental Science & Technology* 45, 9758-9764.
- Loi, E.I.H., Yeung, L.W.Y., Taniyasu, S., Lam, P.K.S., Kannan, K., Yamashita, N., 2011. Trophic Magnification of Poly- and Perfluorinated Compounds in a Subtropical Food Web. *Environmental Science & Technology* 45, 5506-5513.
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J., 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *Journal of Biological Chemistry* 193 265-275.
- Luebker, D.J., Hansen, K.J., Bass, N.M., Butenhoff, J.L., Seacat, A.M., 2002. Interactions of fluorochemicals with rat liver fatty acid-binding protein. *Toxicology* 176, 175-185.
- Luoma, S.N., Rainbow, P.S., 2005. Why Is Metal Bioaccumulation So Variable? Biodynamics as a Unifying Concept. *Environmental Science & Technology* 39, 1921-1931.
- Lydy, M.J., Belden, J.B., Ternes, M.A., 1999. Effects of Temperature on the Toxicity of M-Parathion, Chlorpyrifos, and Pentachlorobenzene to *Chironomus tentans*. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 37, 542-547.
- Lydy, M.J., Lohner, T.W., Fisher, S.W., 1990. Influence of pH, temperature and sediment type on the toxicity, accumulation and degradation of parathion in aquatic systems. *Aquatic Toxicology* 17, 27-44.
- Mac, M.J., Schmitt, C.J., 1992. Sediment bioaccumulation testing with fish, in: G. Allen Burton, J. (Ed.), *Sediment toxicity assessment*. Lewis, Chelsea, MI, USA, pp. 295-311.
- MacNeil, Calum, MONTGOMERY, I., W., DICK, A., J.T., ELWOOD, W., R., 2001. Factors influencing the distribution of native and introduced *Gammarus* spp. in Irish river systems. *Schweizerbart, Stuttgart, ALLEMAGNE*.

- MacNeil, C., Dick, J.T., Elwood, R.W., 1997. The trophic ecology of freshwater *Gammarus* spp.(Crustacea: Amphipoda): problems and perspectives concerning the functional feeding group concept. *Biological Reviews of the Cambridge Philosophical Society* 72, 349-364.
- MacNeil, C., Dick, J.T., Elwood, R.W., 1999. The dynamics of predation on *Gammarus* spp.(Crustacea: Amphipoda). *Biological Reviews* 74, 375-395.
- Mahaut, M., Graf, G., 1987. A luminophore tracer technique for bioturbation studies. *Oceanologica acta* 10, 323-328.
- Majdi, N., Tackx, M., Buffan–Dubau, E., 2012. Trophic positioning and microphytobenthic carbon uptake of biofilm-dwelling meiofauna in a temperate river. *Freshwater Biology* 57, 1180-1190.
- Maltby, L., Crane, M., 1994. Responses of *Gammarus pulex* (amphipoda, crustacea) to metalliferous effluents: Identification of toxic components and the importance of interpopulation variation. *Environmental Pollution* 84, 45-52.
- Maltby, L., Naylor, C., 1990. Preliminary Observations on the Ecological Relevance of the *Gammarus* 'Scope for Growth' Assay: Effect of Zinc on Reproduction. *Functional Ecology* 4, 393-397.
- Martin, J.W., Mabury, S.A., Solomon, K.R., Muir, D.C.G., 2003a. Bioconcentration and tissue distribution of perfluorinated acids in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Environmental Toxicology and Chemistry* 22, 196-204.
- Martin, J.W., Mabury, S.A., Solomon, K.R., Muir, D.C.G., 2003b. Dietary accumulation of perfluorinated acids in juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Environmental Toxicology and Chemistry* 22, 189-195.
- Martin, J.W., Smithwick, M.M., Braune, B.M., Hoekstra, P.F., Muir, D.C.G., Mabury, S.A., 2004a. Identification of Long-Chain Perfluorinated Acids in Biota from the Canadian Arctic. *Environmental Science and Technology* 38, 373-380.
- Martin, J.W., Whittle, D.M., Muir, D.C.G., Mabury, S.A., 2004b. Perfluoroalkyl contaminants in a food web from lake Ontario. *Environmental Science & Technology* 38, 5379-5385.
- Martin, S., Proulx, I., Hare, L., 2008. Explaining metal concentrations in sympatric *Chironomus* species. *Limnology and Oceanography* 53, 411.
- McLachlan, M.S., Holmström, K.E., Reth, M., Berger, U., 2007. Riverine Discharge of Perfluorinated Carboxylates from the European Continent. *Environmental Science & Technology* 41, 7260-7265.
- Meredith-Williams, M., Carter, L.J., Fussell, R., Raffaelli, D., Ashauer, R., Boxall, A.B.A., 2012. Uptake and depuration of pharmaceuticals in aquatic invertebrates. *Environmental Pollution* 165, 250-258.

- Mermillod-Blondin, F., Foulquier, A., Gilbert, F., Navel, S., Montuelle, B., Bellvert, F., Comte, G., Grossi, V., Fourel, F., Lecuyer, C., Simon, L., 2013. Benzo(a)pyrene inhibits the role of the bioturbator *Tubifex tubifex* in river sediment biogeochemistry. *Science of The Total Environment* 450–451, 230-241.
- Mermillod-Blondin, F., Gaudet, J.-P., Gerino, M., Desrosiers, G., Jose, J., Châtelliers, M.C.d., 2004. Relative influence of bioturbation and predation on organic matter processing in river sediments: a microcosm experiment. *Freshwater Biology* 49, 895-912.
- Montuelle, B., 2003. *Qualité et gestion des sédiments d'eau douce: Eléments physico-chimiques et biologiques.*
- Muir, D.C.G., Howard, P.H., 2006. Are There Other Persistent Organic Pollutants? A Challenge for Environmental Chemists†. *Environmental Science & Technology* 40, 7157-7166.
- Müller, C.E., De Silva, A.O., Small, J., Williamson, M., Wang, X., Morris, A., Katz, S., Gamberg, M., Muir, D.C.G., 2011. Biomagnification of perfluorinated compounds in a remote terrestrial food chain: Lichen-Caribou-Wolf. *Environmental Science and Technology* 45, 8665-8673.
- Myers, A.L., Crozier, P.W., Helm, P.A., Brimacombe, C., Furdui, V.I., Reiner, E.J., Burniston, D., Marvin, C.H., 2012. Fate, distribution, and contrasting temporal trends of perfluoroalkyl substances (PFASs) in Lake Ontario, Canada. *Environment International* 44, 92-99.
- Nakata, H., Kannan, K., Nasu, T., Cho, H.S., Sinclair, E., Takemura, A., 2006. Perfluorinated contaminants in sediments and aquatic organisms collected from shallow water and tidal flat areas of the Ariake Sea, Japan: Environmental fate of perfluorooctane sulfonate in aquatic ecosystems. *Environmental Science and Technology* 40, 4916-4921.
- Ng, C.A., Hungerbühler, K., 2014. Bioaccumulation of perfluorinated alkyl acids: Observations and models. *Environmental Science and Technology* 48, 4637-4648.
- Nogaro, G., Mermillod-Blondin, F., Valett, M.H., François-Carcaillet, F., Gaudet, J.P., Lafont, M., Gibert, J., 2009. Ecosystem engineering at the sediment-water interface: Bioturbation and consumer-substrate interaction. *Oecologia* 161, 125-138.
- OCDE, 2004a. Sediment- Water Chironomid Toxicity Test Using Spiked Water, OECD Guidelines for the testing of chemicals, pp. 1- 21.
- OCDE, 2004b. Sediment - Water Chironomid Toxicity Test Using Spiked Sediment, OECD Guidelines for the testing of chemicals, pp. 1-21.
- OCDE, 2008. Bioaccumulation in Sediment-dwelling Benthic Oligochaetes, OECD Guidelines for the testing of chemicals, pp. 1-33.

- OCDE, 2010. Sediment-Water Chironomid Life-Cycle Toxicity Test Using Spiked Water or Spiked Sediment, OECD GUIDELINES FOR THE TESTING OF CHEMICALS, pp. 1- 29.
- Olsen, G.W., Chang, S.-C., Noker, P.E., Gorman, G.S., Ehresman, D.J., Lieder, P.H., Butenhoff, J.L., 2009. A comparison of the pharmacokinetics of perfluorobutanesulfonate (PFBS) in rats, monkeys, and humans. *Toxicology* 256, 65-74.
- Palmer, M.A., 1997. Biodiversity and Ecosystem Processes in Freshwater Sediments. *Ambio* 26, 571-577.
- Palmer, M.A., Covich, A.P., Lake, S.A.M., Biro, P., Brooks, J.J., Cole, J., Dahm, C., Gibert, J., Goedkoop, W., Martens, K., Verhoeven, J.O.S., Bund, W.J.V.D., 2000. Linkages between Aquatic Sediment Biota and Life Above Sediments as Potential Drivers of Biodiversity and Ecological Processes. *BioScience* 50, 1062-1075.
- Paul, A.G., Jones, K.C., Sweetman, A.J., 2009. A First Global Production, Emission, And Environmental Inventory For Perfluorooctane Sulfonate. *Environmental Science & Technology* 43, 386-392.
- Péry, A., 2003. Modélisation des effets des toxiques sur le chironome *Chironomus riparius* de l'individu à la population, GMA. Université Claude Bernard, Lyon I, Lyon, p. 119.
- Péry, A.R.R., Garric, J., 2006. Modelling effects of temperature and feeding level on the life cycle of the midge *Chironomus riparius*: An energy-based modelling approach. *Hydrobiologia* 553, 59-66.
- Péry, A.R.R., Mons, R., Flammarion, P., Lagadic, L., Garric, J., 2002. A modeling approach to link food availability, growth, emergence, and reproduction for the midge *Chironomus riparius*. *Environmental Toxicology and Chemistry* 21, 2507-2513.
- Phillips, M.M., Dinglasan-Panlilio, M.J.A., Mabury, S.A., Solomon, K.R., Sibley, P.K., 2007. Fluorotelomer acids are more toxic than perfluorinated acids. *Environmental Science and Technology* 41, 7159-7163.
- Phillips, M.M., Dinglasan-Panlilio, M.J.A., Mabury, S.A., Solomon, K.R., Sibley, P.K., 2010. Chronic toxicity of fluorotelomer acids to *Daphnia magna* and *Chironomus dilutus*. *Environmental Toxicology and Chemistry* 29, 1123-1131.
- Pico, Y., Blasco, C., Farré, M., Barceló, D., 2012. Occurrence of perfluorinated compounds in water and sediment of L'Albufera Natural Park (València, Spain). *Environmental Science and Pollution Research*, 1-12.
- Plenet, S., 1995. Freshwater amphipods as biomonitors of metal pollution in surface and interstitial aquatic systems. *Freshwater Biology* 33, 127-137.
- Power, E.A., Chapman, P.M., 1992. Assessing sediment quality, in: G. Allen Burton, J. (Ed.), *Sediment toxicity assessment*. Lewis, Chelsea, MI, USA, pp. 1-18.

- Prevedouros, K., Cousins, I.T., Buck, R.C., Korzeniowski, S.H., 2006. Sources, fate and transport of perfluorocarboxylates. *Environmental Science and Technology* 40, 32.
- Qi, P., Wang, Y., Mu, J., Wang, J., 2011. Aquatic predicted no-effect-concentration derivation for perfluorooctane sulfonic acid. *Environmental Toxicology and Chemistry* 30, 836-842.
- R Core Team, 2014. *R: A Language and Environment for Statistical Computing*. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria.
- R Development Core Team, 2013. *R: A language and environment for Statistical computing*, in: *R Foundation for Statistical Computing (Ed.)*, Vienna.
- Ramade, F., 1998. *Dictionnaire encyclopédique des sciences de l'eau*. Ediscience International, Paris, 785.
- Rasmussen, J.B., 1984. The life-history, distribution, and production of *Chironomus riparius* and *Glyptotendipes paripes* in a prairie pond. *Hydrobiologia* 119, 65-72.
- Raux J., Desmet M., Labadie P., Debret M., Füller C., Grosbois C., Copard Y., Van Metre P.C., Pardon P., Budzinski H., M., B., in prep. A unique record of perfluoroalkyl substances (PFASs) in a heavily anthropized riverine ecosystem: Case study on the Rhône river, France.
- Recyconsult, 2010. *Dictionnaire de l'environnement*. <http://www.dictionnaire-environnement.com/>.
- Reiner, J., O'Connell, S., Butt, C., Mabury, S., Small, J., Silva, A., Muir, D.G., Delinsky, A., Strynar, M., Lindstrom, A., Reagen, W., Malinsky, M., Schäfer, S., Kwadijk, C.A.F., Schantz, M., Keller, J., 2012. Determination of perfluorinated alkyl acid concentrations in biological standard reference materials. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 404, 2683-2692.
- Renner, R., 2006. The long and the short of perfluorinated replacements. *Environmental Science and Technology*, 12-13.
- Richter, S., Nagel, R., 2007. Bioconcentration, biomagnification and metabolism of <sup>14</sup>C-terbutryn and <sup>14</sup>C-benzo[a]pyrene in *Gammarus fossarum* and *Asellus aquaticus*. *Chemosphere* 66, 603-610.
- Rinderhagen, M., Ritterhoff, J., Zauke, G., Crustaceans as bioindicators, Gerhardt A., *Biomonitoring of Polluted Water—Reviews on Actual Topics* 9, 2000, 161-194, Trans Tech Publications—Scitech Publications, Environmental Research Forum, Uetikon-Zuerich.
- Sáez, M., Voogt, P., Parsons, J., 2008. Persistence of perfluoroalkylated substances in closed bottle tests with municipal sewage sludge. *Environmental Science and Pollution Research* 15, 472-477.

- Santschi, P.H., Guo, L., Means, J.C., Ravichandran, M., 1999. Natural organic matter binding of trace metals and trace organic contaminants in estuaries. *Biogeochemistry of Gulf of Mexico Estuaries*, 347-380.
- Scheringer, M., Trier, X., Cousins, I.T., de Voogt, P., Fletcher, T., Wang, Z., Webster, T.F., 2014. Helsingør Statement on poly- and perfluorinated alkyl substances (PFASs). *Chemosphere* 114, 337-339.
- Schirling, M., Jungmann, D., Ladewig, V., Nagel, R., Triebkorn, R., Köhler, H.R., 2005. Endocrine Effects in *Gammarus fossarum* (Amphipoda): Influence of Wastewater Effluents, Temporal Variability, and Spatial Aspects on Natural Populations. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 49, 53-61.
- Schmitz, E., 1992. Amphipoda. *Microscopic anatomy of invertebrates* 9, 443-528.
- Schorer, M., Eisele, M., 1997. Accumulation of inorganic and organic pollutants by biofilms in the aquatic environment. *Water, Air, and Soil Pollution* 99, 651-659.
- Schröder, H.F., 2003. Determination of fluorinated surfactants and their metabolites in sewage sludge samples by liquid chromatography with mass spectrometry and tandem mass spectrometry after pressurised liquid extraction and separation on fluorine-modified reversed-phase sorbents. *Journal of Chromatography A* 1020, 131-151.
- Scott, J.A., Karanjkar, A.M., Rowe, D.L., 1995. Biofilm covered granular activated carbon for decontamination of streams containing heavy metals and organic chemicals. *Minerals Engineering* 8, 221-230.
- Seacat, A.M., Thomford, P.J., Hansen, K.J., Clemen, L.A., Eldridge, S.R., Elcombe, C.R., Butenhoff, J.L., 2003. Sub-chronic dietary toxicity of potassium perfluorooctanesulfonate in rats. *Toxicology* 183, 117-131.
- Selck, H., Drouillard, K., Eisenreich, K., Koelmans, A.A., Palmqvist, A., Ruus, A., Salvito, D., Schultz, I., Stewart, R., Weisbrod, A., van den Brink, N.W., van den Heuvel-Greve, M., 2012. Explaining differences between bioaccumulation measurements in laboratory and field data through use of a probabilistic modeling approach. *Integrated Environmental Assessment and Management* 8, 42-63.
- Shaw, G., 1979. Prey selection by breeding dippers. *BRITISH TRUST ORNITHOLOGY NUNNERY, NUNNERY PLACE, THETFORD NORFOLK, ENGLAND IP24 2PU*, pp. 66-67.
- Shepard, F.P., 1954. Nomenclature based on sand-silt-clay ratios. *Journal of Sedimentary Research* 24.
- Shoeib, M., Harner, T., Vlahos, P., 2006. Perfluorinated Chemicals in the Arctic Atmosphere. *Environmental Science & Technology* 40, 7577-7583.

- Sibley, P.K., Benoit, D.A., Balcer, M.D., Phipps, G.L., West, C.W., Hoke, R.A., Ankley, G.T., 1999. In situ bioassay chamber for assessment of sediment toxicity and bioaccumulation using benthic invertebrates. *Environmental Toxicology and Chemistry* 18, 2325-2336.
- Spacie, A., Hamelink, J.L., 1985. Bioaccumulation, in: Rand, G.M., Petrocelli, S.R. (Eds.), *Fundamentals of Aquatic Toxicology*, pp. 495-519.
- Sun, H., Gerecke, A.C., Giger, W., Alder, A.C., 2011. Long-chain perfluorinated chemicals in digested sewage sludges in Switzerland. *Environmental Pollution* 159, 654.
- Sutcliffe, D., Hildrew, A., 1989. Invertebrate communities in acid streams. *Acid toxicity and aquatic animals* 34, 13.
- Tachet, H., Richoux, P., Bournaud, M., Usseglio-Polatera, P., 2000. *Invertébrés d'eau douce: systématique, biologie, écologie*. CNRS éditions Paris.
- Tachet, H., Richoux, P., Bournaud, M., Usseglio-Polatera, P., 2010. *Invertébrés d'eau douce, systématique, biologie, écologie*, CNRS Editions ed, Paris.
- Taenzler, V., Bruns, E., Dorgerloh, M., Pfeifle, V., Weltje, L., 2007. Chironomids: Suitable test organisms for risk assessment investigations on the potential endocrine disrupting properties of pesticides. *Ecotoxicology* 16, 221-230.
- Taylor, E.J., Jones, D.P.W., Maund, S.J., Pascoe, D., 1993. A new method for measuring the feeding activity of *Gammarus pulex* (L.). *Chemosphere* 26, 1375-1381.
- Theobald, N., Caliebe, C., Gerwinski, W., Hühnerfuss, H., Lepom, P., 2012. Occurrence of perfluorinated organic acids in the North and Baltic Seas. Part 2: distribution in sediments. *Environmental Science and Pollution Research*, 1-12.
- Thompson, J., Roach, A., Eaglesham, G., Bartkow, M.E., Edge, K., Mueller, J.F., 2011. Perfluorinated alkyl acids in water, sediment and wildlife from Sydney Harbour and surroundings. *Marine Pollution Bulletin*.
- Tomy, G.T., Budakowski, W., Halldorson, T., Helm, P.A., Stern, G.A., Friesen, K., Pepper, K., Tittlemier, S.A., Fisk, A.T., 2004. Fluorinated organic compounds in an Eastern arctic marine food web. *Environmental Science and Technology* 38, 6475-6481.
- Tomy, G.T., Pleskach, K., Ferguson, S.H., Hare, J., Stern, G., MacInnis, G., Marvin, C.H., Loseto, L., 2009. Trophodynamics of Some PFCs and BFRs in a Western Canadian Arctic Marine Food Web. *Environmental Science & Technology* 43, 4076-4081.
- Townes, H.K., Jr., 1945. The Nearctic Species of Tendipedini [Diptera, Tendipedidae (= Chironomidae)]. *American Midland Naturalist* 34, 1-206.
- USEPA, 2000. *Lumbriculus variegatus Bioaccumulation Test for Sediments, Methods for Measuring the Toxicity and Bioaccumulation of Sediment-associated Contaminants with Freshwater Invertebrates*, pp. 63-71.

- Van Geest, J.L., MacKay, D., Poirier, D.G., Sibley, P.K., Solomon, K.R., 2011. Accumulation and depuration of polychlorinated biphenyls from field-collected sediment in three freshwater organisms. *Environmental Science and Technology* 45, 7011-7018.
- Van Handel, E., 1985. Rapid determination of total lipids in mosquitoes. *Journal of the American Mosquito Control Association* 1, 302-304.
- van Hullebusch, E.D., Zandvoort, M.H., Lens, P.N.L., 2003. Metal immobilisation by biofilms: Mechanisms and analytical tools. *Reviews in Environmental Science and Biotechnology* 2, 9-33.
- Vatan, A., 1967. *Manuel de sédimentologie*. Technip, Paris.
- Viganò, L., Farkas, A., Guzzella, L., Roscioli, C., Erratico, C., 2007. The accumulation levels of PAHs, PCBs and DDTs are related in an inverse way to the size of a benthic amphipod (*Echinogammarus stammeri* Karaman) in the River Po. *Science of The Total Environment* 373, 131-145.
- Vignati, D.A.L., Ferrari, B.J.D., Dominik, J., 2007. Laboratory-to-Field Extrapolation in Aquatic Sciences. *Environmental Science & Technology* 41, 1067-1073.
- Vyas, S.M., Kania-Korwel, I., Lehmler, H.-J., 2007. Differences in the isomer composition of perfluorooctanesulfonyl (PFOS) derivatives. *Journal of Environmental Science and Health Part A* 42, 249-255.
- Wang, N., Liu, J., Buck, R.C., Korzeniowski, S.H., Wolstenholme, B.W., Folsom, P.W., Sulecki, L.M., 2011. 6:2 Fluorotelomer sulfonate aerobic biotransformation in activated sludge of waste water treatment plants. *Chemosphere* 82, 853-858.
- Wang, N., Szostek, B., Buck, R.C., Folsom, P.W., Sulecki, L.M., Capka, V., Berti, W.R., Gannon, J.T., 2005a. Fluorotelomer Alcohol Biodegradation Direct Evidence that Perfluorinated Carbon Chains Breakdown. *Environmental Science & Technology* 39, 7516-7528.
- Wang, N., Szostek, B., Folsom, P.W., Sulecki, L.M., Capka, V., Buck, R.C., Berti, W.R., Gannon, J.T., 2005b. Aerobic Biotransformation of <sup>14</sup>C-Labeled 8-2 Telomer B Alcohol by Activated Sludge from a Domestic Sewage Treatment Plant. *Environmental Science & Technology* 39, 531-538.
- Wang, Z., Cousins, I.T., Scheringer, M., Buck, R.C., Hungerbühler, K., 2014. Global emission inventories for C<sub>4</sub>-C<sub>14</sub> perfluoroalkyl carboxylic acid (PFCA) homologues from 1951 to 2030, Part I: Production and emissions from quantifiable sources. *Environment International* 70, 62-75.
- Wania, F., 2007. A Global Mass Balance Analysis of the Source of Perfluorocarboxylic Acids in the Arctic Ocean. *Environmental Science & Technology* 41, 4529-4535.

- Warren, L.A., Tessier, A., Hare, L., 1998. Modelling cadmium accumulation by benthic invertebrates in situ: The relative contributions of sediment and overlying water reservoirs to organism cadmium concentrations. *Limnology and Oceanography* 43, 1442-1454.
- Watts, M.M., Pascoe, D., Carroll, K., 2001. Survival and precopulatory behaviour of *Gammarus pulex* (L.) exposed to two xenoestrogens. *Water Research* 35, 2347-2352.
- Watts, M.M., Pascoe, D., Carroll, K., 2002. Population responses of the freshwater amphipod *Gammarus pulex* (L.) to an environmental estrogen, 17 $\alpha$ -ethinylestradiol. *Environmental Toxicology and Chemistry* 21, 445-450.
- Webster, J.R., Benfield, E.F., 1986. Vascular Plant Breakdown in Freshwater Ecosystems. *Annual Review of Ecology and Systematics* 17, 567-594.
- Weisbrod, A.V., Burkhard, L.P., Jon, A., Mekenyan, O., Howard, P.H., Russom, C., Boethling, R., Sakuratani, Y., Traas, T., Bridges, T., Lutz, C., Bonnell, M., Woodburn, K., Parkerton, T., 2007. Workgroup Report: Review of Fish Bioaccumulation Databases Used to Identify Persistent, Bioaccumulative, Toxic Substances. *Environmental Health Perspectives* 115, 255-261.
- Weisbrod, A.V., Woodburn, K.B., Koelmans, A.A., Parkerton, T.F., McElroy, A.E., Borgå, K., 2009. Evaluation of Bioaccumulation Using In Vivo Laboratory and Field Studies. *Integrated Environmental Assessment and Management* 5, 598-623.
- Welton, J.S., Clarke, R.T., 1980. Laboratory Studies on the Reproduction and Growth of the Amphipod, *Gammarus pulex* (L.). *Journal of Animal Ecology* 49, 581-592.
- West, C.W., Ankley, G.T., Nichols, J.W., Elonen, G.E., Nessa, D.E., 1997. Toxicity and bioaccumulation of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin in long-term tests with the freshwater benthic invertebrates *Chironomus tentans* and *Lumbriculus variegatus*. *Environmental Toxicology and Chemistry* 16, 1287-1294.
- Whitehurst, I.T., Lindsey, B.I., 1990. The impact of organic enrichment on the benthic macroinvertebrate communities of a lowland river. *Water Research* 24, 625-630.
- Widenfalk, A., Lundqvist, A., Goedkoop, W., 2008. Sediment microbes and biofilms increase the bioavailability of chlorpyrifos in *Chironomus riparius* (Chironomidae, Diptera). *Ecotoxicology and Environmental Safety* 71, 490-497.
- Wood, L.W., O'Keefe, P., Bush, B., 1997. Similarity analysis of PAH and PCB bioaccumulation patterns in sediment- exposed *Chironomus tentans* larvae. *Environmental Toxicology and Chemistry* 16, 283-292.
- Writer, J.H., Ryan, J.N., Barber, L.B., 2011. Role of biofilms in sorptive removal of steroidal hormones and 4-nonylphenol compounds from streams. *Environmental Science and Technology* 45, 7275-7283.

- Xu, J., Guo, C.S., Zhang, Y., Meng, W., 2014. Bioaccumulation and trophic transfer of perfluorinated compounds in a eutrophic freshwater food web. *Environmental Pollution* 184, 254-261.
- Xuereb, B., Noury, P., Felten, V., Garric, J., Geffard, O., 2007. Cholinesterase activity in *Gammarus pulex* (Crustacea Amphipoda): Characterization and effects of chlorpyrifos. *Toxicology* 236, 178-189.
- Yamashita, N., Kannan, K., Taniyasu, S., Horii, Y., Petrick, G., Gamo, T., 2005. A global survey of perfluorinated acids in oceans. *Marine Pollution Bulletin* 51, 658-668.
- Yamashita, N., Taniyasu, S., Petrick, G., Wei, S., Gamo, T., Lam, P.K.S., Kannan, K., 2008. Perfluorinated acids as novel chemical tracers of global circulation of ocean waters. *Chemosphere* 70, 1247-1255.
- Yang, G., Kille, P., Ford, A.T., 2008. Infertility in a marine crustacean: Have we been ignoring pollution impacts on male invertebrates? *Aquatic Toxicology* 88, 81-87.
- Yang, R.-q., Lv, A.-h., Shi, J.-b., Jiang, G.-b., 2005. The levels and distribution of organochlorine pesticides (OCPs) in sediments from the Haihe River, China. *Chemosphere* 61, 347-354.
- Yeung, L.W.Y., So, M.K., Jiang, G., Taniyasu, S., Yamashita, N., Song, M., Wu, Y., Li, J., Giesy, J.P., Guruge, K.S., Lam, P.K.S., 2006. Perfluorooctanesulfonate and Related Fluorochemicals in Human Blood Samples from China. *Environmental Science & Technology* 40, 715-720.
- Zhang, L., Liu, J., Hu, J., Liu, C., Guo, W., Wang, Q., Wang, H., 2012. The inventory of sources, environmental releases and risk assessment for perfluorooctane sulfonate in China. *Environmental Pollution* 165, 193.
- Zhao, L., Folsom, P.W., Wolstenholme, B.W., Sun, H., Wang, N., Buck, R.C., 2013. 6:2 Fluorotelomer alcohol biotransformation in an aerobic river sediment system. *Chemosphere* 90, 203-209.
- Zushi, Y., Tamada, M., Kanai, Y., Masunaga, S., 2010. Time trends of perfluorinated compounds from the sediment core of Tokyo Bay, Japan (1950s–2004). *Environment and Pollution* 158, 756.

# ***ANNEXES***

*Annexe 1 : Matériel supplémentaire publiée 1*

**Supporting information**

**Bioaccumulation of perfluoroalkyl compounds in midge (*Chironomus riparius*)  
larvae exposed to sediment**

Delphine Bertin<sup>1\*</sup>, Benoît J.D. Ferrari<sup>1</sup>, Pierre Labadie<sup>2</sup>, Alexandre Sapin<sup>1</sup>, Jeanne Garric<sup>1</sup>, Hélène Budzinski<sup>2</sup>, Magali Houde<sup>3</sup>, Marc Babut<sup>1</sup>.

<sup>1</sup> : IRSTEA, UR MALY, 5 rue de la Doua, CS 70077, F- 69626 Villeurbanne, France.

<sup>2</sup> : Université Bordeaux 1, Environnements et Paléoenvironnements Océaniques et Continentaux (EPOC), UMR 5805 CNRS, Laboratoire de Physico- et Toxicochimie de l'environnement (LPTC), 351 cours de la Libération, 33405 Talence, France.

<sup>3</sup> : Environment Canada, Aquatic Contaminant Research Division, 105 rue McGill, Montreal, QC, H2Y 2E7, Canada.

\*Corresponding author: Delphine BERTIN, IRSTEA, UR MALY, 5 rue de la Doua, CS 70077, F-69626 Villeurbanne, France. [delphine.bertin@irstea.fr](mailto:delphine.bertin@irstea.fr), phone : +33 (0)4 72 20 10 75.

## **Chemicals**

Standard PFAS solutions were obtained from Wellington Laboratories (via BCP Instruments, Irigny, France). PFC-MXA contained perfluoro-n-butanoic acid (PFBA), perfluoro-n-pentanoic acid (PFPA), perfluoro-n-hexanoic acid (PFHxA), perfluoro-n-heptanoic acid (PFHpA), perfluoro-n-octanoic acid (PFOA), perfluoro-n-nonanoic acid (PFNA), perfluoro-n-decanoic acid (PFDA), perfluoro-n-undecanoic acid (PFUnA), perfluoro-n-dodecanoic acid (PFDoA), perfluoro-n-tridecanoic acid (PFTTrDA), and perfluoro-n-tetradecanoic acid (PFTeDA), each at 2 ng.μL<sup>-1</sup> in methanol (MeOH). PFS-MXA contained perfluoro-1-butanesulfonate (PFBS) potassium salt, perfluoro-1-hexanesulfonate (PFHxS) sodium salt, perfluoro-1-heptanesulfonate (PFHpS) sodium salt, n-perfluoro-1-octanesulfonate (PFOS) sodium salt and perfluoro-1-decanesulfonate (PFDS) sodium salt, N-Ethyl perfluorooctane sulfonamide (EtFOSA), N-Methyl perfluorooctane sulfonamide (MeFOSA), perfluorooctane sulfonamide (FOSA), N-Ethyl perfluorooctane sulfonamidoacetic acid (EtFOSAA), N-Methyl perfluorooctane sulfonamidoacetic acid (MeFOSAA), and 6:2 Fluorotelomer sulfonic acid (6:2 FTSA), each at 2 ng.μL<sup>-1</sup> in methanol (MeOH). A working solution containing all analytes, each at approximately 0.1 ng.μL<sup>-1</sup>, was prepared in MeOH and stored at -18°C.

<sup>13</sup>C-labeled PFHxA, PFOA, PFDA, PFOS, and FOSA (each at 50 ng.μL<sup>-1</sup> in MeOH), 2H (or D)-labeled MeFOSA, and EtFOSA were supplied by Wellington Laboratories and used as internal standards (ISs). A working solution was prepared in MeOH, containing each IS at 0.1 ng.μL<sup>-1</sup> (Table S1).

LC/MS-grade MeOH and acetonitrile (ACN) were purchased from J.T.Baker (France). Sodium acetate buffer (99%, ACS Reagent), ammonium hydroxide (28-

30% in water), 0.2µm nylon centrifuge tube filters, and ENVI-Carb cartridges (6cc, 250 mg) were obtained from Sigma-Aldrich (St Quentin Fallavier, France), whereas Strata XAW (6cc, 200 mg) were purchased from Phenomenex (Le Pecq, France). Nitrogen (99%) was supplied by Air Liquide (Paris, France). Ultra-pure water was obtained using an Elix 10 purification system fitted with an EDS pack (Millipore, Guyancourt, France).

### **LC-MS/MS method**

LC-MS/MS analyses were performed using a 1290 Infinity HPLC system coupled to a 6460 Mass Spectrometer (Triple quadrupole), both from Agilent Technologies (Massy, France).

Analytes were separated using an Agilent Zorbax Eclipse Plus C18 column (2.1 x 100 mm; dp = 1.8 µm). Injection volume was set at 5 µL and mobile phase solvents were 0.02 M ammonium acetate in MQ water (A) and 0.02 M ammonium acetate in MQ water / acetonitrile (5:95, v/v) (B) in an initial ratio (A:B) of 80:20. Note that, according to the manufacturer instructions, an Agilent Zorbax SB C18 column (2.1 x 300 mm; dp = 3.5 µm) was installed between the outlet of pump A and the mixing chamber, so as to trap PFASs. A 90/10 ACN/Milli-Q water mixture was used to rinse the injection needle prior to injection.

Separation was achieved at 35°C using a flow rate of 0.5 mL<sup>-1</sup> with the following (A:B) gradient: 80:20 for 0.6 min, 80:20 to 17.5:72.5% at 8 min, 0:100 at 9.5 min, held for 2 minutes. At 11.5 min, B was returned to 80 % within 0.5 min and the system was equilibrated for 3.5 min.

The mass spectrometer was operated in electrospray negative ionisation mode (Jet Stream source) in Dynamic Multiple Reaction Monitoring (DMRM) using Agilent

MassHunter software (Table S2). The DMRM algorithm automatically constructs acquisition time windows for multiple analytes throughout the LC-MS/MS run, based on the retention time of each analyte. It allows the instrument to acquire MRM data only during a stated retention time window, thus reducing the number of concurrent transitions. Nebulising gas temperature, flow and pressure were set at 320°C, 8 L min<sup>-1</sup> and 60 psi, respectively. Sheath Gas Temperature was set at 350 °C and sheath gas flow was 12 L.min<sup>-1</sup>.

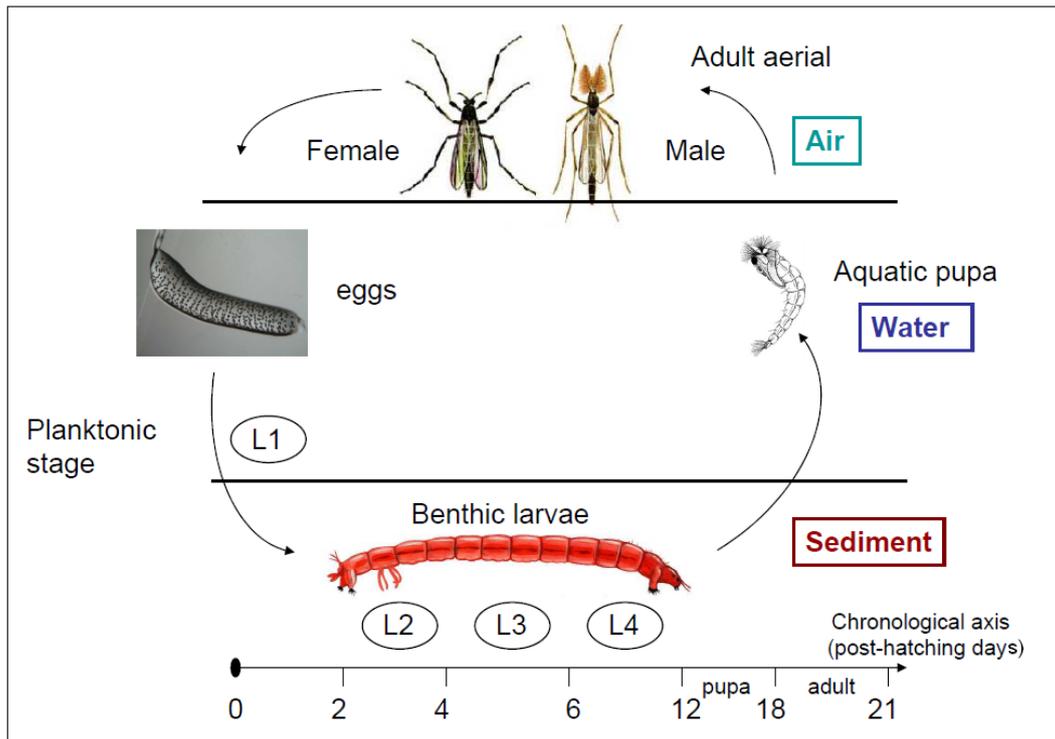
Identification of analytes was performed by comparing retention times with those determined with standard solutions. Furthermore, for each analyte, the ratio of the quantification transition area to the confirmation transition area was compared to that obtained with an authentic standard (margin applied: 25 %). Quantification was carried out by calculating the response factor of each analyte relative to its corresponding IS and concentrations were determined using a least-square linear regression (1/x weighing) analysis of the peak area ratio versus the concentration ratio.

**Table S1.** Name of perfluorinated compounds, acronyms, carbon number and associated internal standards (ISs).

Compounds	Acronyms	Carbon number	Fluorinated carbon number	ISs	ISs acronyms
Perfluorobutanoic acid	PFBA	4	3	[1,2- <sup>13</sup> C <sub>2</sub> ] PFHxA	MPFHxA
Perfluoropentanoic acid	PFPA	5	4	[1,2- <sup>13</sup> C <sub>2</sub> ] PFHxA	MPFHxA
Perfluorohexanoic acid	PFHxA	6	5	[1,2- <sup>13</sup> C <sub>2</sub> ] PFHxA	MPFHxA
Perfluoroheptanoic acid	PFHpA	7	6	[1,2,3,4- <sup>13</sup> C <sub>4</sub> ] PFOA	MPFOA
Perfluorooctanoic acid	PFOA	8	7	[1,2,3,4- <sup>13</sup> C <sub>4</sub> ] PFOA	MPFOA
Perfluorononanoic acid	PFNA	9	8	[1,2,3,4- <sup>13</sup> C <sub>4</sub> ] PFOA	MPFOA
Perfluorodecanoic acid	PFDA	10	9	[1,2- <sup>13</sup> C <sub>2</sub> ] PFDA	MPFDA
Perfluoroundecanoic acid	PFUnA	11	10	[1,2- <sup>13</sup> C <sub>2</sub> ] PFDA	MPFDA
Perfluorododecanoic acid	PFDoA	12	11	[1,2- <sup>13</sup> C <sub>2</sub> ] PFDA	MPFDA
Perfluorotridecanoic acid	PFTTrDA	13	12	[1,2- <sup>13</sup> C <sub>2</sub> ] PFDA	MPFDA
Perfluorotetradecanoic acid	PFTTeDA	14	13	[1,2- <sup>13</sup> C <sub>2</sub> ] PFDA	MPFDA
Perfluorobutane sulfonic acid	PFBS	4	3	[1,2,3,4- <sup>13</sup> C <sub>4</sub> ] PFOS	MPFOS
Perfluorohexane sulfonic acid	PFHxS	6	5	[1,2,3,4- <sup>13</sup> C <sub>4</sub> ] PFOS	MPFOS
Perfluoroheptane sulfonic acid	PFHpS	7	6	[1,2,3,4- <sup>13</sup> C <sub>4</sub> ] PFOS	MPFOS
Perfluorooctane sulfonic acid	PFOS	8	7	[1,2,3,4- <sup>13</sup> C <sub>4</sub> ] PFOS	MPFOS
Perfluorodecane sulfonic acid	PFDS	10	9	[1,2,3,4- <sup>13</sup> C <sub>4</sub> ] PFOS	MPFOS
N-Ethyl perfluorooctane sulfonamide	EtFOSA	8	7	d <sub>5</sub> -N-EtFOSA	MFOSA
N-Methyl perfluorooctane sulfonamide	MeFOSA	8	7	d <sub>3</sub> -N-MeFOSA	d-N-MeFOSA
Perfluorooctane sulfonamide	FOSA	8	7	[ <sup>13</sup> C <sub>8</sub> ] FOSA	d-N-FOSA
N-Ethyl perfluorooctane sulfonamidoacetic acid	EtFOSAA	8	7	d <sub>5</sub> -N-EtFOSA	d-N-EtFOSA
N-Methyl perfluorooctane sulfonamidoacetic acid	MeFOSAA	8	7	d <sub>3</sub> -N-MeFOSA	d-N-MeFOSA
6:2 Fluorotelomer sulfonic acid	6:2 FTSA	8	6	Sodium [1,2,3,4- <sup>13</sup> C <sub>4</sub> ] PFOS	MPFOS

**Table S2.** Acquisition parameters for PFAS analyses

Compound Name	Retention Time (min)	Collision Energy (V)	Fragmentor (V)	Precursor Ion (m/z)	Product Ion (m/z)
PFBA	1.1	4	64	213	168.9
PFPA	2.3	2	67	263	218.9
<sup>13</sup> C-PFHxA	3.32	2	72	314.9	269.9
PFHxA	3.32	2	72	313	268.9
PFHxA	3.13	12	72	313	118.9
PFBS	3.41	28	131	298.9	98.9
PFBS	3.41	36	131	298.9	79.9
PFHpA	4.13	2	72	363	318.9
PFHpA	4.13	8	72	363	168.9
6:2 FTSA	4.47	20	84	427	406.8
6:2 FTSA	4.47	48	84	427	79.9
<sup>13</sup> C-PFOA	4.84	4	82	416.9	371.9
PFOA	4.84	4	82	413	368.9
PFOA	4.84	12	82	413	168.9
PFHxS	5.11	40	151	398.9	98.9
PFHxS	5.11	52	151	398.9	79.9
PFNA	5.49	4	77	463	418.9
PFNA	5.49	12	77	463	218.9
PFHpS	5.81	44	168	448.9	98.9
PFHpS	5.81	56	168	448.9	79.9
<sup>13</sup> C-PFDA	6.1	4	88	514.9	469.9
PFDA	6.1	4	88	513	468.9
PFDA	6.1	16	88	513	268.9
d-N-MeFOSAA	6.14	16	119	573	418.8
MeFOSAA	6.14	16	119	570	511.8
MeFOSAA	6.14	16	119	570	418.8
PFOS	6.2	44	188	498.9	98.9
PFOS	6.2	60	188	498.9	79.9
<sup>13</sup> C-PFOS	6.23	60	188	502.9	79.9
EtFOSAA	6.42	16	129	584	525.8
EtFOSAA	6.42	16	129	584	418.8
PFUnA	6.71	4	88	563	518.9
PFUnA	6.71	16	88	563	268.9
PFDoA	7.29	4	93	613	568.9
PFDoA	7.29	24	93	613	168.9
PFDS	7.67	56	220	598.9	98.9
PFDS	7.67	76	220	598.9	79.9
PFTTrDA	7.87	4	94	663	618.9
PFTTrDA	7.87	13	99	663	369
<sup>13</sup> C-FOSA	7.99	36	151	505.9	77.9
FOSA	7.99	36	151	497.9	77.9
PFTeDA	8.45	8	99	712.9	668.8
PFTeDA	8.45	13	99	712.9	419
d-N-MeFOSA	9.37	28	126	514.9	168.9
MeFOSA	9.37	24	126	512	218.9
MeFOSA	9.37	28	126	512	168.9
d-N-EtFOSA	9.65	28	146	531	168.9
EtFOSA	9.65	24	146	526	218.9
EtFOSA	9.65	28	146	526	168.9



**Figure S1:** Life cycle of the midge *Chironomus riparius*, L1, L2, L3, L4: first, second, third and fourth instars, respectively.



**Table S3.** PFAS recovery rates from spiked samples, with standard deviation (n = 3), n.d: not determined.

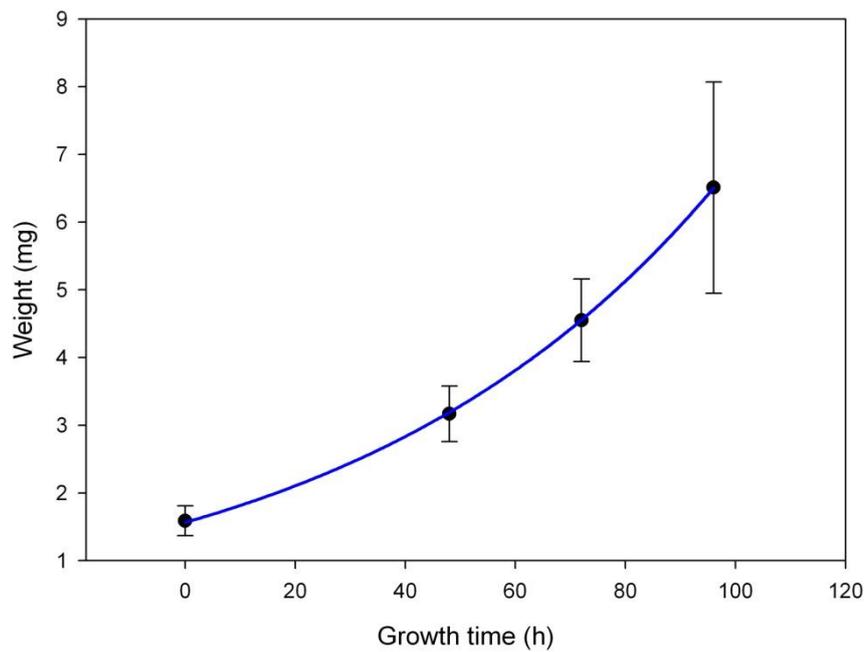
	<b>Fish (Brown trout)</b>	<b>Sediment</b>	<b>water</b>
Spike level	3 - 5 ng.g <sup>-1</sup> ww	2 - 4 ng.g <sup>-1</sup> dw	2 - 3 ng.L <sup>-1</sup>
<b>PFBA</b>	95.6 ± 9.5	63.5 ± 8.4	77.5 ± 8.8
<b>PFPA</b>	75.3 ± 9.2	67.4 ± 10.4	85.8 ± 13.8
<b>PFHxA</b>	78.5 ± 9.5	70.4 ± 11.7	90.7 ± 15.0
<b>PFHpA</b>	75.7 ± 8.7	72.1 ± 12.2	96.9 ± 25.6
<b>PFOA</b>	78.5 ± 8.9	74.4 ± 14.5	84.0 ± 11.7
<b>PFNA</b>	82.6 ± 8.8	74.4 ± 13.9	81.0 ± 10.6
<b>PFDA</b>	80.7 ± 8.3	76.0 ± 12.3	65.5 ± 12.3
<b>PFUnA</b>	78.6 ± 7.5	79.5 ± 12.4	54.7 ± 4.9
<b>PFDoA</b>	87.0 ± 8.7	78.7 ± 15.0	51.9 ± 3.1
<b>PFTTrDA</b>	68.8 ± 4.9	68.7 ± 13.9	49.6 ± 2.8
<b>PFTeDA</b>	50.0 ± 10.0	40.4 ± 10.9	49.7 ± 9.5
<b>PFBS</b>	97.6 ± 5.4	87.5 ± 13.6	88.0 ± 12.0
<b>PFHxS</b>	87.2 ± 9.7	66.8 ± 12.9	90.5 ± 11.9
<b>PFHpS</b>	93.2 ± 5.8	74.1 ± 13.1	76.2 ± 12.6
<b>PFOS</b>	85.1 ± 9.3	88.4 ± 10.5	78.4 ± 10.4
<b>PFDS</b>	77.5 ± 3.9	70.1 ± 13.7	51.3 ± 3.5
<b>6:2 FTSA</b>	109.9 ± 6.7	77.7 ± 16.3	67.4 ± 6.4
<b>MeFOSAA</b>	93.0 ± 7.0	55.7 ± 10.7	n.d
<b>EtFOSAA</b>	52.0 ± 8.0	52.0 ± 14.2	n.d
<b>FOSA</b>	77.7 ± 5.6	61.0 ± 0.9	75.5 ± 14.4
<b>MeFOSA</b>	57.9 ± 6.0	45.5 ± 0.3	n.d
<b>EtFOSA</b>	40.6 ± 4.3	39.9 ± 1.5	n.d

**Table S4.** PFAS detection limits (LDs) and quantification limits (LQs) in different matrix: grey cases corresponding at LDs and LQs calculated from blanks, white cases corresponding at LDs and LQs calculated with ratio signal/noise from spiked samples (S/N = 3 and 9, respectively), n.d: not determined. Analyses were performed on 0.8 L overlying water, 18 mL pore water, 1.1 g sediment (dw) and 0.8 g chironomids (ww) (mean values)

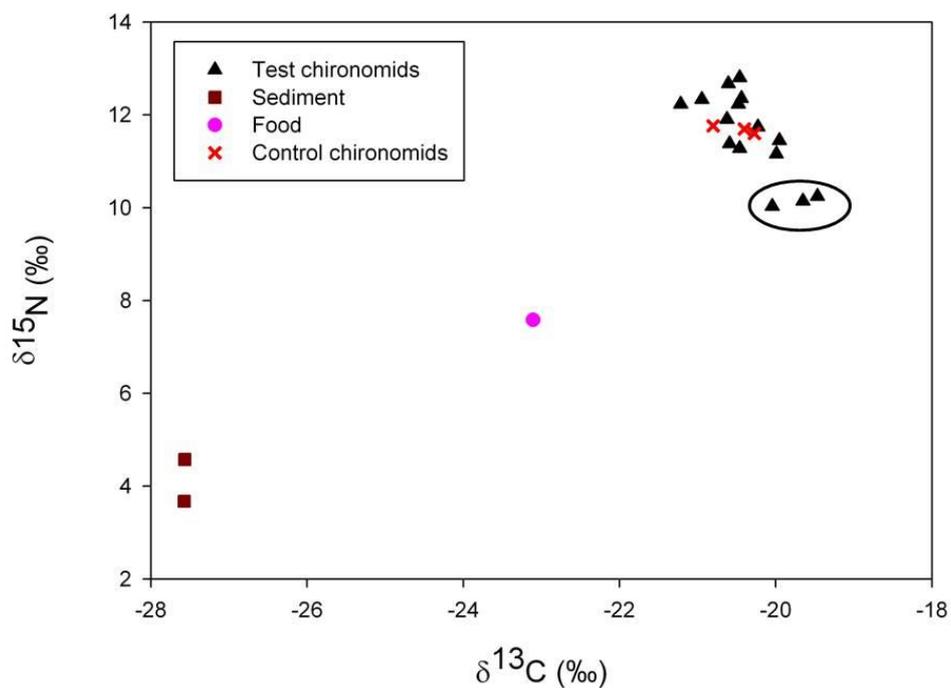
	LDs (ng.g <sup>-1</sup> or .L <sup>-1</sup> )				LQs (ng.g <sup>-1</sup> or .L <sup>-1</sup> )			
	Overlying water	Pore water	Sediment	Chironomid	Overlying water	Pore water	Sediment	Chironomid
PFBA	0.053	0.199	0.002	0.001	0.176	0.665	0.007	0.004
PFPA	0.137	0.248	0.003	0.017	0.457	0.826	0.011	0.057
PFHxA	0.426	0.090	0.023	0.334	1.421	0.270	0.070	1.002
PFHpA	0.959	0.492	0.011	0.022	3.196	1.639	0.036	0.073
PFOA	0.379	1.005	0.005	0.034	1.263	3.349	0.016	0.112
PFNA	0.030	0.238	0.052	0.028	0.090	0.793	0.156	0.095
PFDA	0.060	0.060	0.037	0.036	0.180	0.180	0.124	0.120
PFUnA	0.036	0.045	0.028	0.072	0.120	0.135	0.083	0.216
PFDoA	0.060	0.060	0.011	0.021	0.180	0.180	0.032	0.064
PFTTrDA	0.075	0.075	0.029	0.090	0.225	0.225	0.086	0.269
PFTeDA	0.075	0.075	0.017	0.038	0.225	0.225	0.059	0.115
PFBS	0.013	0.015	0.024	0.047	0.043	0.045	0.072	0.141
PFHxS	0.012	0.012	0.022	0.117	0.036	0.036	0.066	0.351
PFHpS	0.003	0.003	0.032	0.032	0.009	0.009	0.096	0.097
PFOS	0.016	0.045	0.020	0.040	0.052	0.135	0.059	0.119
PFDS	0.045	0.045	0.008	0.040	0.135	0.135	0.025	0.121
FOSA	0.064	1.203	0.003	0.005	0.213	4.011	0.010	0.015
MeFOSA	n.d	n.d	0.001	0.042	n.d	n.d	0.003	0.126
EtFOSA	n.d	n.d	0.006	0.009	n.d	n.d	0.017	0.026
MeFOSAA	0.006	0.006	0.028	0.055	0.018	0.018	0.083	0.164
EtFOSAA	0.090	0.090	0.020	0.030	0.270	0.270	0.061	0.091
6:2 FTSA	0.006	0.006	0.020	0.026	0.018	0.018	0.059	0.079

**Table S5.** PFAS concentrations in abiotic compartments during the experiment, min: minimal concentration, max: maximal concentration; bold numbers contain values <LQs, grey cases correspond to compounds not detected, n.d: not determined.

Matrix	Sediment (ng.g <sup>-1</sup> dw)			Overlying water (ng.L <sup>-1</sup> )			Pore water (ng.L <sup>-1</sup> )		
	min	max	mean ± sd	min	max	mean ± sd	min	max	mean ± sd
PFBA	0.031	0.042	0.035 ± 0.005	0.521	0.890	0.763 ± 0.165	3.127	3.497	3.254 ± 0.210
PFPA	0.019	0.035	0.028 ± 0.008	0.786	1.042	0.867 ± 0.118	2.739	2.955	2.883 ± 0.125
PFHxA	0.091	0.133	0.116 ± 0.018	<LQ	<LQ	-	100.143	139.253	124.629 ± 21.339
PFHpA	≤ LQ	0.069	<b>0.037 ± 0.025</b>				<LQ	2.346	<b>1.592 ± 0.764</b>
PFOA	0.104	0.362	0.218 ± 0.108	<LQ	<LQ	-	9.462	12.233	10.950 ± 1.397
PFNA	0.201	0.301	0.245 ± 0.050	<LQ	0.304	<b>0.172 ± 0.106</b>	21.396	23.411	22.258 ± 1.038
PFDA	0.434	1.376	0.908 ± 0.425	<LD	<LQ	-			
PFUnA	1.405	1.897	1.698 ± 0.216	0.288	0.732	0.450 ± 0.197	<LQ	12.646	<b>6.532 ± 6.296</b>
PFDoA	0.677	2.163	1.538 ± 0.626						
PFTTrDA	2.251	2.763	2.538 ± 0.226	<LD	0.271	0.150 ± 0.107			
PFTeDA	0.411	1.783	0.990 ± 0.576						
PFBS				0.458	0.497	0.477 ± 0.017	<LQ	<LQ	-
PFHxS				0.616	0.925	0.758 ± 0.152			
PFOS	0.247	0.294	0.263 ± 0.022	0.178	0.323	0.233 ± 0.065	<LQ	3.727	<b>1.885 ± 1.830</b>
6:2 FTSA	0.194	0.380	0.278 ± 0.080	0.080	0.368	0.167 ± 0.137	80.341	97.430	89.452 ± 8.601
EtFOSAA	<LQ	<LQ	-	n.d	n.d	-	n.d	n.d	-
FOSA	0.021	0.042	0.028 ± 0.010						



**Figure S3.** Fourth instar larvae weight data during E2 experiment where  $W$  is weight,  $W_0$  is weight at  $T_0$  and  $g$  the growth rate ( $0.0148 \pm 0.0001 \text{ h}^{-1}$ ),  $R^2 = 0.999$ ,  $p < 0.0001$



**Figure S4.** Isotopic data of chironomids (test and control), sediment and food. Three triangles outside the group correspond to chironomids  $T_0$  (black circle)

**Table S6.** Review of PFAS concentrations in sediment (ng.g<sup>-1</sup> dw), data reported in Beškoski et al. (2013) are not repeated herein.

Localisation	PFHxA	PFHpA	PFOA	PFNA	PFDA	PFUnA	PFDoA	PFTrDA	PFTeDA	PFOS	FOSA	Reference
<b>Amérique</b>												
San Francisco Bay, Californie	-	-	n.d - 0.625	n.d - < 0.12	n.d - 0.335	n.d	n.d - 0.365	-	n.d - 0.435	n.d - 3.07	-	Higgins et al., 2005
Baltimore, Maryland	-	-	0.186 - 0.390	n.d - 0.237	0.122 - 0.757	n.d - 0.396	n.d - 0.556	-	< 0.12 - 0.206	n.d - 0.846	-	Higgins et al., 2005
Corvallis, Oregon	-	-	0.184	n.d	0.144	n.d	n.d	-	n.d	0.018	-	Higgins et al., 2005
Californie	-	-	0.050 - 0.063	0.073 - 0.182	0.171 - 0.253	0.038 - 0.092	0.052 - 0.123	-	-	0.202 - 2.280	-	Higgins et al., 2007
Coosa River, Alabama, Tennessee	< LD - 0.40	< LD - 0.39	0.06 - 1.97	0.03 - 0.68	0.03 - 4.66	< LD - 3.80	< LD - 4.64	0.07 - 0.99	0.05 - 1.67	< LD - 20.18	-	Lasier et al., 2011
Hudson Bay, NE Canada	-	<0.05	0.017 - 0.13	<0.06 - 0.14	0.01 - 0.07	0.02 - 0.12	<0.03	-	0.01 - 0.05	<0.04	< 0.01 - 0.04	Kelly et al, 2009
False creek Harbour, Vancouver Canada	0.076 - 0.270	0.024 - 0.072	0.034 - 0.078	0.062 - 0.17	0.049 - 0.17	0.046 - 0.16	0.055 - 0.41	-	0.06 - 0.47	0.034 - 0.18	0.015 - 0.059	Benskin et al., 2012
<b>Australie</b>												
Sydney Harbor	n.d	< LQ	0 - 0.16	<0.10 - 0.11	0 - 0.81	0.10 - 0.61	0 - 1.1	<0.10 - 0.27	n.d	0.80 - 6.2	-	Thompson et al., 2011
<b>Asie</b>												
Dalai River System, China	-	-	<0.08 - 0.17	<0.10	n.d - 0.10	-	<0.09 - 0.14	-	n.d - <0.17	<0.12 - 0.37	-	Bao et al., 2009
Zhujiang River, Guangzhou, China	-	-	0.09 - 0.29	-	n.d - 0.11	-	n.d - 0.10	-	-	n.d - 1.0	-	Bao et al., 2010
Huangpu River Shangai, China	-	-	0.20 - 0.64	-	n.d - <0.09	-	n.d - 0.10	-	-	n.d - 0.46	-	Bao et al., 2010
The Ariaque Sea, Japan	-	-	0.84 - 1.1	<1.5	-	-	-	-	-	0.09 - 0.14	<1.5	Nakata et al., 2006
Tokyo Bay, Japan	-	< LQ - 0.08	0.12 - 0.45	0.19 - 0.50	0.03 - 0.15	0.05 - 0.55	< LQ - 0.29	< LQ - 1.19	-	0.45 - 1.79	-	Zushi et al., 2010
<b>Europe</b>												
Orge River (nearby Paris), France	0.06	0.03	<0.07	0.05	0.3	0.29	1.7	0.3	0.86	4.3	-	Labadie and Chevreuil, 2011
L'Albufera Natural Park, Valencia, Spain	<0.02 - 0.10	<0.02 - 0.95	0.03 - 10.9	n.d - 1.24	n.d - 1.25	-	-	-	-	0.10 - 4.80	-	Pico et al., 2012
Lake Constance, Alpine Lakes, Autria	0.27 - 1.7	0.39 - 1.3	<0.13 - 0.82	n.d - 0.53	n.d - 0.36	n.d - 0.80	n.d - 0.37	-	-	n.d - <0.94	n.d	Clara et al., 2009

Localisation	PFHxA	PFHpA	PFOA	PFNA	PFDA	PFUnA	PFDoA	PFTTrDA	PFTTeDA	PFOS	FOSA	Reference
Danube riverbank from Aschach to Wildungsmauer, Austria	0.19 - 4.6	0.09 - 5.1	0.65 - 2.8	n.d - 0.69	n.d - 0.61	n.d - 0.84	n.d - 0.45	-	-	n.d - 0.91	n.d - <0.15	Clara et al., 2009
North Sea	<0.03 - 0.087	<0.03 - 0.171	0.079 - 1.575	<0.03 - 0.289	<0.03 - 0.294	-	-	-	-	0.038 - 2.425	<0.005 - 0.110	Theobald et al, 2012
Baltic Sea	<0.03 - 0.049	<0.03 - 0.102	0.061 - 0.684	0.037 - 0.232	0.038 - 0.129	-	-	-	-	0.025 - 0.666	0.005 - 0.015	Theobald et al, 2012
île du beurre (nearby Lyon), France	0.091 - 0.133	<LQ - 0.069	0.104 - 0.362	0.201 - 0.301	0.434 - 1.376	1.405 - 1.897	0.677 - 2.163	2.251 - 2.763	0.411 - 1.783	0.247 - 0.294	0.021 - 0.042	present study

## References

- Bao, J., Jin, Y., Liu, W., Ran, X., Zhang, Z., 2009. Perfluorinated compounds in sediments from the Daliao River system of northeast China. *Chemosphere* 77, 652-657.
- Bao, J., Liu, W., Liu, L., Jin, Y., Ran, X., Zhang, Z., 2010. Perfluorinated compounds in urban river sediments from Guangzhou and Shanghai of China. *Chemosphere* 80, 123-130.
- Benskin, J.P., Ikonomou, M.G., Gobas, F.A.P.C., Woudneh, M.B., Cosgrove, J.R., 2012. Observation of a Novel PFOS-Precursor, the Perfluorooctane Sulfonamido Ethanol-Based Phosphate (SAMPAP) Diester, in Marine Sediments. *Environmental Science & Technology* 46, 6505-6514.
- Beškoski, V.P., Takemine, S., Nakano, T., Beškoski, L.S., Gojgic'-Cvijovic', G., Ilic', M., Miletic', S., Vrvic', M.M., 2013. Perfluorinated compounds in sediment samples from the wastewater canal of Pančevo (Serbia) industrial area. *Chemosphere* (in press).
- Clara, M., Gans, O., Weiss, S., Sanz-Escribano, D., Scharf, S., Scheffknecht, C., 2009. Perfluorinated alkylated substances in the aquatic environment: An Austrian case study. *Water Research* 43, 4760-4768.
- Higgins, C.P., Field, J.A., Criddle, C.S., Luthy, R.G., 2005. Quantitative determination of perfluorochemicals in sediments and domestic sludge. *Environmental Science and Technology* 39, 3946-3956.
- Higgins, C.P., McLeod, P.B., Macmanus-Spencer, L.A., Luthy, R.G., 2007. Bioaccumulation of perfluorochemicals in sediments by the aquatic oligochaete *Lumbriculus variegatus*. *Environmental Science and Technology* 41, 4600-4606.
- Kelly, B.C., Ikonomou, M.G., Blair, J.D., Surridge, B., Hoover, D., Grace, R., Gobas, F.A.P.C., 2009. Perfluoroalkyl contaminants in an arctic marine food web: Trophic magnification and wildlife exposure. *Environmental Science and Technology* 43, 4037-4043.
- Labadie, P., Chevreuil, M., 2011. Partitioning behaviour of perfluorinated alkyl contaminants between water, sediment and fish in the Orge River (nearby Paris, France). *Environmental Pollution* 159, 391-397.
- Lasier, P.J., Washington, J.W., Hassan, S.M., Jenkins, T.M., 2011. Perfluorinated chemicals in surface waters and sediments from northwest Georgia, USA, and their bioaccumulation in *Lumbriculus variegatus*. *Environmental Toxicology and Chemistry* 30, 2194-2201.
- Nakata, H., Kannan, K., Nasu, T., Cho, H.S., Sinclair, E., Takemura, A., 2006. Perfluorinated contaminants in sediments and aquatic organisms collected from shallow water and tidal flat areas of the Ariake Sea, Japan: Environmental fate of perfluorooctane sulfonate in aquatic ecosystems. *Environmental Science and Technology* 40, 4916-4921.
- Pico, Y., Blasco, C., Farré, M., Barceló, D., 2012. Occurrence of perfluorinated compounds in water and sediment of L'Albufera Natural Park (València, Spain). *Environmental Science and Pollution Research*, 1-12.

Theobald, N., Caliebe, C., Gerwinski, W., Hühnerfuss, H., Lepom, P., 2012. Occurrence of perfluorinated organic acids in the North and Baltic Seas. Part 2: distribution in sediments. *Environmental Science and Pollution Research*, 1-12.

Thompson, J., Roach, A., Eaglesham, G., Bartkow, M.E., Edge, K., Mueller, J.F., 2011. Perfluorinated alkyl acids in water, sediment and wildlife from Sydney Harbour and surroundings. *Marine Pollution Bulletin*.

Zushi, Y., Tamada, M., Kanai, Y., Masunaga, S., 2010. Time trends of perfluorinated compounds from the sediment core of Tokyo Bay, Japan (1950s–2004). *Environment and Pollution* 158, 756.

*Annexe 2 : Matériel supplémentaire publiée 2*

**Supporting information**

**Refining PFAS uptake and depuration constants for *C. riparius***

**larvae: what can be learned from a simple model accumulation?**

Delphine Bertin<sup>1</sup>, Benoît J. D. Ferrari<sup>1,2</sup>, Pierre Labadie<sup>3,4</sup>, Alexandre Sapin<sup>1</sup>, Débora Da Silva Avelar<sup>1</sup>, Rémy Beaudouin<sup>5</sup>, Alexandre Péry<sup>6</sup>, Jeanne Garric<sup>1</sup>, Hélène Budzinski<sup>3</sup>, Marc Babut<sup>1</sup>.

<sup>1</sup>Present address: IRSTEA, UR MALY, 5 rue de la Doua, CS 70077, F- 69626 Villeurbanne, France. E-mail address: [delphine.bertin@irstea.fr](mailto:delphine.bertin@irstea.fr) ; [jeanne.garric@irstea.fr](mailto:jeanne.garric@irstea.fr) ; [marc.babut@irstea.fr](mailto:marc.babut@irstea.fr)

<sup>2</sup>: Ecotox Center, Eawag-EPFL, EPFL-ENAC-IIE-GE, Station 2, CH-1015 Lausanne, Switzerland.

E-mail address: [benoit.ferrari@centreecotox.ch](mailto:benoit.ferrari@centreecotox.ch)

<sup>3</sup>: Université Bordeaux, UMR 5805 EPOC (LPTC Research group), Université de Bordeaux, 351 Cours de la Libération, 33405 Talence, France. E-mail address: [pierre.labadie@u-bordeaux1.fr](mailto:pierre.labadie@u-bordeaux1.fr) ; [h.budzinski@epoc.u-bordeaux1.fr](mailto:h.budzinski@epoc.u-bordeaux1.fr)

<sup>4</sup>: CNRS, UMR 5805 EPOC (LPTC Research group), Université de Bordeaux, 351 Cours de la Libération, 33405 Talence, France.

<sup>5</sup>: Unité Modèles pour l'Ecotoxicologie et la Toxicologie (METO), Institut National de l'Environnement Industriel et des Risques (INERIS), BP2, F-60550 Verneuil en Halatte, France. E-mail address: [remy.beaudouin@ineris.fr](mailto:remy.beaudouin@ineris.fr)

<sup>6</sup>: AgroParisTech, E-mail address: [alexandre.pery@agroparistech.fr](mailto:alexandre.pery@agroparistech.fr)

### **LC-MS/MS method**

LC-MS/MS analyses were performed using a 1290 Infinity HPLC system coupled to a 6460 Mass Spectrometer (Triple quadrupole), both from Agilent Technologies (Massy, France).

Analytes were separated using an Agilent Zorbax Eclipse Plus C18 column (2.1 x 100 mm; dp = 1.8 µm). Injection volume was set at 5 µL and mobile phase solvents were 0.02 M ammonium acetate in MQ water (A) and 0.02 M ammonium acetate in MQ water / acetonitrile (5:95, v/v) (B) in an initial ratio (A:B) of 80:20. Note that, according to the manufacturer instructions, an Agilent Zorbax SB C18 column (2.1 x 300 mm; dp = 3.5 µm) was installed between the outlet of pump A and the mixing chamber, so as to trap PFASs. A 90/10 ACN/Milli-Q water mixture was used to rinse the injection needle prior to injection.

Separation was achieved at 35°C using a flow rate of 0.5 mL<sup>-1</sup> with the following (A:B) gradient: 80:20 for 0.6 min, 80:20 to 17.5:72.5% at 8 min, 0:100 at 9.5 min, held for 2 minutes. At 11.5 min, B was returned to 80 % within 0.5 min and the system was equilibrated for 3.5 min.

The mass spectrometer was operated in electrospray negative ionisation mode (Jet Stream source) in Dynamic Multiple Reaction Monitoring (DMRM) using Agilent MassHunter software (Table S2). The DMRM algorithm automatically constructs acquisition time windows for multiple analytes throughout the LC-MS/MS run, based on the retention time of each analyte. It allows the instrument to acquire MRM data only during a stated retention time window, thus reducing the number of concurrent transitions. Nebulising gas temperature, flow and pressure were set at 320°C, 8 L

min<sup>-1</sup> and 60 psi, respectively. Sheath Gas Temperature was set at 350 °C and sheath gas flow was 12 L.min<sup>-1</sup>.

Identification of analytes was performed by comparing retention times with those determined with standard solutions. Furthermore, for each analyte, the ratio of the quantification transition area to the confirmation transition area was compared to that obtained with an authentic standard (margin applied : 25 %). Quantification was carried out by calculating the response factor of each analyte relative to its corresponding IS and concentrations were determined using a least-square linear regression (1/x weighing) analysis of the peak area ratio versus the concentration ratio.

## **Chemicals**

Standard PFAS solutions (PFC-MXA and PFS-MXA) were obtained from Wellington Laboratories (via BCP Instruments, Irigny, France). A working solution containing all analytes, each at approximately 0.1 ng.µL<sup>-1</sup>, was prepared in MeOH and stored at -18°C.

<sup>13</sup>C-labeled PFHxA, PFOA, PFDA, PFOS, and FOSA (each at 50 ng.µL<sup>-1</sup> in MeOH), <sup>2</sup>H (or D)-labeled MeFOSA, and EtFOSA were supplied by Wellington Laboratories and used as internal standards (ISs). A working solution was prepared in MeOH, containing each IS at 0.1 ng.µL<sup>-1</sup> (Table S1).

LC/MS-grade MeOH and acetonitrile (ACN) were purchased from J.T.Baker (France). Sodium acetate buffer (99%, ACS Reagent), ammonium hydroxide (28-30% in water), 0.2µm nylon centrifuge tube filters, and ENVI-Carb cartridges (6cc, 250 mg) were obtained from Sigma-Aldrich (St Quentin Fallavier, France), whereas Strata XAW (6cc, 200 mg) were purchased from (Le Pecq, France). Nitrogen (99%)

was supplied by Air Liquide (Paris, France). Ultra-pure water was obtained by using an Elix 10 purification system fitted with an EDS pack (Millipore, Guyancourt, France).

### **Sediments characteristics**

The sediment was physicochemically characterized for water content, nitrogen and carbonates using a Bernard calcimeter, and loss on ignition (LOI) used as a proxy for organic carbon (AFNOR, 1994, 2000, 2007; Vatan 1967). The particle size distribution was determined by laser diffractometry (Cilas 1190, France). The sediment showed a water content of 51.1% and 56.8%, a nitrogen content of 0.15% for both, a carbonate content of 23.7% and 27.5%, and an organic carbon content of 5.4% and 5.2% (for the first and the second campaign respectively). The particles sizes distributions found to be for the first campaign 10% clay- silt ( $< 7.65\mu\text{m}$ ), 40% silt ( $7.65\mu\text{m} - 49.89 \mu\text{m}$ ), and 50% of silt - very fine sand ( $>49.89 \mu\text{m}$ ). And for the second campaign, the particles sizes distribution is 10% clay- silt ( $< 3.77 \pm 0.11 \mu\text{m}$ ), 40% silt ( $3.77 \pm 0.11 \mu\text{m} - 21.59 \pm 0.08 \mu\text{m}$ ), and 50% of silt - very fine sand ( $>74.90 \pm 0.73 \mu\text{m}$ ).

**Table S1.** Name of perfluorinated compounds, acronyms, carbon number and associated internal standards (ISs).

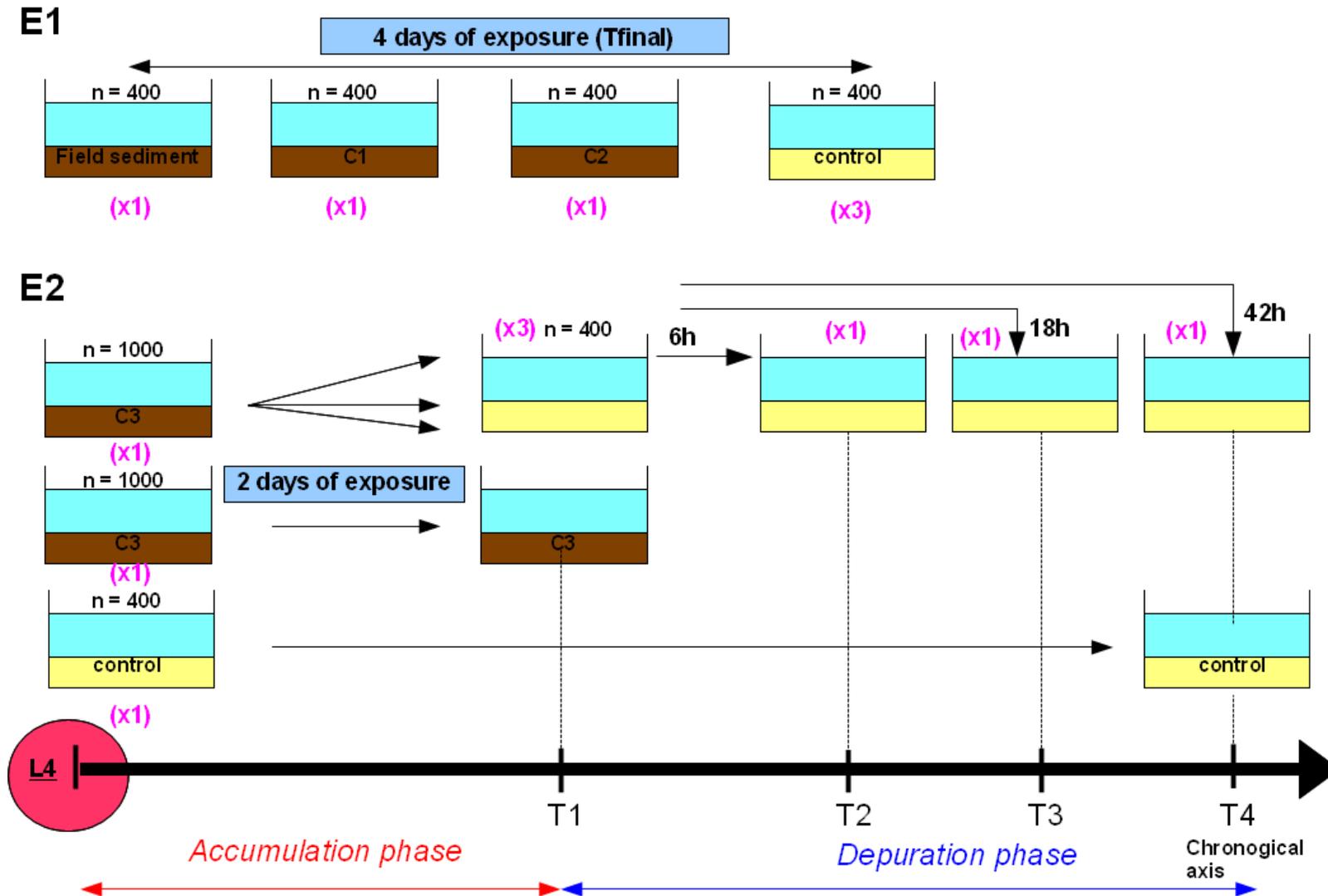
Compounds	Acronyms	Carbon number	Fluorinated carbon number	ISs	ISs acronyms
Perfluoroundecanoic acid	PFUnA	11	10	[1,2- <sup>13</sup> C <sub>2</sub> ] PFDA	MPFDA
Perfluorododecanoic acid	PFDoA	12	11	[1,2- <sup>13</sup> C <sub>2</sub> ] PFDA	MPFDA
Perfluorotridecanoic acid	PFTTrDA	13	12	[1,2- <sup>13</sup> C <sub>2</sub> ] PFDA	MPFDA
Perfluorooctane sulfonic acid	PFOS	8	7	[1,2,3,4- <sup>13</sup> C <sub>4</sub> ] PFOS	MPFOS
Perfluorooctane sulfonamide	FOSA	8	7	[ <sup>13</sup> C <sub>8</sub> ] FOSA	d-N-FOSA

**Table S2.** Acquisition parameters for PFAS analyses

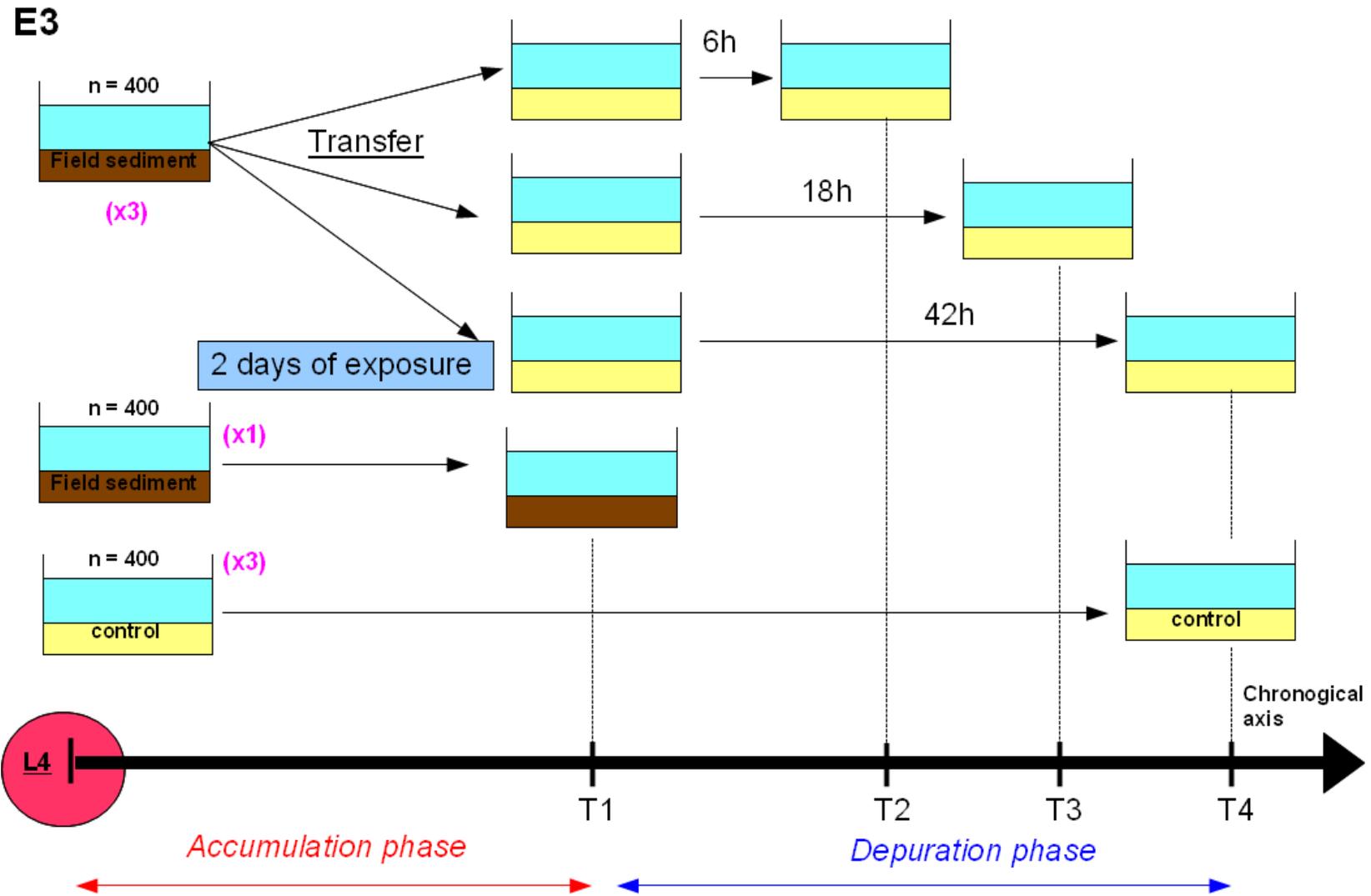
Compound Name	Retention Time (min)	Collision Energy (V)	Fragmentor (V)	Precursor Ion (m/z)	Product Ion (m/z)
PFOS	6.2	44	188	498.9	98.9
PFOS	6.2	60	188	498.9	79.9
<sup>13</sup> C-PFOS	6.23	60	188	502.9	79.9
PFUnA	6.71	4	88	563	518.9
PFUnA	6.71	16	88	563	268.9
PFTTrDA	7.87	4	94	663	618.9
PFTTrDA	7.87	13	99	663	369
<sup>13</sup> C-FOSA	7.99	36	151	505.9	77.9
FOSA	7.99	36	151	497.9	77.9

**Table S3.** PFAS recovery rates (%) from spiked samples, with standard deviation (n = 3), n.d: not determined.

	<b>Fish (Brown trout)</b>	<b>Sand</b>	<b>water</b>
Spike level	0.6 - 1.1 ng.g <sup>-1</sup> ww	0.3 - 0.6 ng.g <sup>-1</sup> dw	0.7 - 1.4 ng.L <sup>-1</sup>
<b>PFUnA</b>	117.8 ± 32.6	93.0 ± 3.9	49.6 ± 12.8
<b>PFTTrDA</b>	122.5 ± 32.5	119.0 ± 2.9	42.4 ± 14.7
<b>PFOS</b>	109.5 ± 37.6	116.8 ± 4.6	73.9 ± 3.2
<b>FOSA</b>	112.0 ± 31.7	112.0 ± 18.5	56.3 ± 0.3



**Figure S20.** E1 and E2 experimental design with accumulation part (E1) and elimination part (E2). C1 mean concentration 1 of spiked sediment, C2, concentration 2, C3 concentration 3 and L4 corresponding to larval stage.



**Figure S2.** E3 experimental design, L4 corresponding to larval stage.

**Table S4.** Method of sediment spiking from field sediment (C01 and C02), C01 was used for sediment spiking C1 and C2 concentrations and C02 for C3 concentration. Each C0 concentration was multiplied by a factor.

	PFUnA/PFOS	PFTrDA	FOSA
C01	-	-	-
C02	-	-	-
C1	x5	x5	x20
C2	x10	x10	x25
C3	-	x2	-

**Table S5.** PFAS detection limits (LDs) and quantification limits (LQs) in different matrix: grey cases corresponding to LDs and LQs calculated from blanks, white cases corresponding to LDs and LQs calculated with ratio signal/noise from spiked samples (S/N = 3 and 9, respectively), n.d: not determined. Analyses were performed on 0.7 L overlying water, 18.8 mL pore water, 1.2 g sediment (dw) and 0.8 g chironomids (ww) (mean values)

	LDs (ng.g-1 ou .L-1)				LQs (ng.g-1 ou .L-1)			
	Overlying water	Pore water	Sediment	Chironomid	Overlying water	Pore water	Sediment	Chironomid
PFUnA	0.065	0.065	0.001	0.004	0.195	0.195	0.003	0.011
PFTrDA	0.103	0.103	0.014	0.003	0.31	0.31	0.041	0.009
PFOS	0.005	0.005	0.001	0.011	0.015	0.015	0.004	0.032
FOSA	0.039	0.005	0.001	0.003	0.131	0.016	0.003	0.008

**Table S6.** Concentrations of PFASs (ng.g<sup>-1</sup> dw) measured in SRM 1947 Lake Michigan Fish Tissue, NIST method 1 and 2 are described in Reiner et al. (2012).

Compound	NIST method 1	NIST method 2	present study
	(n = 24)	(n = 12)	(n = 3)
PFUnA	0.212 ± 0.024	<0.128	0.149 ± 0.021
PFTrDA	0.154 ± 0.020	<0.738	<0.001
PFOS	6.17 ± 0.060	5.66 ± 0.28	3.974 ± 0.314
FOSA	<0.151	<0.171	0.162 ± 0.016

## Modeling details

Details of the development from the Eq (3) to the Eq (5):

$$\frac{d(C_{org} \cdot V)}{dt} = S_{org} \cdot k_u \cdot C_{sed} - S_{org} \cdot k_e \cdot C_{org} \quad \text{Eq. (A1)}$$

With  $C_{org}$  is the concentration of PFAS on the organism,  $S_{org}$  the surface of the organism,  $k_u$  ( $\text{g} \cdot \text{g}_{ww} \cdot \text{d}^{-1}$ ) and  $k_e$  ( $\text{d}^{-1}$ ) the uptake and elimination constants (respectively),  $C_{sed}$  ( $\text{ng} \cdot \text{g}^{-1}_{dw}$ ) and  $C_{org}$  ( $\text{ng} \cdot \text{g}^{-1}_{ww}$ ), the PFAS concentration in sediment and in organism (respectively).  $L$  and  $V$  are the organism length and volume, respectively.

$$\frac{d(C_{org})}{dt} \times V + C_{org} \times \frac{d(V)}{dt} = S_{org} \cdot k_u \cdot C_{sed} - S_{org} \cdot k_e \cdot C_{org} \quad \text{Eq. (A2)}$$

$$\frac{d(C_{org})}{dt} = \frac{S_{org}}{V} \cdot k_u \cdot C_{sed} - \frac{S_{org}}{V} \cdot k_e \cdot C_{org} - C_{org} \cdot \frac{d(V)}{dt} \cdot \frac{1}{V} \quad \text{Eq. (A3)}$$

$$\text{with } S_{org} = b \cdot L^2 \text{ and } V = a \cdot L^3$$

The equation 5 can be rewritten as:

$$\frac{d(C_{org})}{dt} \approx \left( \frac{1}{L} \cdot k_u \cdot C_{sed} - \frac{1}{L} \cdot k_e \cdot C_{org} \right) - C_{org} \cdot \frac{d(V)}{dt} \cdot \frac{1}{V} \quad \text{Eq. (A4)}$$

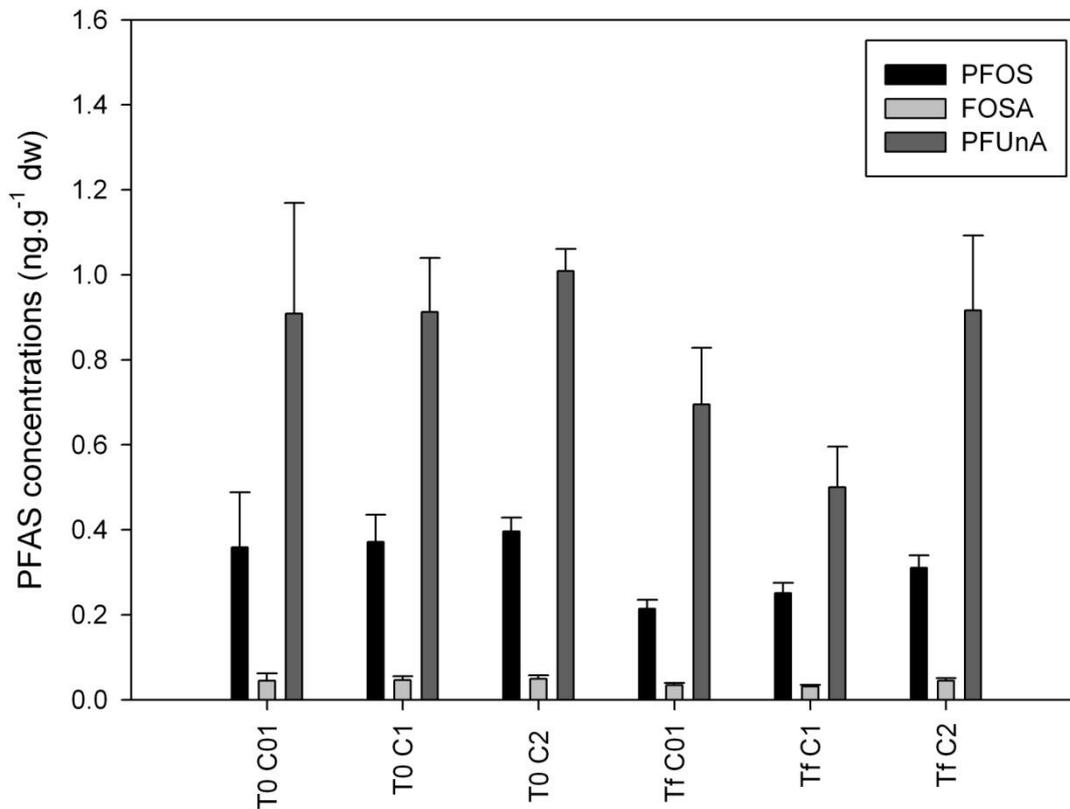
And with the concentration dependency :  $S = n - C_{org}$

$$\frac{d(C_{org})}{dt} = \left( \frac{1}{L} \cdot k_u \cdot C_{sed} \cdot S - \frac{1}{L} \cdot k_e \cdot C_{org} \cdot S \right) - C_{org} \cdot \frac{d(V)}{dt} \cdot \frac{1}{V} \quad \text{Eq. (A5)}$$

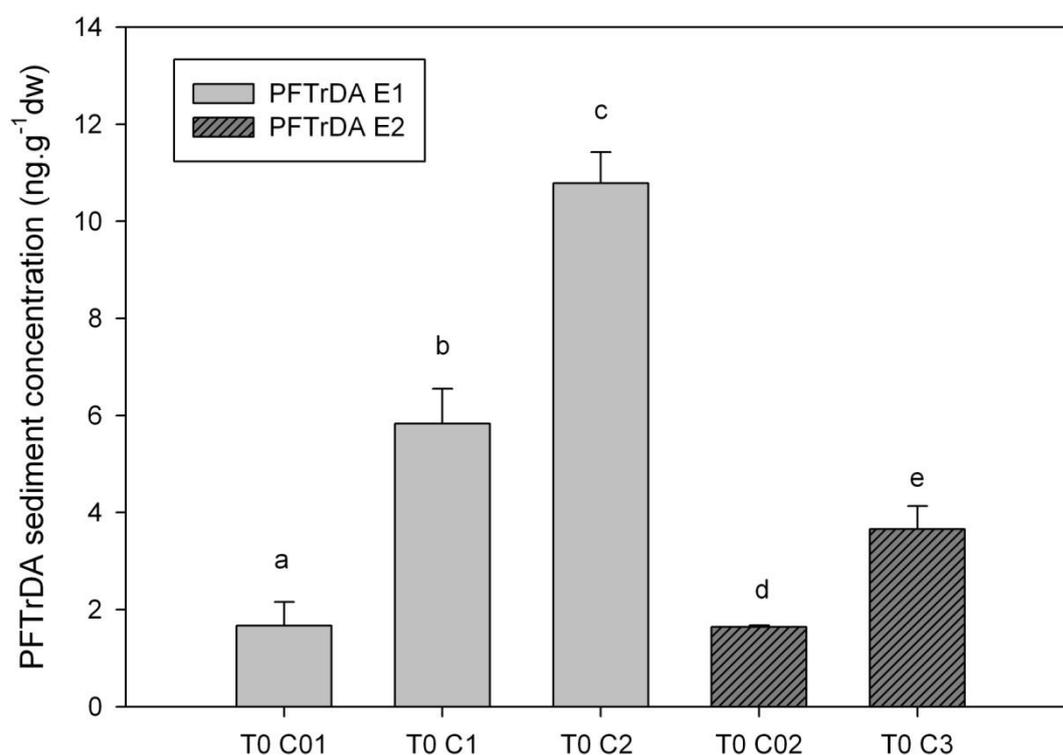
Linear growth:

$$\frac{d(L)}{dt} = r \text{ and } V = a \cdot L^3$$

$$\frac{d(V)}{dt} = \frac{d(a \cdot L^3)}{dt} = 3 \cdot a \cdot L^2 \times \frac{d(L)}{dt} = 3 \cdot a \cdot L^2 \times r \quad \text{Eq. (A6)}$$



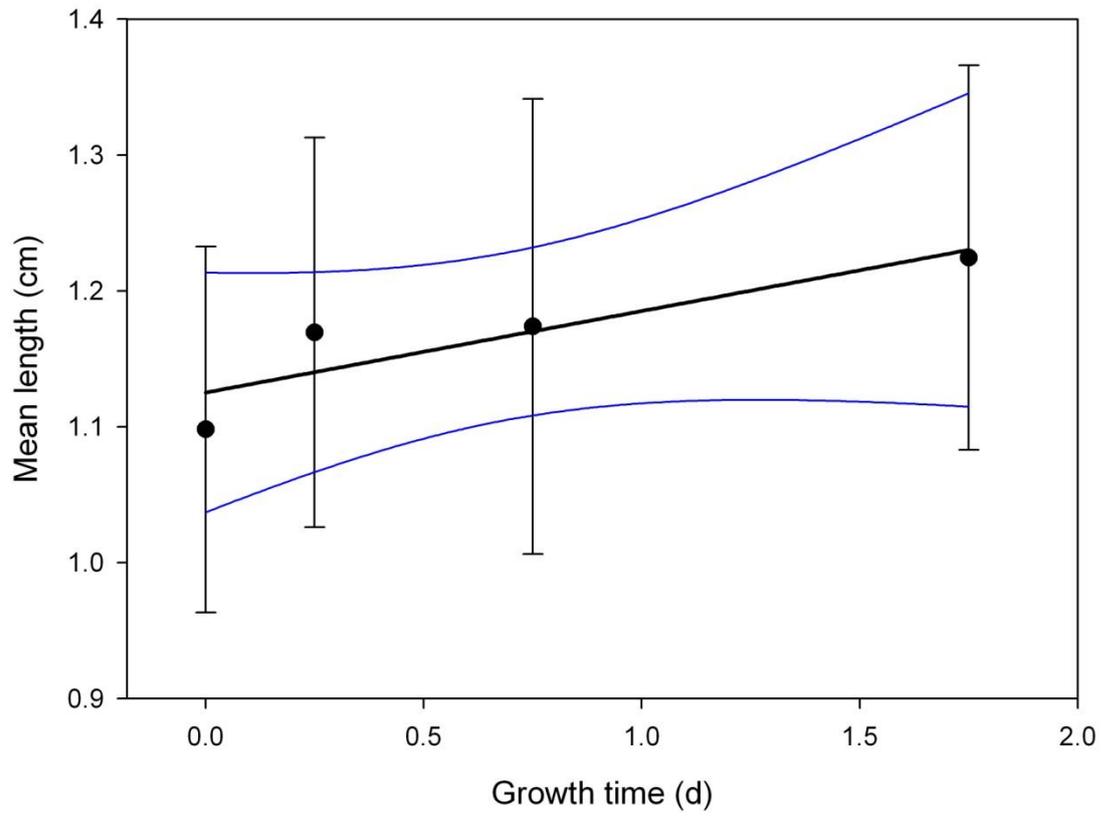
**Figure S3.** PFASs concentration in sediment spiked for E1 experiment at T0 and Tfinal (Tf). No significant differences between C01 (field sediment), C1 and C2 concentrations at T0 (t test was performed using R cran) (R Core Team, 2014).



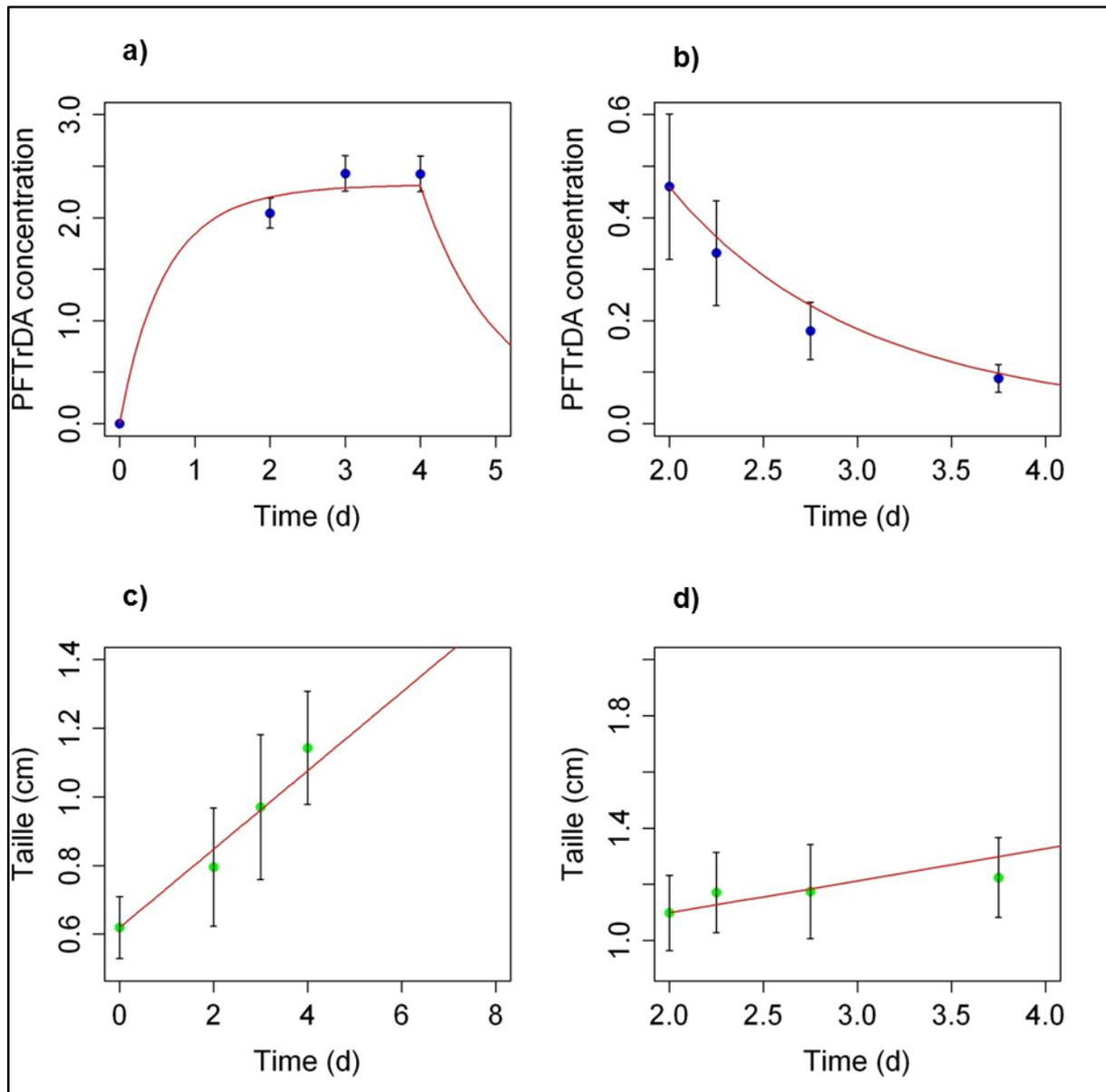
**Figure S4.** PFTTrDA concentrations in field (C01, C02) and spiked sediments (C1, C2 and C3) for E1 (gray) and E2 (dark gray with cross-bars) experiments at T0. Different letters above the histograms bars means a significant difference between them (t test was performed using R cran) (R Core Team, 2014).

**Table S6:** PFASs concentrations in sediment (ng.g<sup>-1</sup><sub>dw</sub>) for E1 and E2 experiments at T0 (before the experiment) and at Tfinal (E1) or T1 (E2).

Experiments	Time	Conditions	PFTTrDA	PFUnA	PFOS tot	FOSA
E1	T0	C01	1.7 ± 0.5	0.9 ± 0.3	0.4 ± 0.1	0.05 ± 0.02
		C1	5.8 ± 0.7	0.9 ± 0.1	0.4 ± 0.06	0.05 ± 0.009
		C2	10.8 ± 0.6	1.0 ± 0.05	0.4 ± 0.03	0.05 ± 0.008
	Tfinal	C01	1.2 ± 0.2	0.7 ± 0.1	0.2 ± 0.02	0.03 ± 0.005
		C1	3.3 ± 0.4	0.5 ± 0.1	0.3 ± 0.02	0.03 ± 0.004
		C2	9.8 ± 1.3	0.9 ± 0.2	0.3 ± 0.03	0.05 ± 0.006
E2	T0	C02	1.6 ± 0.03			
		C3	3.7 ± 0.5			
	T1	C02	1.5 ± 0.04			
		C3	3.8 ± 0.09			



**Figure S5.** Chironomids growth during the E3 experiment , linear growth model with  $R^2 = 0.798$ .



**Figure S6.** PFTTrDA modelisation with the  $H2$  hypothesis (no concentration dependency), a) and b) are the chironomid concentration (ng.g<sup>-1</sup>ww) during the accumulation and the elimination part (respectively), c) and d) are the chironomid growth during the accumulation and the elimination part (respectively). The red lines are the simulated data and the points are the observed data.

## **References**

R Core Team, 2014. R: A Language and Environment for Statistical Computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria.

Reiner, J., O'Connell, S., Butt, C., Mabury, S., Small, J., Silva, A., Muir, D.G., Delinsky, A., Strynar, M., Lindstrom, A., Reagen, W., Malinsky, M., Schäfer, S., Kwadijk, C.A.F., Schantz, M., Keller, J., 2012. Determination of perfluorinated alkyl acid concentrations in biological standard reference materials. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 404, 2683-2692.

*Annexe 3 : Matériel supplémentaire publiée 3*

**Supporting information**

**Accumulation of poly- and perfluoroalkyl compounds (PFAS) by  
a freshwater amphipod : *Gammarus sp.* (Crustacea)**

Delphine Bertin<sup>1</sup>, Pierre Labadie<sup>2</sup>, Benoît J. D. Ferrari<sup>1,3</sup>, Alexandre Sapin<sup>1</sup>, Jeanne Garric<sup>1</sup>,  
Olivier Geffard<sup>1</sup>, Hélène Budzinski<sup>2</sup>, Marc Babut<sup>1</sup>.

<sup>1</sup>Present address: IRSTEA, UR MALY, 5 rue de la Doua, CS 70077, F- 69626 Villeurbanne,  
France.

E-mail address: [delphine.bertin@irstea.fr](mailto:delphine.bertin@irstea.fr) ; [jeanne.garric@irstea.fr](mailto:jeanne.garric@irstea.fr) ; [olivier.geffard@irstea.fr](mailto:olivier.geffard@irstea.fr);  
[marc.babut@irstea.fr](mailto:marc.babut@irstea.fr)

<sup>2</sup>: Université Bordeaux 1, Environnements et Paléoenvironnements Océaniques et  
Continents (EPOC), UMR 5805 CNRS, Laboratoire de Physico- et Toxicochimie de  
l'environnement (LPTC), 351 cours de la Libération, 33405 Talence, France.

E-mail address: [pierre.labadie@u-bordeaux1.fr](mailto:pierre.labadie@u-bordeaux1.fr) ; [h.budzinski@epoc.u-bordeaux1.fr](mailto:h.budzinski@epoc.u-bordeaux1.fr)

<sup>3</sup>: Centre ecotox, EPFL ENAC IIE-GE, GR B0 391/392, Station 2, CH-1015 Lausanne,  
Switzerland.

E-mail address: [benoit.ferrari@centrecotox.ch](mailto:benoit.ferrari@centrecotox.ch)

## **LC-MS/MS method**

LC-MS/MS analyses were performed using a 1290 Infinity HPLC system coupled to a 6490 Mass Spectrometer (Triple quadrupole), both from Agilent Technologies (Massy, France).

Analytes were separated using an Agilent Zorbax Eclipse Plus C18 column (2.1 x 100 mm; dp = 1.8  $\mu\text{m}$ ). Injection volume was set at 5  $\mu\text{L}$  and mobile phase solvents were 0.02 M ammonium acetate in MQ water (A) and 0.02 M ammonium acetate in MQ water / acetonitrile (5:95, v/v) (B) in an initial ratio (A:B) of 80:20. Note that, according to the manufacturer instructions, an Agilent Zorbax SB C18 column (2.1 x 300 mm; dp = 3.5  $\mu\text{m}$ ) was installed between the outlet of pump A and the mixing chamber, so as to trap PFASs. A 90/10 ACN/Milli-Q water mixture was used to rinse the injection needle prior to injection.

Separation was achieved at 35°C using a flow rate of 0.5  $\text{mL}^{-1}$  with the following (A:B) gradient: 80:20 for 0.6 min, 80:20 to 17.5:72.5% at 8 min, 0:100 at 9.5 min, held for 2 minutes. At 11.5 min, B was returned to 80 % within 0.5 min and the system was equilibrated for 3.5 min.

The mass spectrometer was operated in electrospray negative ionisation mode (Jet Stream source) in Dynamic Multiple Reaction Monitoring (DMRM) using Agilent MassHunter software (Table S2). The DMRM algorithm automatically constructs acquisition time windows for multiple analytes throughout the LC-MS/MS run, based on the retention time of each analyte. It allows the instrument to acquire MRM data only during a stated retention time window, thus reducing the number of concurrent transitions. Nebulising gas temperature, flow and pressure were set at 320°C, 8 L

min<sup>-1</sup> and 60 psi, respectively. Sheath Gas Temperature was set at 350 °C and sheath gas flow was 12 L.min<sup>-1</sup>.

Identification of analytes was performed by comparing retention times with those determined with standard solutions. Furthermore, for each analyte, the ratio of the quantification transition area to the confirmation transition area was compared to that obtained with an authentic standard (margin applied : 25 %). Quantification was carried out by calculating the response factor of each analyte relative to its corresponding IS and concentrations were determined using a least-square linear regression (1/x weighing) analysis of the peak area ratio versus the concentration ratio.

## **Chemicals**

Standard PFAS solutions were obtained from Wellington Laboratories (via BCP Instruments, Irigny, France). PFC-MXA contained perfluoro-n-butanoic acid (PFBA), perfluoro-n-pentanoic acid (PFPA), perfluoro-n-hexanoic acid (PFHxA), perfluoro-n-heptanoic acid (PFHpA), perfluoro-n-octanoic acid (PFOA), perfluoro-n-nonanoic acid (PFNA), perfluoro-n-decanoic acid (PFDA), perfluoro-n-undecanoic acid (PFUnA), perfluoro-n-dodecanoic acid (PFDoA), perfluoro-n-tridecanoic acid (PFTrDA), and perfluoro-n-tetradecanoic acid (PFTeDA), each at 2 ng.µL<sup>-1</sup> in methanol (MeOH). PFS-MXA contained perfluoro-1-butanefluorobutanesulfonate (PFBS) potassium salt, perfluoro-1-hexanesulfonate (PFHxS) sodium salt, perfluoro-1-heptanesulfonate (PFHpS) sodium salt, n-perfluoro-1-octanesulfonate (PFOS) sodium salt and perfluoro-1-decanesulfonate (PFDS) sodium salt, N-Ethyl perfluorooctane sulfonamide (EtFOSA), N-Methyl perfluorooctane sulfonamide (MeFOSA), perfluorooctane sulfonamide (FOSA), N-Ethyl perfluorooctane sulfonamidoacetic acid (EtFOSAA), N-

Methyl perfluorooctane sulfonamidoacetic acid (MeFOSAA), and 6:2 Fluorotelomer sulfonic acid (6:2 FTSA), each at 2 ng.µL<sup>-1</sup> in methanol (MeOH). A working solution containing all analytes, each at approximately 0.1 ng.µL<sup>-1</sup>, was prepared in MeOH and stored at -18°C.

<sup>13</sup>C-labeled PFHxA, PFOA, PFDA, PFOS, and FOSA (each at 50 ng.µL<sup>-1</sup> in MeOH), <sup>2</sup>H (or <sup>D</sup>)-labeled MeFOSA, and EtFOSA were supplied by Wellington Laboratories and used as internal standards (ISs). A working solution was prepared in MeOH, containing each IS at 0.1 ng.µL<sup>-1</sup> (Table S1).

LC/MS-grade MeOH and acetonitrile (ACN) were purchased from J.T.Baker (France). Sodium acetate buffer (99%, ACS Reagent), ammonium hydroxide (28-30% in water), 0.2µm nylon centrifuge tube filters, and ENVI-Carb cartridges (6cc, 250 mg) were obtained from Sigma-Aldrich (St Quentin Fallavier, France), whereas Strata XAW (6cc, 200 mg) were purchased from (Le Pecq, France). Nitrogen (99%) was supplied by Air Liquide (Paris, France). Ultra-pure water was obtained by using an Elix 10 purification system fitted with an EDS pack (Millipore, Guyancourt, France).

### **Sediments characteristics**

The sediment showed a water content of 53.8%, a nitrogen content of 0.2%, a carbonate content of 25.9%, and an organic carbon content of 6.4%. The particles sizes distributions found to be 10% clay- silt (< 3.56 ± 0.06 µm) , 40% silt (3.56 ± 0.06 µm – 19.16 ± 0.44 µm), and 50% of silt - very fine sand (>19.16 ± 0.44 µm).

**Table S1.** Name of perfluorinated compounds, acronyms, carbon number and associated internal standards (ISs).

Compounds	Acronyms	Carbon number	Fluorinated carbon number	ISs	ISs acronyms
Perfluorobutanoic acid	PFBA	4	3	[1,2- <sup>13</sup> C <sub>2</sub> ] PFHxA	MPFHxA
Perfluoropentanoic acid	PFPA	5	4	[1,2- <sup>13</sup> C <sub>2</sub> ] PFHxA	MPFHxA
Perfluorohexanoic acid	PFHxA	6	5	[1,2- <sup>13</sup> C <sub>2</sub> ] PFHxA	MPFHxA
Perfluoroheptanoic acid	PFHpA	7	6	[1,2,3,4- <sup>13</sup> C <sub>4</sub> ] PFOA	MPFOA
Perfluorooctanoic acid	PFOA	8	7	[1,2,3,4- <sup>13</sup> C <sub>4</sub> ] PFOA	MPFOA
Perfluorononanoic acid	PFNA	9	8	[1,2,3,4- <sup>13</sup> C <sub>4</sub> ] PFOA	MPFOA
Perfluorodecanoic acid	PFDA	10	9	[1,2- <sup>13</sup> C <sub>2</sub> ] PFDA	MPFDA
Perfluoroundecanoic acid	PFUnA	11	10	[1,2- <sup>13</sup> C <sub>2</sub> ] PFDA	MPFDA
Perfluorododecanoic acid	PFDoA	12	11	[1,2- <sup>13</sup> C <sub>2</sub> ] PFDA	MPFDA
Perfluorotridecanoic acid	PFTTrDA	13	12	[1,2- <sup>13</sup> C <sub>2</sub> ] PFDA	MPFDA
Perfluorotetradecanoic acid	PFTTeDA	14	13	[1,2- <sup>13</sup> C <sub>2</sub> ] PFDA	MPFDA
Perfluorobutane sulfonic acid	PFBS	4	3	[1,2,3,4- <sup>13</sup> C <sub>4</sub> ] PFOS	MPFOS
Perfluorohexane sulfonic acid	PFHxS	6	5	[1,2,3,4- <sup>13</sup> C <sub>4</sub> ] PFOS	MPFOS
Perfluoroheptane sulfonic acid	PFHpS	7	6	[1,2,3,4- <sup>13</sup> C <sub>4</sub> ] PFOS	MPFOS
Perfluorooctane sulfonic acid	PFOS	8	7	[1,2,3,4- <sup>13</sup> C <sub>4</sub> ] PFOS	MPFOS
Perfluorodecane sulfonic acid	PFDS	10	9	[1,2,3,4- <sup>13</sup> C <sub>4</sub> ] PFOS	MPFOS
N-Ethyl perfluorooctane sulfonamide	EtFOSA	8	7	d <sub>5</sub> -N-EtFOSA	MFOSA
N-Methyl perfluorooctane sulfonamide	MeFOSA	8	7	d <sub>3</sub> -N-MeFOSA	d-N-MeFOSA
Perfluorooctane sulfonamide	FOSA	8	7	[ <sup>13</sup> C <sub>8</sub> ] FOSA	d-N-FOSA
N-Ethyl perfluorooctane sulfonamidoacetic acid	EtFOSAA	8	7	d <sub>5</sub> -N-EtFOSA	d-N-EtFOSA
N-Methyl perfluorooctane sulfonamidoacetic acid	MeFOSAA	8	7	d <sub>3</sub> -N-MeFOSA	d-N-MeFOSA
6:2 Fluorotelomer sulfonic acid	6:2 FTSA	8	6	Sodium [1,2,3,4- <sup>13</sup> C <sub>4</sub> ] PFOS	MPFOS

**Table S2.** Acquisition parameters for PFAS analyses

Compound Name	Retention Time (min)	Collision Energy (V)	Fragmentor (V)	Precursor Ion (m/z)	Product Ion (m/z)
PFBA	1.1	4	64	213	168.9
PFPA	2.3	2	67	263	218.9
<sup>13</sup> C-PFHxA	3.32	2	72	314.9	269.9
PFHxA	3.32	2	72	313	268.9
PFHxA	3.13	12	72	313	118.9
PFBS	3.41	28	131	298.9	98.9
PFBS	3.41	36	131	298.9	79.9
PFHpA	4.13	2	72	363	318.9
PFHpA	4.13	8	72	363	168.9
6:2 FTSA	4.47	20	84	427	406.8
6:2 FTSA	4.47	48	84	427	79.9
<sup>13</sup> C-PFOA	4.84	4	82	416.9	371.9
PFOA	4.84	4	82	413	368.9
PFOA	4.84	12	82	413	168.9
PFHxS	5.11	40	151	398.9	98.9
PFHxS	5.11	52	151	398.9	79.9
PFNA	5.49	4	77	463	418.9
PFNA	5.49	12	77	463	218.9
PFHpS	5.81	44	168	448.9	98.9
PFHpS	5.81	56	168	448.9	79.9
<sup>13</sup> C-PFDA	6.1	4	88	514.9	469.9
PFDA	6.1	4	88	513	468.9
PFDA	6.1	16	88	513	268.9
d-N-MeFOSAA	6.14	16	119	573	418.8
MeFOSAA	6.14	16	119	570	511.8
MeFOSAA	6.14	16	119	570	418.8
PFOS	6.2	44	188	498.9	98.9
PFOS	6.2	60	188	498.9	79.9
<sup>13</sup> C-PFOS	6.23	60	188	502.9	79.9
EtFOSAA	6.42	16	129	584	525.8
EtFOSAA	6.42	16	129	584	418.8
PFUnA	6.71	4	88	563	518.9
PFUnA	6.71	16	88	563	268.9
PFDoA	7.29	4	93	613	568.9
PFDoA	7.29	24	93	613	168.9
PFDS	7.67	56	220	598.9	98.9
PFDS	7.67	76	220	598.9	79.9
PFTrDA	7.87	4	94	663	618.9
PFTrDA	7.87	13	99	663	369
<sup>13</sup> C-FOSA	7.99	36	151	505.9	77.9
FOSA	7.99	36	151	497.9	77.9
PFTeDA	8.45	8	99	712.9	668.8
PFTeDA	8.45	13	99	712.9	419
d-N-MeFOSA	9.37	28	126	514.9	168.9
MeFOSA	9.37	24	126	512	218.9
MeFOSA	9.37	28	126	512	168.9
d-N-EtFOSA	9.65	28	146	531	168.9
EtFOSA	9.65	24	146	526	218.9
EtFOSA	9.65	28	146	526	168.9

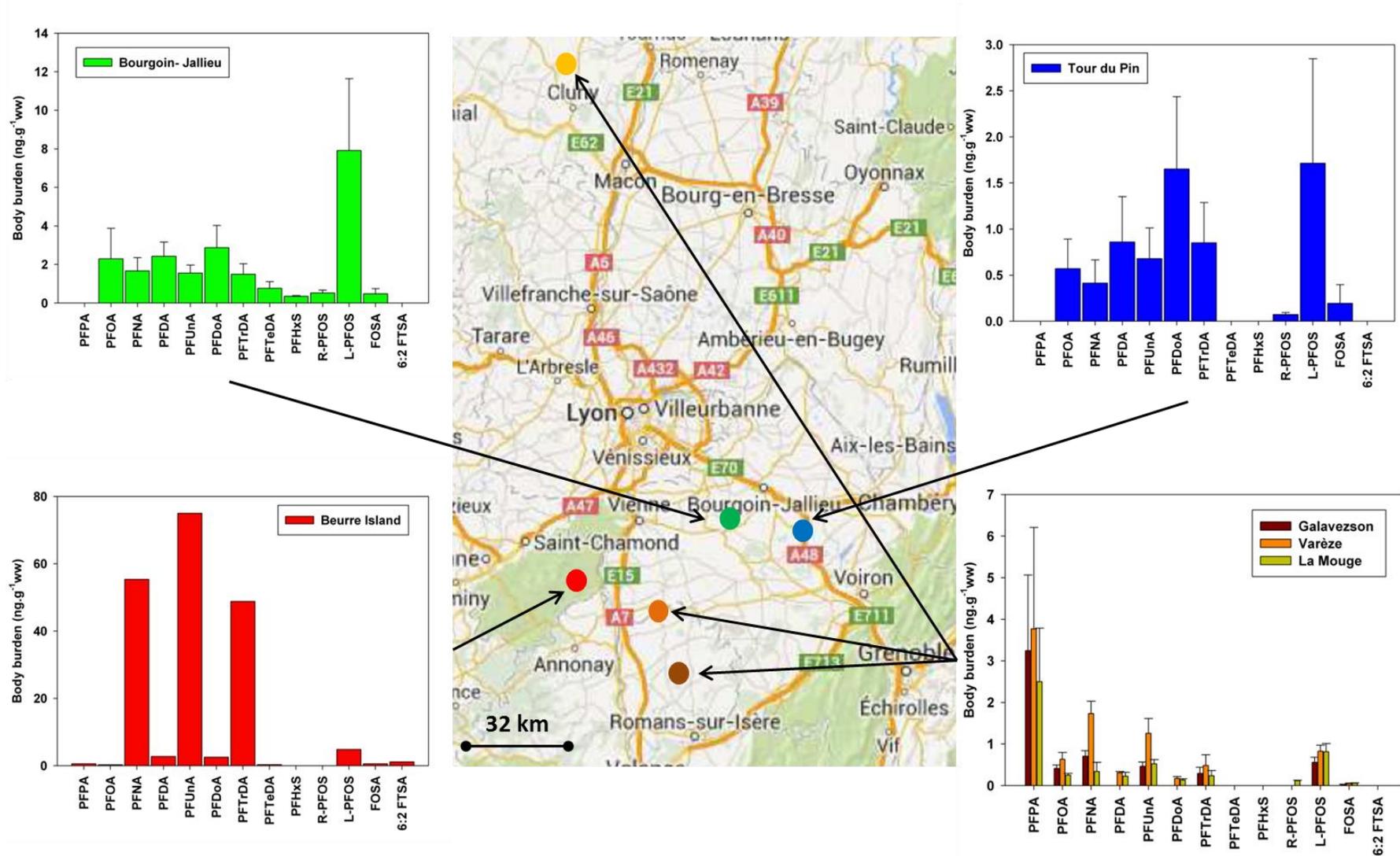
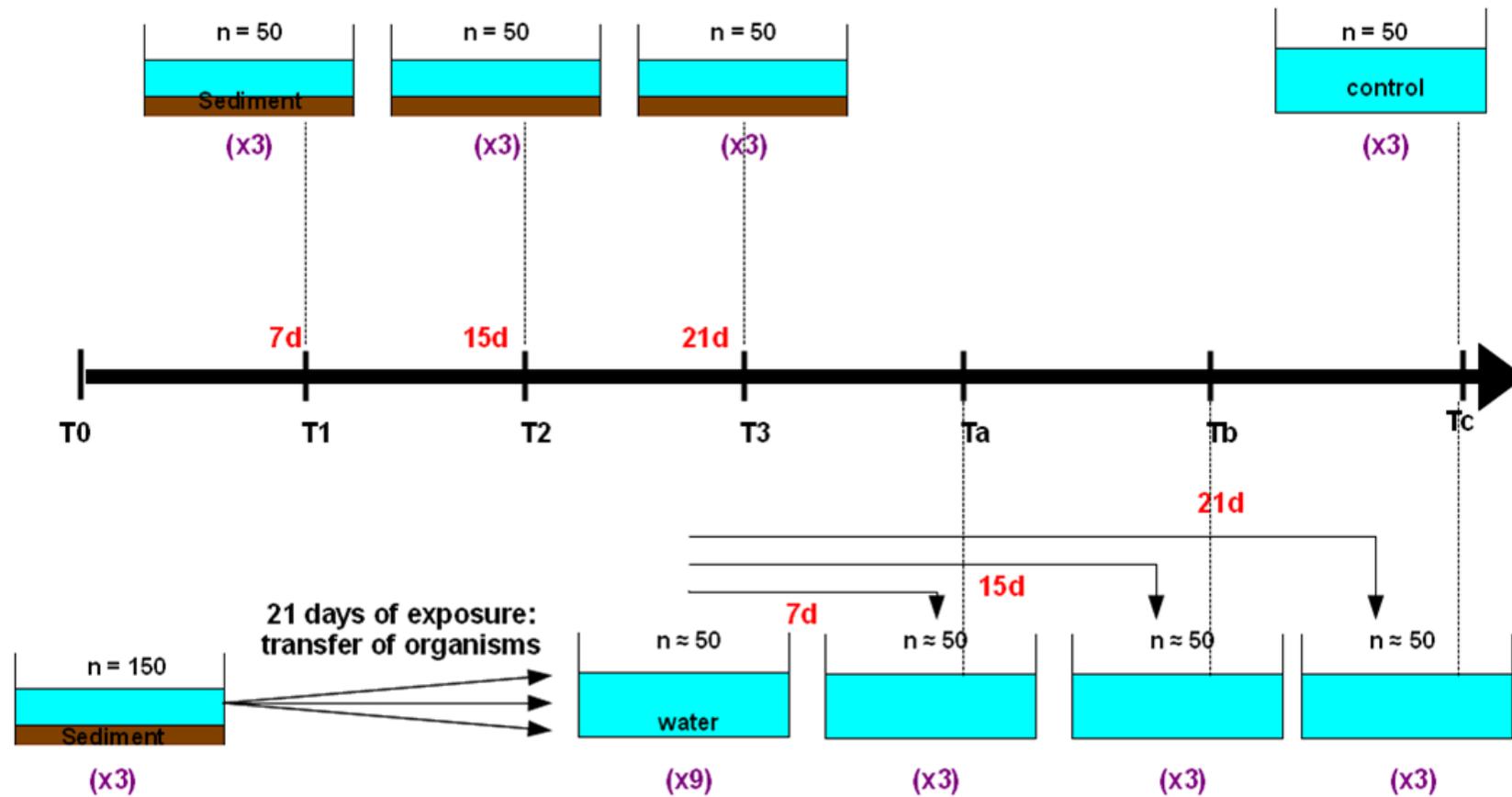


Figure S21 : Cartography of PFASs gammarid contamination

E1: Accumulation kineticsE2: Elimination kinetics

**Figure S22:** Experimental design of gammarid exposure.

**Table S3.** PFAS recovery rates (%) from spiked samples, with standard deviation (n=3).

	<b>Fish (Brown trout)</b>	<b>Sand</b>	<b>overlying water</b>	<b>pore water</b>
Spike level	0.7 - 1.8 ng.g <sup>-1</sup> ww	0.3 - 0.8 ng.g <sup>-1</sup> dw	0.9 - 2.3 ng.L <sup>-1</sup>	6.7 - 17.3 ng.L <sup>-1</sup>
<b>PFBA</b>	108.0 ± 19.1	111.6 ± 32.8	83.3 ± 0.5	117.7 ± 4.7
<b>PFPA</b>	149.5 ± 14.3	105.4 ± 22.3	90.4 ± 1.9	101.3 ± 2.5
<b>PFHxA</b>	121.6 ± 16.2	92.1 ± 12.8	80.1 ± 5.8	79.1 ± 1.8
<b>PFHpA</b>	94.9 ± 9.8	82.9 ± 10.3	88.6 ± 4.6	87.0 ± 5.4
<b>PFOA</b>	104.6 ± 10.1	92.8 ± 9.4	90.8 ± 6.1	95.0 ± 6.0
<b>PFNA</b>	113.2 ± 12.1	89.9 ± 8.9	93.6 ± 4.0	100.3 ± 5.4
<b>PFDA</b>	104.7 ± 6.0	105.0 ± 14.5	72.1 ± 1.6	78.9 ± 7.0
<b>PFUnA</b>	111.1 ± 10.4	114.7 ± 22.0	69.9 ± 6.8	66.7 ± 9.6
<b>PFDoA</b>	111.5 ± 14.2	115.7 ± 13.8	63.6 ± 11.4	62.7 ± 10.0
<b>PFTTrDA</b>	110.7 ± 17.3	106.8 ± 13.9	141.0 ± 23.9	46.8 ± 4.7
<b>PFTeDA</b>	81.1 ± 22.7	97.7 ± 14.2	157.8 ± 33.4	70.6 ± 11.0
<b>PFBS</b>	118.0 ± 14.6	131.9 ± 33.3	113.9 ± 4.0	116.7 ± 2.2
<b>PFHxS</b>	115.5 ± 17.7	84.8 ± 12.0	106.5 ± 11.4	103.4 ± 3.5
<b>PFHpS</b>	122.5 ± 15.5	91.8 ± 14.6	97.2 ± 8.6	92.5 ± 2.7
<b>PFOS</b>	119.4 ± 16.1	110.4 ± 10.7	77.8 ± 3.4	85.8 ± 5.9
<b>PFDS</b>	96.1 ± 9.5	100.4 ± 19.8	66.7 ± 4.7	57.4 ± 5.4
<b>6:2 FTSA</b>	105.2 ± 14.5	87.5 ± 16.1	111.6 ± 3.7	128.6 ± 5.5
<b>MeFOSAA</b>	108.6 ± 11.5	92.8 ± 12.0	64.8 ± 5.2	75.0 ± 7.1
<b>EtFOSAA</b>	82.2 ± 13.9	108.7 ± 12.8	19.8 ± 4.7	65.9 ± 6.1
<b>FOSA</b>	100.9 ± 11.6	73.0 ± 9.8	66.3 ± 1.9	80.2 ± 1.3
<b>MeFOSA</b>	81.5 ± 6.1	76.7 ± 6.3	35.8 ± 2.0	38.3 ± 6.6
<b>EtFOSA</b>	98.9 ± 15.4	79.2 ± 9.1	36.1 ± 4.2	38.8 ± 5.4

**Table S4.** PFAS detection limits (LDs) and quantification limits (LQs) in different matrix: grey cases corresponding at LDs and LQs calculated from blanks, white cases corresponding at LDs and LQs calculated with ratio signal/noise from spiked samples (S/N = 3 and 9, respectively). Analyses were performed on 0.8 L overlying water, 23.7 mL pore water, 1.2 g sediment (dw) and 0.6 g gammarids (ww) (mean values).

	LDs (ng.g-1 ou .L-1)				LQs (ng.g-1 ou .L-1)			
	Overlying water	Pore water	Sediment/leave	Gammarid	Overlying water	Pore water	Sediment/leave	Gammarid
PFBA	0.206	0.396	0.036	0.042	0.619	1.189	0.108	0.141
PFPA	0.049	0.252	0.013	0.066	0.162	0.841	0.039	0.198
PFHxA	0.092	0.268	0.018	0.187	0.308	0.892	0.059	0.562
PFHpA	0.052	0.311	0.014	0.107	0.173	1.038	0.043	0.321
PFOA	0.033	0.235	0.013	0.053	0.100	0.705	0.039	0.158
PFNA	0.030	0.445	0.016	0.030	0.089	1.483	0.048	0.090
PFDA	0.027	0.305	0.012	0.028	0.091	1.017	0.037	0.084
PFUnA	0.050	0.330	0.010	0.014	0.168	0.990	0.029	0.041
PFDoA	0.099	0.478	0.010	0.025	0.296	1.435	0.029	0.075
PFTTrDA	0.030	0.309	0.009	0.023	0.089	0.927	0.026	0.070
PFTeDA	0.043	0.256	0.013	0.046	0.129	0.769	0.038	0.139
PFBS	0.026	0.161	0.0108	0.024	0.077	0.537	0.032	0.072
PFHxS	0.011	0.094	0.006	0.035	0.032	0.281	0.017	0.104
PFHpS	0.014	0.093	0.009	0.007	0.041	0.278	0.026	0.021
PFOS	0.012	0.119	0.002	0.009	0.040	0.358	0.006	0.030
PFDS	0.007	0.102	0.002	0.017	0.021	0.307	0.007	0.051
FOSA	0.028	0.115	0.0010	0.006	0.092	0.382	0.0030	0.019
MeFOSA	0.005	0.141	0.004	0.147	0.016	0.423	0.012	0.441
EtFOSA	0.024	0.219	0.005	0.022	0.073	0.658	0.014	0.067
MeFOSAA	0.013	0.011	0.003	0.012	0.038	0.034	0.009	0.035
EtFOSAA	0.034	0.113	0.005	0.024	0.102	0.340	0.014	0.071
6:2 FTSA	0.023	0.013	0.005	0.012	0.070	0.039	0.015	0.037

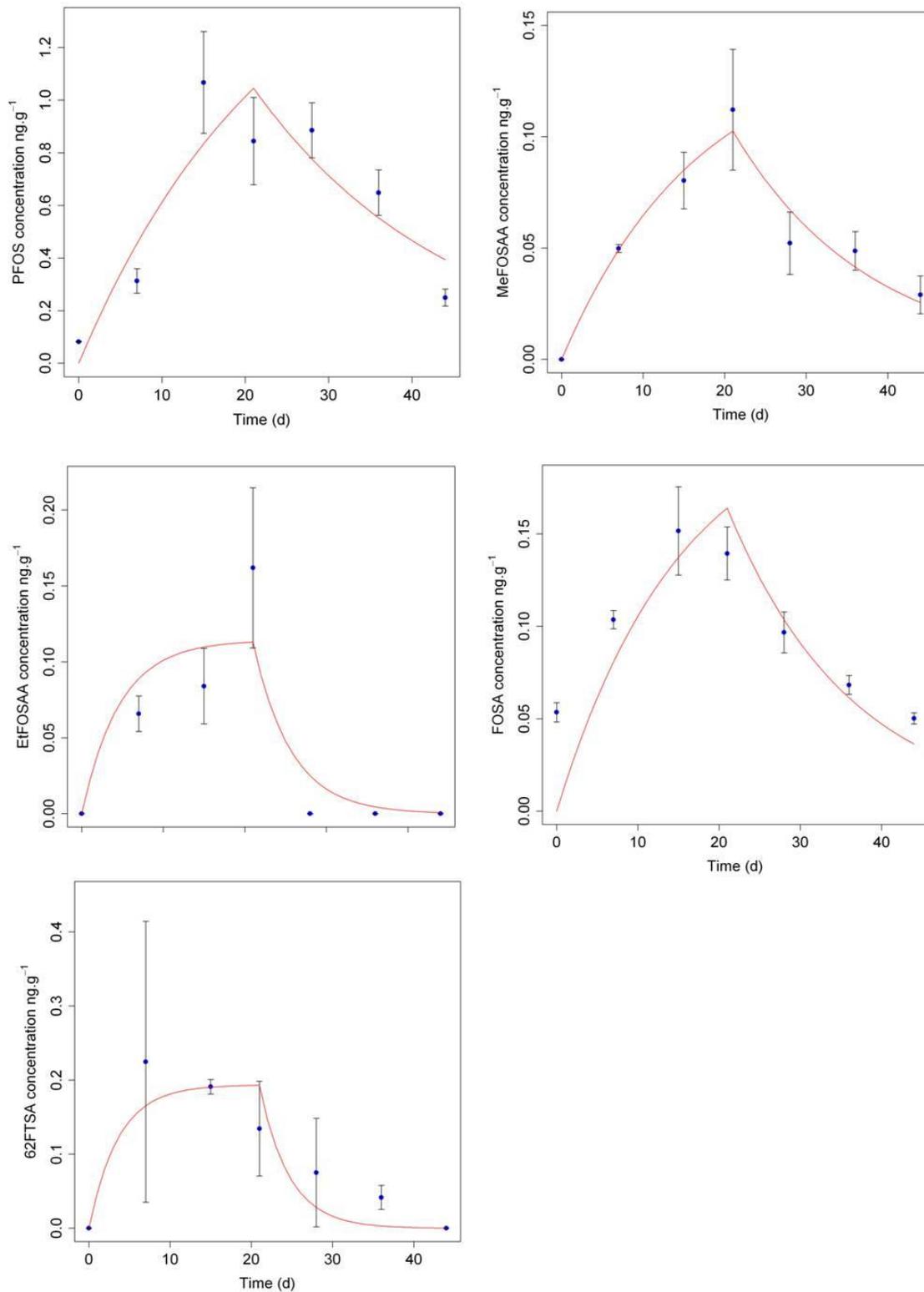
**Table S5.** Concentrations of PFASs (ng.g<sup>-1</sup> ww) measured in SRM 1947 Lake Michigan Fish Tissue, NIST method 1 and 2 are described in Reiner et al. (2012).

Compound	NIST method 1	NIST method 2	present study
	(n = 24)	(n = 12)	(n = 3)
PFBA	<0.861	<2.83	<0.200
PFPA	<0.441	<0.388	<0.060
PFHxA	<0.917	<1.04	<0.007
PFHpA	<0.0689	<0.0676	<0.009
PFOA	<0.297	<0.676	<0.027
PFNA	0.179 ± 0.013	<0.765	0.159 ± 0.023
PFDA	0.282 ± 0.062	<0.731	<0.004
PFUnA	0.212 ± 0.024	<0.128	0.149 ± 0.021
PFDoA	<0.137	<0.156	<0.002
PFTTrDA	0.154 ± 0.020	<0.738	<0.001
PFTeDA	0.198 ± 0.069	<0.108	<0.002
PFBS	<0.194	<1.71	<0.006
PFHxS	<0.0490	<0.0556	n.d
PFHpS	NM	NM	0.018 ± 0.002
PFOS	6.17 ± 0.060	5.66 ± 0.28	3.974 ± 0.314
PFDS	NM	NM	0.040 ± 0.005
FOSA	<0.151	<0.171	0.162 ± 0.016
MeFOSAA	NM	NM	0.064 ± 0.023
EtFOSAA	NM	NM	<0.004
MeFOSA	NM	NM	<0.006
EtFOSA	NM	NM	n.d
6:2 FTSA	NM	NM	<0.001

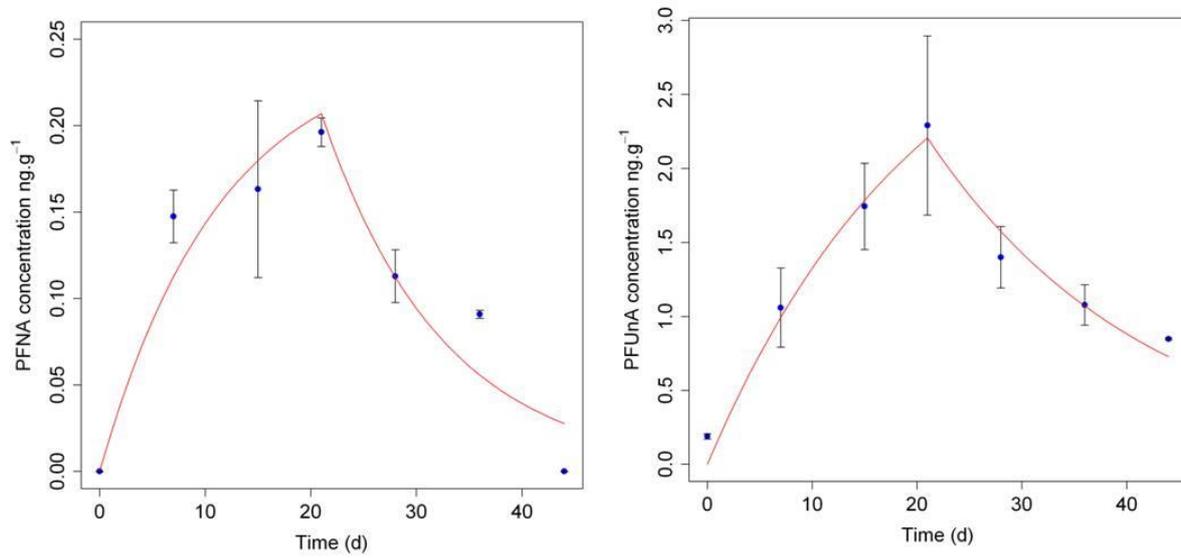
**Table S6.** PFAS concentrations in abiotic compartments during the accumulation kinetics, mi: minimal concentration, max: maximal concentration; bold numbers contain values <LQ ou LD and grey cases correspond to compounds not detected.

Matrix	Sediment (ng.g <sup>-1</sup> <sub>ww</sub> )			Overlying water (ng.L <sup>-1</sup> )			Pore water (ng.L <sup>-1</sup> )			Leaves (ng.g <sup>-1</sup> <sub>dw</sub> )		
	min	max	mean ± sd	min	max	mean ± sd	min	max	mean ± sd	min	max	mean ± sd
PFBA				1.334	2.017	1.590 ± 0.372						
PFPA	<LQ	<LQ	-	0.941	1.221	1.099 ± 0.143	1.247	2.145	1.787 ± 0.476	0.063	0.076	0.070 ± 0.007
PFHxA	0.093	0.252	0.149 ± 0.062	2.335	2.791	2.591 ± 0.233	81.336	116.060	97.950 ± 17.410	<LQ	0.041	<b>0.037 ± 0.006</b>
PFHpA				0.323	0.756	0.522 ± 0.219	<LQ	1.183	<b>0.953 ± 0.376</b>			
PFOA	0.044	0.085	0.062 ± 0.015	0.597	1.523	1.125 ± 0.476	3.889	4.550	4.206 ± 0.331	0.043	0.075	0.057 ± 0.017
PFNA	0.198	0.266	0.228 ± 0.025	<LQ	0.571	<b>0.341 ± 0.270</b>	5.556	9.331	7.100 ± 1.979	<LQ	0.132	<b>0.072 ± 0.055</b>
PFDA	0.117	0.565	0.288 ± 0.182	<LD	0.338	0.266 ± 0.102	<LQ	<LQ	-	<LQ	<LQ	-
PFUnA	1.044	1.440	1.186 ± 0.151	<LQ	0.738	<b>0.414 ± 0.327</b>	4.951	6.797	6.046 ± 0.969	0.295	0.917	0.533 ± 0.335
PFDoA	0.166	0.438	0.298 ± 0.108							<LD	0.080	<b>0.047 ± 0.039</b>
PFTTrDA	1.961	2.234	2.092 ± 0.097	<LD	2.619	<b>0.925 ± 1.468</b>				0.241	0.659	0.400 ± 0.226
PFTeDA	0.098	0.239	0.154 ± 0.052									
PFBS				0.303	1.665	0.773 ± 0.773	<LQ	<LQ	-			
PFHxS				0.264	0.860	0.636 ± 0.325	1.251	1.353	1.309 ± 0.052	<LQ	0.034	<b>0.022 ± 0.013</b>
PFHpS				<LQ	<LQ	-						
R-PFOS	0.057	0.065	0.063 ± 0.003	0.280	0.784	0.559 ± 0.257	0.919	1.562	1.311 ± 0.344	0.100	0.187	0.129 ± 0.050
L-PFOS	0.330	0.411	0.372 ± 0.029	0.343	0.492	0.407 ± 0.077	3.540	3.843	3.686 ± 0.152	0.197	0.861	0.631 ± 0.376
PFDS												
MeFOSAA	0.055	0.078	0.067 ± 0.009				0.292	0.510	0.437 ± 0.126	0.011	0.039	0.021 ± 0.016
EtFOSAA	0.436	0.531	0.463 ± 0.040							0.048	0.227	0.116 ± 0.097
FOSA	0.060	0.071	0.066 ± 0.004				<LQ	<LQ	-	<LQ	0.020	<b>0.010 ± 0.009</b>
MeFOSA	<LQ	<LQ	-									
EtFOSA	<LQ	<LQ	-									
62 FTS	0.163	0.283	0.220 ± 0.052	<LQ	<LQ	-				<LQ	<LQ	-

**Figure S3.** Bioaccumulation model of PFOS, 6:2 FTSA, MeFOSAA, EtFOSAA and FOSA, blue points represent the observed data, errors bars the standard deviation and red line the simulated data.



**Figure S4.** Bioaccumulation model of PFCAs (PFNA and PFUnA) blues points represent the observed data, errors bars the standard deviation and red line the simulated data.





**Table S7.** PFASs concentrations in sediments used for the chironomids (Bertin et al., 2014a; Bertin et al., 2014b) and for the gammarids experiments from the same study site in ng.g<sup>-1</sup>dw

	PFNA	PFUnA	PFDoA	PFTTrDA	PFTeDA	PFOS	MeFOAA	EtFOSAA	FOSA	6:2 FTSA
Sediment used in Bertin et al., 2014b	0.245 ± 0.050	1.698 ± 0.216	1.538 ± 0.626	2.538 ± 0.226	0.990 ± 0.576	0.263 ± 0.022	<0.028	<0.061	0.028 ± 0.010	0.278 ± 0.080
Sediment used in Bertin et al., 2014a	0.284 ± 0.045	0.848 ± 0.113	0.381 ± 0.092	1.642 ± 0.034	0.291 ± 0.069	0.485 ± 0.076	<0.003	<0.011	0.034 ± 0.008	0.159 ± 0.044
Sediment used in present study	0.228 ± 0.028	1.186 ± 0.174	0.298 ± 0.125	2.092 ± 0.112	0.154 ± 0.060	0.372 ± 0.033	0.067 ± 0.011	0.463 ± 0.046	0.066 ± 0.005	0.220 ± 0.060



## References

Bertin, D., Ferrari, B.J.D., Labadie, P., Sapin, A., Beaudoin, R., Péry, A., Garric, J., Budzinski, H., Babut, M., 2014a. Accumulation and depuration of perfluoroalkyl compounds (PFASs) by midge larvae (*Chironomus riparius*, Diptera, Chironomidae) exposed to contaminated sediments. in prep.

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

Reiner, J., O'Connell, S., Butt, C., Mabury, S., Small, J., Silva, A., Muir, D.G., Delinsky, A., Strynar, M., Lindstrom, A., Reagen, W., Malinsky, M., Schäfer, S., Kwadijk, C.A.F., Schantz, M., Keller, J., 2012. Determination of perfluorinated alkyl acid concentrations in biological standard reference materials. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 404, 2683-2692.

---

#### *Annexe 4 : Effet de la température sur l'accumulation des PFASs chez le chironome*

##### Introduction

La température fait partie des facteurs confondant pouvant influencer la toxicité et l'accumulation des contaminants par les organismes. En effet de nombreuses études ont montré cette état de fait notamment en ce qui concerne l'effet sur la contamination métallique (Bervoets et al., 1996; Heugens et al., 2003; Jeyasingham and Ling, 2000) et aussi sur la contamination par des composés organiques (Gossiaux et al., 1996; Howe et al., 1994; Lydy et al., 1999; Lydy et al., 1990). Afin de mieux comprendre l'effet de la température sur l'accumulation des PFASs par les chironomes à partir de sédiment naturel homogénéisé, des organismes ont été exposés à 3 températures différentes : 12, 17 et 21°C.

##### Matériel et Méthode

###### *1) Prélèvement des sédiments et mise en système*

50 litres de sédiment de surface ont été collecté en Août 2012 sur le site de l'île du Beurre avec une benne Van-Veen. Les sédiments ont été tamisé à 2 mm, rassemblés dans un bidon en polypropylène (PP) et stocké à 4°C. Les caractéristiques physico-chimiques des sédiments ont été mesurées (teneur en eau, pertes au feu, teneur en CaCO<sub>3</sub>, teneur en azote et distribution granulométrique des particules).

Cinq aquariums tests ont été préparés avec 4L de sédiment, préalablement homogénéisé, et avec 15L d'eau (eau souterraine mélangée à de l'eau osmosée afin d'avoir une conductivité à 300 µS/cm). Cinq aquariums témoins ont été préparés de la même manière avec de la silice. Les aquariums ont été préparés une semaine avant l'introduction des organismes. Deux aquariums tests et deux aquariums témoins ont été placés à 12°C, tandis que trois aquariums tests et trois aquarium témoins ont été placés à 17°C.

###### *2) Exposition des organismes*

Les chironomes sont exposés à deux températures différentes : 12 et 17°C. Pour les organismes exposés à 12°C, avant leur introduction dans les systèmes d'expositions, ces derniers ont été acclimatés à 12°C pendant 24h. 2000 larves de stade 4 (7 jours post-éclosion) ont été ajoutées dans les aquariums tests (400 larves par aquarium) ainsi que 2000 larves de

stade 4 (7 jours post-éclosion) dans les aquariums témoins (400 larves par aquariums). L'eau de surface est renouvelée 4 fois par jour et la photopériode est de 16h :8h, jour : nuit respectivement. Les paramètres garantissant une bonne qualité de l'eau (ammonium  $\text{NH}_4^+$ , Nitrite  $\text{NO}_2^-$ , pH, température, teneur en oxygène dissous et conductivité) sont mesurés en début et fin d'exposition. Les organismes sont nourris ad libitum avec 1 mg de Tetramin® par larve et par jour. La croissance des chironomes étant étroitement liée à la température du milieu (augmentation de la vitesse de croissance avec l'augmentation de la température), les organismes ont été sacrifiés lorsqu'une taille comprise entre 10 et 11 mm a été atteinte. Ceci est réalisé dans le but de gommer l'effet de la croissance et de pouvoir comparer ces données entre elles et avec celles recueillies lors de l'exposition des chironomes à 21°C (Publication 1, Chapitre 3). Ainsi les organismes exposés à 17°C ont été sacrifiés au bout de 5 jours tandis que ceux exposés à 12°C au bout de 6 jours. Les PFASs sont alors dosés dans les organismes à T0 (avant l'expérimentation), à Tfinal (à la fin de l'expérimentation) et dans les témoins (Te). De même pour le suivi de la croissance des organismes au cours du test, ils ont été photographiés par lots de 10 (x4) et pesés à chaque temps d'échantillonnage. La taille a été mesurée à l'aide du logiciel J-Micro-Vision. Les PFASs ont également été mesurés dans les sédiments à T0 et à Tfinal ainsi que dans les témoins mais aussi dans les eaux de surface et interstitielle à Tfinal et dans les témoins.

### *3) Dosage des PFASs*

Les PFASs ont été extraits et purifiés de la même manière que dans la publication 1 (Chapitre 3) et dosés par LC-MS/MS.

## Résultats et discussion

### *1) Survie et croissance des organismes*

La survie des organismes tests et témoins pour les deux températures est supérieure à 70%. Les tailles des chironomes en fin d'expérimentation sont bien comprises entre 10 et 11 mm (essais 17°C :  $11.44 \pm 2.07$  mm, essais 12°C :  $10.07 \pm 1.67$  mm ; témoins 17°C :  $11.35 \pm 1.59$  mm, témoins 12°C :  $9.76 \pm 1.44$  mm).

### *2) Accumulation des PFASs en fonction de la température d'exposition*

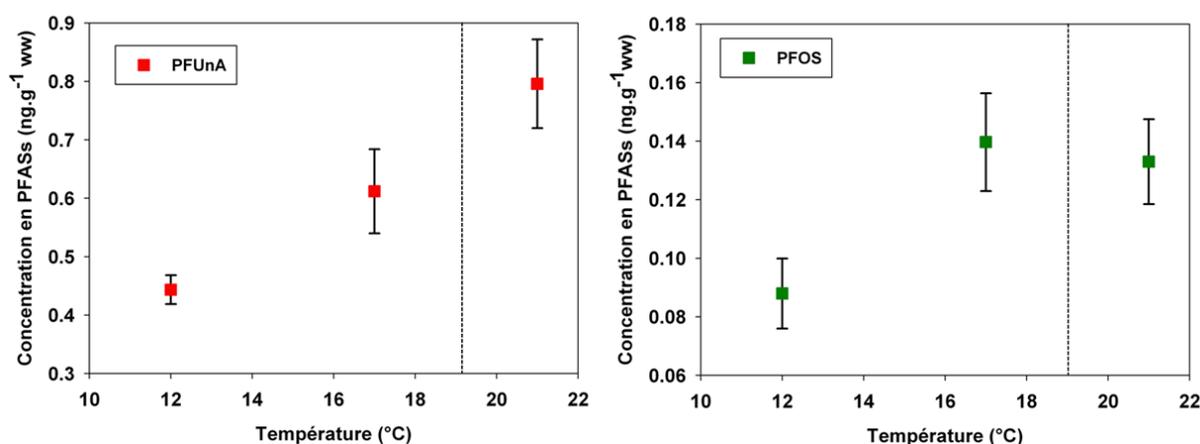
Afin de pouvoir comparer nos données avec une température supplémentaire (21°C), nous utilisons les données d'accumulation des PFASs par les chironomes en fin de stade 4 (4 jours d'exposition) exposés à du sédiment homogénéisé à 21°C (publication 1, chapitre 3).

Pour cela, nous comparons les concentrations d'expositions en PFASs dans les sédiments utilisés à 12, 17 et 21°C (Tableau 1). Les concentrations en PFUnA, PFDoA et en PFOS sont similaires, les concentrations en PFTrDA sont plus élevées dans le sédiment utilisé pour les expositions à 12 et 17°C et inversement pour celles en 6:2 FTSA. Les concentrations en PFUnA, PFDoA et PFOS accumulées par le chironome sont donc comparable entre elles pour les trois températures.

**Tableau 1: Concentrations en PFASs dans les sédiments d'exposition de 12 et 17°C (étude actuelle) et dans les sédiments d'exposition à 21°C (publication 1, chapitre 3)**

échantillons	PFUnA	PFDoA	PFTrDA	PFOS	6:2 FTSA
sédiment 12 et 17°C	1.018 ± 0.190	1.653 ± 0.822	3.247 ± 0.652	0.218 ± 0.024	<LD
sédiment 21°C	1.7 ± 0.22	1.538 ± 0.626	2.54 ± 0.23	0.26 ± 0.02	0.28 ± 0.08

Les résultats d'accumulation du PFUnA et du PFDoA par le chironome montrent une augmentation des concentrations avec l'augmentation de la température, par contre ce n'est pas le cas pour le PFOS, les concentrations augmentent bien entre 12 et 17 °C mais semblent se stabiliser entre 17 et 21°C (Figure 1). Pour le PFTrDA, malgré les concentrations d'exposition plus élevées dans les sédiments utilisés à 12 et 17°C, les concentrations accumulées par le chironome augmentent tout de même avec l'augmentation de la température (Tableau 2).



**Figure 1 : Accumulation du PFUnA et du PFOS par les chironomes en fonction de la température, les traits en pointillés indiquent l'utilisation de deux sédiments d'exposition différents entre 12, 17 °C et 21°C.**

**Tableau 2 : Concentration en PFASs accumulées par le chironome à 12, 17 et 21°C, l'astérisque indique que le sédiment d'exposition à 21°C (données utilisées dans une publication 1, chapitre 3) est différent de celui utilisé à 12 et 17°C (étude actuelle).**

échantillons	PFUnA	PFDoA	PFTrDA	PFOS	6:2 FTSA
chironome à 12°C	0.44 ± 0.03	0.06 ± 0.01	1.15 ± 0.11	0.09 ± 0.01	0.22 ± 0.13
chironome à 17°C	0.61 ± 0.07	0.09 ± 0.02	1.33 ± 0.15	0.14 ± 0.02	0.23 ± 0.06
chironome à 21°C*	0.80 ± 0.08	0.14 ± 0.01	2.42 ± 0.17	0.13 ± 0.02	0.27 ± 0.02

### Conclusion

Ces résultats préliminaires nous indiquent une potentielle influence de la température sur l'accumulation des PFASs par le chironome, d'autres expérimentations seraient nécessaire pour confirmer ce premier résultat. Cependant l'observation d'une augmentation de l'accumulation corrélée avec l'augmentation de la température est en accord avec plusieurs études (Bervoets et al., 1996; Gossiaux et al., 1996; Heinonen et al., 2002).



## Résumé

L'accumulation de composés persistants dans le biote constitue des préoccupations écologiques, sanitaires et réglementaires. Parmi ces substances, les composés per- et poly-fluorés (PFASs) représentent un cas d'intérêt, en raison de leurs propriétés physico-chimiques particulières. Ces dernières rendent le comportement des PFASs dans l'environnement difficilement prévisibles, les outils actuels n'étant pas adaptés. Bien qu'il soit reconnu que ces composés sont persistants et s'accumulent dans le biote, de nombreuses inconnues subsistent, notamment sur les mécanismes de transferts sédiment-biote et des facteurs qui les contrôlent. Ce travail de thèse aborde le rôle du sédiment dans les processus d'accumulation, et plus particulièrement (a) les voies d'exposition du biote, (b) le rôle de la diversité biologique dans l'accumulation, par l'exposition de deux invertébrés benthiques (*Chironomus riparius* et *gammarus sp.*) à du sédiment naturel. La description des cinétiques d'accumulation et d'élimination des PFASs ont mis en évidence la biodisponibilité des composés pour les organismes. Ainsi, un modèle de bioaccumulation en accord avec la croissance des organismes et des particularités des composés a permis d'estimer des constantes d'accumulation et de dépuration ( $k_u$  et  $k_e$ ). Une représentation conceptuelle du transfert des composés, a permis de comprendre les principales voies de contamination des organismes. D'autre part, la variabilité interspécifique a été évaluée par la comparaison de la bioaccumulation et des voies de transfert des PFASs chez ces deux invertébrés. Ce travail de thèse aura alors permis d'ouvrir de nombreuses questions, notamment celles du rôle du biofilm et de la bioturbation des organismes dans la bioaccumulation et ouvre les perspectives quant à l'étude de la bioamplification.

**Mots clés :** sédiment – PFASs – bioaccumulation – invertébrés benthiques

## Abstract

The accumulation of persistent compounds in biota creates environmental, health and regulatory concerns. Among these substances, the poly-fluorinated compounds (PFASs) represents a case of interest due to their specific physicochemical properties. So the PFAs behavior in the environment is difficult to predict as the existing tools are not suitable. Although it is recognized that these compounds are persistent and accumulate in biota, many knowledge gaps remain, including the mechanisms of sediment-biota transfer and the factors that control them. This thesis examines the role of sediment in the accumulation process, especially (a) exposure routes of biota, (b) role of biodiversity in the accumulation, by exposing two benthic invertebrates (*Chironomus riparius* and *Gammarus sp.*) to natural sediment. The description of PFASs kinetics of accumulation and elimination have showed the biodisponibility of the compounds to organisms. Thus, a bioaccumulation model including the organisms growth and the specificity of the compounds was used to estimate the accumulation and depuration rate constants ( $k_u$  and  $k_e$ ). A conceptual representation of compounds transfer allowed us to understand the major routes for organisms contamination. Moreover, the interspecific variability has been assessed by comparing the PFASs bioaccumulation and transfer pathways for both invertebrates. This thesis have helped to open up many issues, and especially the influence of both biofilm and organism bioturbation on PFASs bioaccumulation. Moreover some new perspectives on the study of biomagnification were opened.

**Key words:** sediment – PFASs – bioaccumulation – benthic invertebrates