

Direction de l'Environnement et de l'Aménagement Littoral

ETUDE DE L'ECOTOXICITE DES SEDIMENTS DRAGUES

DOCUMENT DE SYNTHESE ET ANNEXES
PROJET DU GROUPE GEODE

Françoise QUINIOU
Michel BLANCHARD - Gilles BOCQUENE - Thierry BURGEOT
Louis GIBOIRE - Edouard HIS - Anne LE DU

IFREMER Bibliotheque de BREST



0EL07397



Rapport interne DEL Brest 94-13

Direction de l'Environnement et de l'Aménagement Littoral

ETUDE DE L'ECOTOXICITE DES SEDIMENTS DRAGUES

**DOCUMENT DE SYNTHESE ET ANNEXES
PROJET DU GROUPE GEODE**

*Françoise QUINIOU
Michel BLANCHARD - Gilles BOCQUENE - Thierry BURGEOT
Louis GIBOIRE - Edouard HIS - Anne LE DU*

ÉTUDE DE L'ÉCOTOXICITÉ DES SÉDIMENTS DRAGUÉS

Rapport de synthèse et annexes

AUTEURS :

**Françoise QUINIOU,
Michel BLANCHARD, Gilles BOCQUENÉ, Louis GIBOIRE, Edouard HIS et
Anne LE DÛ**

RÉSUMÉ :

La présente étude a pour objectif de sélectionner des méthodes de laboratoire et de terrain les mieux appropriées pour l'évaluation de l'écotoxicité de sédiments dragués : indicateurs biochimiques d'exposition (EROD et AChE), tests de toxicité sublétales (micro-organismes, algues, embryons de bivalve et extrait enzymatiques de poisson), indices physiologiques de bivalve (respiration, excrétion, mouvements valvaires).

Une synthèse des résultats est présentée accompagnée, en annexes, des rapports des différents participants à l'étude.

MOTS CLÉS : Sédiments dragués, toxicité intrinsèque, suivi des zones de dépôt, indicateurs biochimiques, tests de toxicité sublétales, indices physiologiques.

ORIGINE : DEL/EX IFREMER BREST

DATE : 22 Juin 1994
Nb pages : 86
Nb annexes : 5
Diffusion :

CONTRAT : IFREMER / Groupe GEODE

ÉTUDE DE L'ÉCOTOXICITÉ DES SÉDIMENTS DRAGUÉS

IFREMER

Centre de Brest

BP 70
29280 - PLOUZANE

Centre de Nantes

Rue de l'île d'Yeu
BP 1049
44037 - NANTES CEDEX

Centre d'ARCACHON

Quai du Commandant Silhouette
33120 - ARCACHON

Laboratoire de Toxicologie de ROUEN

UFR de Médecine
Avenue de l'Univercité
BP 97
76800 - St ETIENNE DE ROUVRAY

DOCUMENT DE SYNTHÈSE

Etude de l'écotoxicité des sédiments dragués.

Françoise QUINIOU.
DEL/EX - IFREMER - BREST

28 pages

ANNEXES

ANNEXE 1 : Texte du contrat passé entre IFREMER et le groupe GEODE

7 pages

ANNEXE 2 : Indicateurs biochimiques d'exposition

Thierry BURGEOT, Gilles BOQUENÉ et Louis GIBOIRE
DEL/EX - IFREMER - NANTES

15 pages

ANNEXE 3 : Test protozoaire marin

Anne LEDÛ
Laboratoire de toxicologie de l'Université de ROUEN

8 pages

ANNEXE 4 : Bioessais embryons de bivalves

Françoise QUINIOU et Edouard HIS
DEL/EX - IFREMER-BREST et ARCACHON

8 pages

ANNEXE 5 : Indices physiologiques

Michel BLANCHARD
DEL/ECO - IFREMER-BREST

16 pages

**ÉTUDE DE L'ÉCOTOXICITÉ DES SÉDIMENTS
DRAGUÉS**

DOCUMENT DE SYNTHÈSE

Françoise QUINIOU
DEL/EX - IFREMER BREST

SOMMAIRE

1. INTRODUCTION

2. MÉTHODOLOGIE

2.1. Indicateurs biochimiques d'exposition

2.2. Tests de toxicité sublétales

2.2.1. *Milieux testés*

2.2.2. *Bioessais*

2.3. Indices physiologiques

3. RÉSULTATS

3.1. Tests de toxicité sublétales

3.1.1. *Protozoaire*

3.1.2. *Cyanobactérie*

3.1.3. *Embryons de bivalves*

3.1.4. *Activité AChE in vitro*

3.2. Indices biochimiques d'exposition

3.2.1. *activité AChE in situ*

3.2.2. *Activité EROD in situ*

3.3. Indices physiologiques

3.3.1. *Rapport O/N*

3.3.2. *Mouvements valvaires*

4. CONCLUSION

ÉTUDE DE L'ÉCOTOXICITÉ DES SÉDIMENTS DRAGUÉS

DOCUMENT DE SYNTHÈSE

Françoise QUINIOU

DEL/EX - IFREMER BREST

1. INTRODUCTION

Les sédiments côtiers, estuariens et portuaires piègent les contaminants d'origine anthropique et tellurique (métaux lourds, composés organo-chlorés, hydrocarbures aromatiques...) qui sont transformés ou complexés sur les particules solides (Carr et al, 1988 ; Paquet et Lacaze, 1988, Brower et al, 1990 ; Chapman, 1990 ; Cabridenc, 1991 ; Jouanny, 1991 ; Tay et al, 1992).

Les activités de dragage et de rejet en mer des vases fortement contaminées des ports et des chenaux risquent d'entraîner un effet nocif sur l'environnement.

La convention d'Oslo (1992) prévoit de diminuer les rejets en mer et de procéder à l'évaluation des impacts biologiques lorsque de grandes quantités de matériel doivent être rejetées en mer ou s'il existe des sources de pollution connues et un risque pour le biotope.

En France, le groupe GEODE a été créé en 1991 pour jouer un rôle de conseiller technique en matière :

- de dragage et d'immersion,
- d'évaluation de l'impact
- d'examen critique des procédures proposées par les commissions.

C'est dans le cadre de ce groupe de travail qu'ont été réalisés (annexes 1,2, 3,4 et 5) :

- des tests de toxicité sublétales (*in vitro*) pour évaluer la toxicité des boues de dragage de trois ports : Calais (métaux lourds), Le Havre (PCB's, HPA et métaux lourds) et Saint Nazaire (HPA et PCB's).
- des indices physiologiques, *in situ* et *in vitro*
- la mesure, *in situ*, d'indices biochimiques d'exposition pour rechercher l'impact sur l'environnement des zones de dépôt de ces boues : estuaires de la Seine, de la Loire et de la Gironde (cadmium) - Carte 1.

2. MÉTHODOLOGIE

2.1. Indicateurs biochimiques d'exposition - ANNEXE 2.

La mesure des indicateurs biochimiques EROD (Ethoxyrésorufine-O-dééthylase) et AChE (acétylcholinestérase) a été réalisée sur des extraits de foie (EROD) et de muscle (AChE de poissons démersaux *Callionymus lyra* et *Solea solea* choisis pour leur large distribution géographique, leur migration limitée et leur vie au contact des sédiments riches en contaminants (Galgani et Payne, 1991 ; Galgani et al, 1992 ; Bocquené et al, 1993 ; Burgeot et al, 1993).

La mesure d'un indicateur biologique au niveau de la cellule permet de montrer qu'un organisme est exposé ou non à des niveaux de contamination qui dépassent ses capacités normales de détoxification.

L'EROD est une enzyme impliquée dans le métabolisme de détoxification des hydrocarbures polyaromatiques (HPA) et des polychlorobiphényles (PCB's) ; elle est activée par les polluants qui pénètrent dans l'organisme.

L'AChE est une enzyme essentielle de la transmission de l'influx nerveux ; elle est inhibée par la présence dans le milieu des insecticides organophosphorés et organo-carbamates (Tronczynski, 1990).

2.2. Tests de toxicité sublétales

2.2.1. Milieux testés

La toxicité intrinsèque des sédiments portuaires a été évaluée par des bioessais réalisés en présence des boues (sédiment-contact) et/ou sur des extraits aqueux.

Les extraits aqueux permettent de détecter la toxicité des contaminants susceptibles d'être remis en solution dans l'eau de mer lors des opérations de rejet.

Les bioessais sur le sédiment total sont les plus efficaces pour évaluer les effets des contaminants (ASTM, 1990a) fournissant une évaluation directe de l'impact sur les organismes marins en reflétant les effets cumulatifs de tous les composés ainsi que leurs interactions (Swartz, 1989 ; Melzian, 1990). Ils prennent en compte l'action synergique des différents contaminants hydrophobes comme les PCB's et les HPA (Brower et al, 1990 ; Tay et al, 1992) ainsi que les ions métalliques adsorbés et/ou complexés sur les particules solides (Hannan et al, 1979 ; Bourg, 1991 ; Jouanny, 1991).

Les extraits aqueux sont obtenus par agitation, pendant 12h, des sédiments à tester et employés après 3h de décantation.

Les tests en "sédiment-contact" ont été réalisés en ajoutant le sédiment directement dans les récipients servant aux bioessais.

Les boues de dragage ont été testées, à des concentrations de 0 à 100g de sédiment humide par litre d'eau de mer, à l'aide d'une batterie de quatre essais : microorganismes, cyanobactéries, invertébré (bivalve) et poisson (par le biais d'extraits enzymatiques) en fonction de leur sensibilité.

2.2.2. Bioessais

*Protozoaire marin (*Pseudochnilombus marinus*) - Annexe 3.

Le principe du test protozoaire repose sur la mesure d'inhibition de la croissance d'une population connue de ciliés, (28h à 28°C, sans lumière), sous l'effet de toxiques (Le Dû et al, 1991). Les résultats sont exprimés en CI 50 : concentration qui inhibe 50% de croissance des essais par rapport aux témoins.

*Cyanobactérie : *Calothrix* PCC7601 - Annexe 1.

L'effet des extraits aqueux sur le métabolisme cellulaire de cette algue a été évalué par la mesure du pourcentage d'inhibition de l'activité estérasiqque après une incubation de 40mn à 20°C (Minier et al (1993).

*Bioessai embryon de bivalve : *Crassostrea gigas* - Annexe 4.

Des essais d'embryotoxicité et de spermiotoxicité ont été réalisés sur les sédiments et leurs extraits aqueux selon les techniques décrites par His et Robert (1980, 1986), Thain (1991), His et Seaman (1993) et Quiniou et al (1993).

Spermiotoxicité : après pré-traitement du sperme (15mn) la fécondation et le développement embryonnaire sont réalisés dans les milieux à tester.

Embryotoxicité : 10mn après la fécondation en eau de mer de référence, les oeufs sont inoculés dans les solutions à tester.

Pour le sédiment-contact, un test a été conduit en effectuant la fécondation directement en présence des différentes concentrations de boue.

Les résultats sont exprimés en pourcentage net d'anomalies (PNA) de larves D après 18 à 24h d'incubation à 24°C.

*Activité AChE in vitro - Annexe 1

L'inhibition de l'AChE a été mesurée après 4h d'incubation (à 22°C) d'extraits enzymatiques de muscle de poisson dans les extraits aqueux de boues des ports.

2.3. Indices physiologiques - Annexe 5.

Les mesures physiologiques découlent du "Scope for growth" (Widdow et al, 1985) ont été appliquées à la moule (*Mytilus edulis*), espèce choisie par de nombreux auteurs (Bayne et al, 1985) pour ses qualités de bioindicateur, de plus cette espèce est présente à l'état naturel sur les deux sites suivis : Argenton près de Brest (site propre) et Antifer près du Havre (site pollué).

Parmi les diverses mesures physiologiques utilisées en écotoxicologie, deux ont été appliqués à cette étude :

+le rapport O/N, utilisé pour sa simplicité de mise en oeuvre : c'est le rapport équivalent atomique, de la quantité d'oxygène consommée sur la quantité d'azote amoniacal excrété (Bayne et al, 1985 ; Blanchard, 1989). Ce rapport témoigne de la balance énergétique entre la respiration et l'excrétion : plus l'animal est en mauvaise santé, plus le rapport diminue. La mesure se fait sur une durée de une heure (Fig. 1).

+la mesure des mouvements valvaires développée depuis 1964 (Galstoff) et réalisée à l'aide du "moulomètre" fabriqué par Delta Consult (Fig. 2). Il permet d'enregistrer automatiquement les mouvements valvaires des moules (8 à la fois) qui, sous l'effet d'un stress perturbant leur alimentation et/ou respiration, vont soit fermer leurs valves soit en augmenter la fréquence de fermeture/ouverture. Le suivi de ce paramètre s'est déroulé durant une nuit.

3. RESULTATS

3.1. Tests de toxicité sublétale

3.1.1. Protozoaire

L'analyse toxicologique des sédiments portuaires par le test *Pseudocohnilembus marinus* n'a relevé aucune toxicité des échantillons testés. Les CI50 sont supérieures à 100g de boue /l (Tableau 1).

Bien que très sensible pour les produits purs (Le Dû, 1992), ce test ne peut être recommandé pour des échantillons tels que les sédiments :

- +interférence entre organismes test et les particules lors des comptages au counter coulter.
- +antagonisme entre divers toxines (Vasseur et al, 1988 ; Bonnemain et Dives, 1990 ; Hansen et al, 1990 ; Le Dû et al, 1990).
- +réactions d'adsorption, complexion et précipitation avec le milieu de culture Grasshoff qui est très minéralisé.

3.1.2. Cyanobactérie : *Calothrix*.

L'activité estérasique de *Calothrix* n'est pas modifiée en présence de l'extrait aqueux du port de Calais alors que ceux du Havre et de St Nazaire entraînent une diminution de l'activité estérasique d'environ 30% quelque soit la concentration testée.

Un essai réalisé en absence de cyanobactérie a montré que les sédiments eux mêmes avaient une action d'inhibition directe sur la fluorescence d'un composé, aussi les résultats obtenus ne permettent pas de conclure à un effet significatif des sédiments sur l'activité estérasique.

3.1.3. Embryons de bivalve (Fig. 2).

Les essais réalisés sur les extraits aqueux montrent que s'ils n'ont pas d'effets spermatoxiques significatifs (taux de fécondation identiques que pour les témoins), le développement embryonnaire est très affecté par le sédiment de Calais (PNA = 98) et faiblement par ceux de St Nazaire et du Havre (PNA = 10,5 et 4,6). Aux concentrations inférieures nous observons un phénomène d'hormèse (Stebbing, 1982).

En "sédiment-contact", les effets sont beaucoup plus importants :

*le pré-traitement du sperme entraîne plus de 10% d'anomalies dès la plus faible concentration pour atteindre 55% à Calais, 31% à St Nazaire et 17,2% au Havre avec 50g/l alors que le taux de fécondation n'est pas affecté.

*lorsque le développement embryonnaire se déroule entièrement en présence des boues, les PNA dépassent 46% dès 5g de sédiment/l pour les trois sites et atteignent 100% avec 100g/l.

Ces résultats démontrent que le test embryon de bivalve recommandé depuis 1972 par Woelke et par plusieurs comités nationaux et internationaux (ICES/IOC, 1991 ; US EPA, 1991 ; FAO/UNEP/IOC, 1991) est très sensible pour évaluer la toxicité du sédiment entier (sédiment-contact). Il permet de classer les trois sédiments étudiés selon un gradient de toxicité potentielle : **Calais >> St Nazaire > Le Havre.**

3.1.4. Activité AChE *in vitro* - Tableau 2.

Les effets inhibiteurs des extraits aqueux sont observés dès la concentration 25g/l chez *Callinectes lyra* : 10,3% au Havre, 12,7% à St Nazaire et 41% à Calais. Ils atteignent respectivement 19%, 33% et 63% avec 100g/l.

Comme toutes les analyses *in vitro* ont été conduites avec les mêmes conditions de température, il est possible de classer les boues selon leur degré de toxicité : Calais >> St Nazaire > Le Havre. On retrouve ici le même gradient qu'avec les bioessais embryons de bivalve.

3.1.5. Conclusion

Deux bioessais *in vitro* sont utilisables pour évaluer la toxicité potentielle de rejets de boues de dragage : l'activité AChE et les tests sur le développement embryonnaire de bivalve. Les réponses de ces deux tests montrent qu'il existe un gradient de toxicité entre les sédiments des trois ports : Calais >> St Nazaire > Le Havre .

Si l'on compare l'effet de ces boues en utilisant les poids secs (Tableau. 3), les réponses sont encore accentuées puisque le degré hygrométrique du Havre est inférieur à celui des autres sites.

3.2. Indicateurs biochimiques d'exposition

3.2.1. Activité AChE *in situ* - Figures 3 et 4.

L'activité AChE étant influencée par la température du milieu où vivent les poissons, les résultats ne permettent pas de comparer les sites entre eux.

Cependant les mesures réalisées en baie de Seine montrent que l'inhibition de l'AChE est supérieure dans les estuaires de la Seine et de l'Orne que sur la zone de dépôt.

En estuaire de Gironde, les niveaux d'activité chez la sole (*Solea solea*) mesurées sur quatre stations ne permettent pas de suspecter un effet particulier de cette zone.

Dans l'estuaire de la Loire, les activités de l'AChE du Callionyme et de la sole sont plus inhibées en aval de la zone de dépôt qu'en amont. Cette variation d'activité suggère la présence à cet endroit de molécules inhibitrices.

3.2.2. Activité EROD *in situ* - Figures 5 et 6.

En baie de Seine, les résultats indiquent comme pour l'AChE que la zone de dépôt influence moins l'activité EROD que l'estuaire de la Seine lui-même, fortement contaminé en PCB's (Galgani et al, 1992).

En Gironde, les résultats obtenus ne permettent pas de discerner un impact des sédiments immergés.

Près de la Loire, les deux stations situées de part et d'autre de la zone de dépôt montrent une induction de l'activité EROD supérieure à celle des stations situées au nord de l'estuaire. Cependant, il est difficile de différencier l'action de la zone de dépôt de celle de l'estuaire de la Loire où existe une raffinerie de pétrole qui peut rejeter des hydrocarbures (HPA).

Les activités EROD permettent d'établir un gradient de l'impact des zones de dépôt : Loire > Seine >> Gironde. Il est intéressant de noter que comme pour l'activité AChE *in vitro* et les tests embryons de bivalve, l'impact des boues de dragage du port de St Nazaire est supérieur à celui du Havre.

3.2.3. Conclusion

Quelque soit le site, l'impact des zones de dépôt sur les activités enzymatiques est le même en Baie de Seine et en estuaire de Gironde ; ceci peut être relié au fait que ces zones de rejet sont sous l'influence de courants dispersifs et les effets des zones de dépôt s'ajoutent à ceux des apports par les rivières.

En Loire, il existe un impact de la zone de rejet sur l'inhibition de l'ACHé alors que l'induction de l'EROD augmente sous l'influence de la Loire.

3.3 Indices physiologiques

3.3.1. Le rapport O/N - Tableau 3 et 4.

In situ, les valeurs du rapport O/N mesurées à Argenton toutes supérieures à 54 indiquent un bon état général des animaux alors qu'à Antifer, les valeurs sont toutes inférieures à 45,8, allant même jusqu'à 29,3, ce qui indique un réel stress.

Au laboratoire, l'azote organique particulaire provenant des extraits aqueux (50 et 100g/l) interfère avec la mesure de l'excrétion azotée et ne permet pas un calcul correct des rapports O/N. Cependant, les valeurs de respiration (O) augmentent en présence de concentrations croissantes de sédiment.

Une adaptation du protocole, en réalisant la mesure d'excrétion (N) en eau propre, une heure après le contact, permettrait peut être de mesurer une excrétion azotée. Notons que les concentrations testées (50 et 100g/l) sont très supérieures à celles qu'il est possible de rencontrer dans le milieu naturel et, le rapport O/N pourrait ne pas être modifié à de plus faibles densités.

3.3.2. Les mouvements valvaires.

In situ, il n'a pas été possible de détecter une différence, si ce n'est une plus grande variabilité des réponses individuelles à Antifer. Soit la qualité de l'eau n'est pas très différente pour les moules, soit les animaux auraient une capacité de résistance à un stress différente selon les individus.

Au laboratoire, seulement la moitié d'un échantillon de huit individus montre un impact. Pour les autres essais, les résultats montrent une variabilité individuelle telle, qu'il est très difficile de les interpréter. La figure 7 montre que trois des quatre individus qui ont répondu présentent un comportement valvaire anormal, indiquant une baisse de la qualité du milieu : fermeture lente et progressive des valves puis relâchement musculaire conduisant à un "baillement total". Des expositions plus longues (supérieures à 4h) permettraient peut être d'obtenir des indications intéressantes comme celles de Borchering (1992), Kramer et al (1989) et Jenner et al (1989).

3.3.3. Conclusion

Le protocole de la mesure des mouvements valvaires demande à être encore amélioré pour diminuer les variabilités individuelles, *in situ* et au laboratoire.

La mesure du rapport O/N *in situ* donne une bonne mesure de l'impact de la qualité du milieu sur le métabolisme des moules entre les deux sites étudiés, alors qu'en laboratoire, la mesure de l'excrétion est affectée par l'azote organique des

sédiments et ne permet pas, pour le moment, de proposer cet indice pour la surveillance, *in vitro*, d'un milieu chargé en matières en suspension.

4. CONCLUSION

Les indices physiologiques, chez la moule, sont prometteurs mais demandent des améliorations de protocoles afin de diminuer les variations individuelles et l'interférence *in vitro* de l'azote organique. Cependant la mesure, *in situ*, du rapport O/N permet de différencier la qualité de l'eau de sites différents.

Les modifications *in situ*, des activités enzymatiques (EROD, AChE) chez les poissons, indiquent qu'il existe une menace potentielle des contaminants relargués par les boues de dragage sur la qualité générale de l'environnement. Cependant, parallèlement aux mesures des effets sur les zones de dépôt, il serait essentiel d'effectuer des analyses spécifiques pour identifier les molécules responsables des effets (par exemple : les pesticides organophosphorés et carbamatés pour l'inhibition de l'AChE).

D'autre part, une augmentation du maillage des prélèvements vers les zones non impactées, permettrait d'avoir une meilleure image des secteurs sous influence des dépôts et des apports des rivières.

Les différentes études de recherche de bio-indicateurs ont permis de voir que deux types de tests *in vitro* (développement embryonnaire de bivalve et activité AChE) peuvent rendre compte de la toxicité potentielle des boues de dragage même s'il n'existe pas encore de possibilité d'extrapoler ces réponses pour évaluer l'impact sur l'environnement.

Il est à noter que même si elle nécessite des améliorations, la mesure, *in situ*, de l'induction de l'EROD est en accord avec les réponses des bioessais sur l'embryogénèse de l'huître creuse et la mesure *in vitro* de l'inhibition de l'activité AChE ; elles ont permis d'établir un gradient géographique de toxicité :

Calais >> Saint Nazaire > Le Havre.

BIBLIOGRAPHIE

ASTM (American Society of Testing and Material) - 1990a : Standard guide for conducting 10-day static sediment toxicity test with marine and estuarine amphipods. ASTM Designation : E 1367-90. 24 pp.

Bayne. B.L., Brown. D.A., Burns. K., Dixon. D.R., Ivanovici. A., Livingstone. D.R., Lowe. D.M., Moore. M.N., Stebbing. A.R.D. & J. Widdows - 1985 : The effects of stress and pollution on marine animals. *Preager Special Studies*. Preager Scientific N.Y.

Blanchard. M. - 1989 : Analyse fonctionnelle et méthodologique pour l'étude bioénergétique de mollusques. *Rapport interne Ifremer*. DERO.EL/ 89.18, 100p.

Borcherding. J. - 1992 : Another early warning system for the detection of toxic discharges in the aquatic environment based on valve movement of freshwater mussel *Dreissena polymorpha*. *Limnology aktuel*, 4. 127-146.

Bonnemain. H, & D. Dive - 1990 : Studies on synergistic toxic effects of copper and dithiocarbamates pesticides with the ciliate protozoan *Colpidium campylum* Stokes, *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 19, 320-326.

Bocquené. G, T. Burgeot, L. Le Dean, P. Truquet & F. Galgani - 1993 : Acetylcholinesterase levels in fish along the french coast. *Mar. Poll. Bull.* 26 (2), 101-106.

Bourg. A - 1991. Echanges Eaux-Sédiments. In *L'Ecotoxicologie des Sédiments*. Rapport et communications du congrès international de La Rochelle. Juin 1991. SEFA. p 96.

Brouwer. H, T. Murphy & L.A. MC.Ardle, 1990 : A sediment-contact bioassay with *Photobacterium phosphoreum*. *Environmental Toxicology and Chemistry*, Vol 9. 1353-1358.

Burgeot. T, G. Boquéné, P. Truquet, L. Le Dean, J.C. Poulard, D. Dorel, A. Souplet & F. Galgani - 1993 : *Callionymus lyra* as a target species for monitoring the biochemical effects of pollutants along the coast of France. *Marine. Ecology Progress series*. 97 : 309-316.

Cabridenc. R., 1991. Dégradation et transformation dans les sédiments. In : *L'écotoxicologie des sédiments*. Rapport et communications du congrès international de La Rochelle Juin 1991. SEFA. 59-85.

Carr. R.S., J.W. Williams & C.T.B. Fragata - 1989 : Developpement and evaluation of a novel marine sediment porewater toxicity test with the polychaete *Dinophilus gyrociliatus*. *Environmental Toxicology and Chemistry*, Vol 8, 533-543.

Chapman. P.M. - 1990. The sediment triad approach to determining pollution-induced degradation. *The Science of the Total Environment*, 11pp.

FAO/UNEP/IOC - 1992 : Proceeding of the FAO/UNEP/IOC workshop on the biological effects of pollutants on marine organisms. *MAP Technical Report Series N° 69*. Malte, 10-15 sept 1991.

Galgani. F, G. Boqué, P. Truquet, T. Burgeot, J.F. Chiffolleau & D. Claisse - 1992 : Monitoring of pollutant biochemical effects on marine organisms of the french coast. *Oceanologica Acta*. Vol 15, 4 : 355-364.

Galgani. F & J.F. Payne - 1991 : Biological effects of contaminants : Microplate method for measurement of ethoxyresorufin-O-deethylase (EROD) in fish. *Techniques in Marine Environmental Sciences*. N° 13. Publication ICES.

Gaistoff. P.S. - 1964 : The american oyster *Crassostrea virginica*. *Fishery Bulletin*, 64.

Hannan. P. & C. Patouillet - 1979 : Results of an algal toxicity test applied to sediment elutriates. *Naval Research Laboratory Memorandum Report* , 3952, 27pp.

Hansen. A.M, J.O. Leckie, E.F. Mandelli & R.S. Altman - 1990 : Study of copper II association with dissolved organic matter in surface water of three Mexican Coastal Lagoons, *Environ. Sci. Technol.*, Vol 24, N° 5, 683-688.

His. E. & R. Robert - 1980 : Action d'un sel organo-métallique l'acétate de tributyl-étain sur les oeufs et les larves D de *Crassostrea gigas* (Thunberg). *CIEM. C.M. 1980/F* : 27. 10pp.

His. E. & R. Robert - 1986 : Utilisation des élevages larvaires de *Crassostrea gigas* en écotoxicologie marine. *Haliotis*. 15, 301-308.

His. E. & M. Seaman - 1993 : A simple, rapid and inexpensive method for monitoring pollutant effects on bivalve embryogenesis and larval development. *SECOTOX Regional Meeting* : Environmental Toxicology - Hazard to the environment and man in the mediterranean region, 26-29 sept.(Poster).

ICES/IOC - 1992 : Report of the ICES/IOC workshop on the biological effects of contaminants in the North sea. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*

Jenner. H.A., Noppert. F. & T. Sikking - 1989 : A new system for the detection of valve movement response of bivalves. *Kema Scientific & Technical Reports*, 7 (2), 91-98.

Jouany. J.M - 1991 : Impact des contaminants sur la microfaune des sédiments. In : *L'écotoxicologie des sédiments. Rapport et communications du congrès international de La Rochelle, Juin 1991, SEFA.*, 97-105.

Kramer. K.J.M., Jenner. H.A. & D. de Zwart - 1989 : The valve movement response of mussels : a tool in biological monitoring. *Hydrobiologia*, 188/199, 433-443.

Le Dù. A. - 1992 : Application de tests protozoaires dans l'évaluation du risque en milieu aquatique. *Thèse de Docteur es Sciences, Univ. de Rouen*, 191 pp.

Le Dù. A, D. Dive. & A. Philippo - 1990 : Interactions between components of electroplating industry waste. Influence of receiving water on the toxicity of the effluent. *Environ. Pollut.*, 65 : 251-267.

Le Dù. A,F. Farhat, G. Lacroix, P. Baille, M. Guerbet & J.M. Jouany - 1992 : *Pseudohcohnilembus marinus* : a protozoan test in the service of marine assessment, XXXIème Congrès du GPLF, Nedde-Le-Chateau, 25-28 Mai.

Melzian. B.D - 1990 : Toxicity assessment of dredged materials : acute and chronic toxicity as determined by bioassays and bioaccumulation tests. Proceeding of international seminar on the environmental aspects of dredging activities. Nantes (France) 27 nov-1 dec 1989. 49-64.

Minier. C, Galgani. F. & J.M. Robert. - 1993 : *In vitro* characterisation of esterase activity in *Calothrix* PCC 7601, *Haslea ostrearia* and *Prorocentrum micans*. *Botanica Marina*. 36 : 245-252.

Paquet . F. & J.C. Lacaze - 1988 : Evaluation de la qualité des sédiments marins au moyen d'essais sublétaux. Effets sur la production larvaire et le comportement alimentaire du copépode *Tigriopus brevicornis*. *J.R.O.*, Vol 13,(34), 111-114.

Quiniou. F, E. Le Squer-André & N. Damée - 1993 : Effet de sédiments marins et de leurs extraits aqueux, sur la bioluminescence d'une bactérie (Microtox) et sur le développement embryonnaire de bivalves. CIEM. CM. 1993/E : 25.11pp.

Stebbing . A.R.B., - 1982 : Hormesis - The stimulation of growth by low levels of inhibitors. *The Science of the Total Environment*, 22, p 213-234.

Swartz. R.C, P.F. Kemp, D.W. Schults & J.O. Lamberson - 1989 : Toxicity of sediment Eagle Harbour, Washington to the infaunal amphipod *Rhepoxynius abronius*. *Environmental Toxicology Chemistry*. 8 : 215-222.

Tay K.L., K.G. Doe, S.J. Wade, D.A. Vaughan, R.E. Berrigan. & M.J. Moore - 1992 : Sediment bioassessment in Halifax Harbour. *Environmental Toxicology and Chemistry*, Vol 11, 1565-1581.

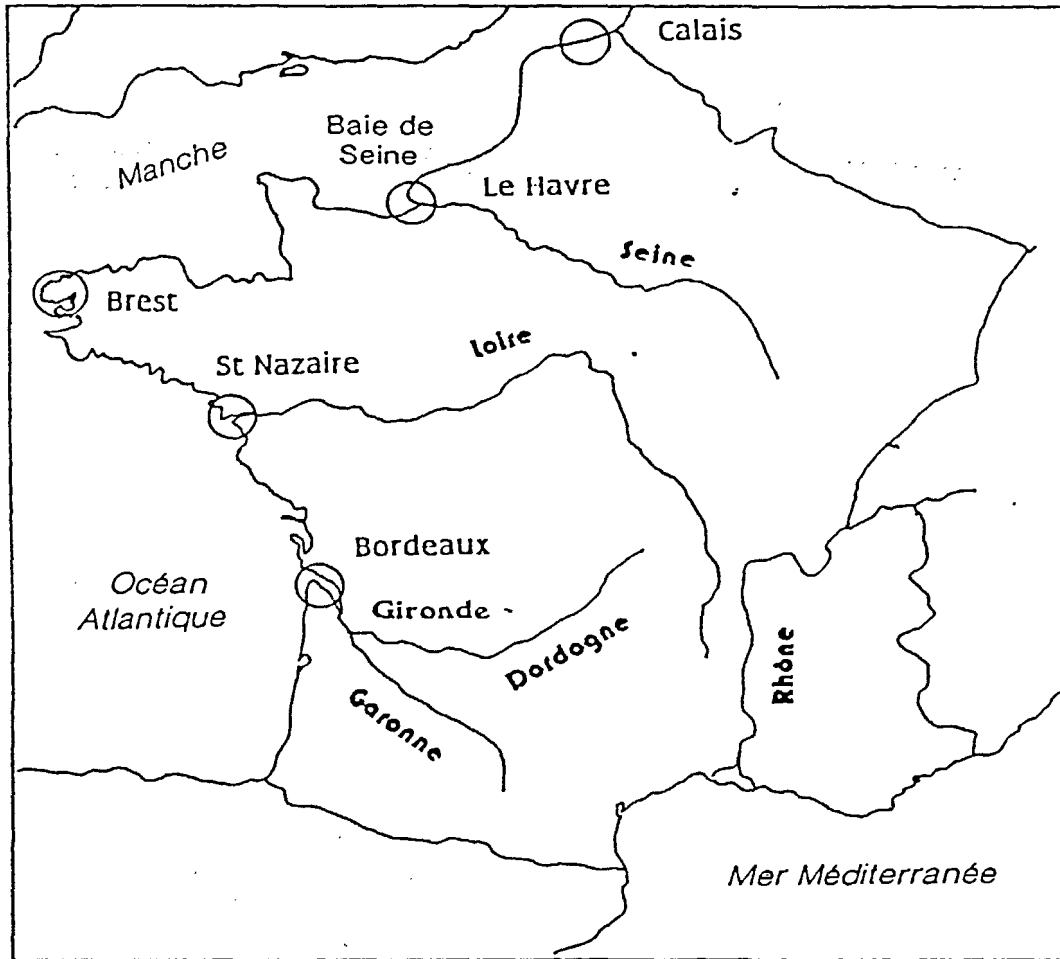
Thain. J. - 1991 : Development of a receiving water quality bioassay criterion based on the 48 hours pacific oyster (*Crassostrea gigas*) embryo. *Washington Department of Fisheries*. Technical report n°9, 93 p.

US EPA - 1991 : Ecological evaluation of proposed discharge of dredged material into ocean water. US environmental protection agency & US army corps of engineer, Report EPA 503-8-90/002. EPA office of marine and estuarine protection, Washington DC. 219 pp & appendix.

Vasseur; P, D. Dive, Z. Sokar & H. Bonnemain - 1988 : Interactions between copper and some carbamates used in phytosanitary treatments, *Chemosphere*, 17 (4), 767-782.

Widdows. J., Donkin. P., Salked. N., Cleary. J. J., Lowe. D.M., Evans. S.V., & P.E. Thomson - 1984 : Relative importance of environmental factors in determining physiological differences between two populations of mussels (*Mytilus edulis*). *Marine Ecology Progress Series*, 17 : 33-47.

Woelke. C.H - 1972 : Development of a receiving water quality bioassay criterion based on the 48 hours pacific oyster (*Crassostrea gigas*) embryo. *Washington Department of Fisheries. Technical report N° 9*. 93 pp.



CARTE 1 : Situation des sites étudiés

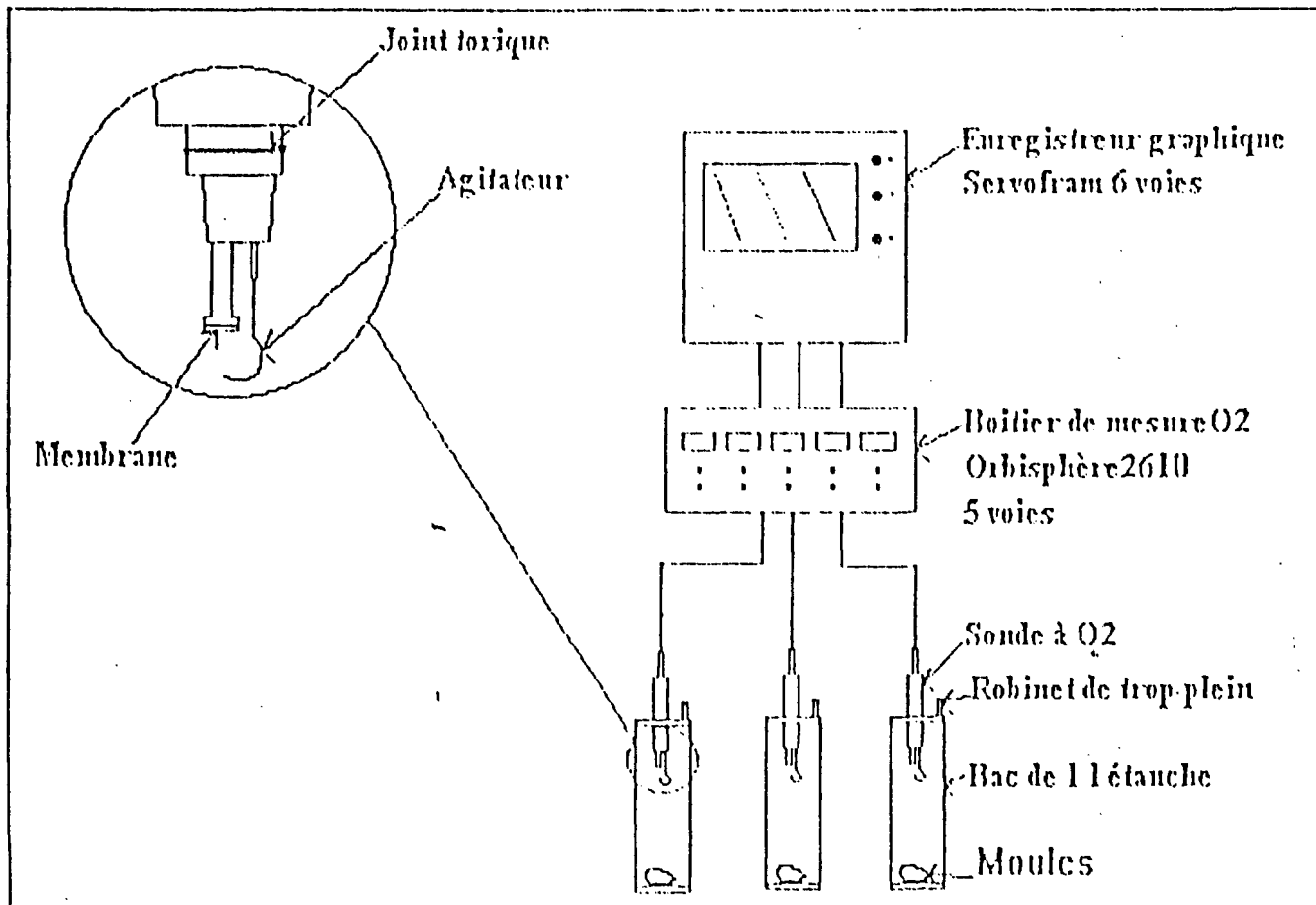


Fig 1 Dispositif expérimental pour la mesure de la respiration

TABLEAU 1 : mesures des CI50 des sédiments des trois sites étudiés

| | mesures : CI50 en mg/l de sédiments | |
|---|-------------------------------------|--------------|
| Calais : toxicité intrinsèque * échantillon non filtré * échantillon filtré | >100 >100 | >100 >100 |
| Calais : toxicité par relargage * échantillon non filtré * échantillon filtré | >100 >100 | >100 >100 |
| Calais : toxicité après acidification * échantillon non filtré * échantillon filtré | >100 >100 | |
| Le Havre : toxicité intrinsèque * échantillon non filtré * échantillon filtré | >100 >100 | >100 >100 |
| Le Havre : toxicité par relargage * échantillon non filtré * échantillon filtré | >100 >100 | >100 >100 |
| Le Havre : toxicité après acidification * échantillon non filtré * échantillon filtré | >100 >100 | |
| Nantes : toxicité intrinsèque * échantillon non filtré * échantillon filtré | >100 >100 | >100 >100 |
| Nantes : toxicité par relargage * échantillon non filtré * échantillon filtré | >100 >100 | >100 >100 |
| Nantes : toxicité après acidification * échantillon non filtré * échantillon filtré | >100 >100 | |

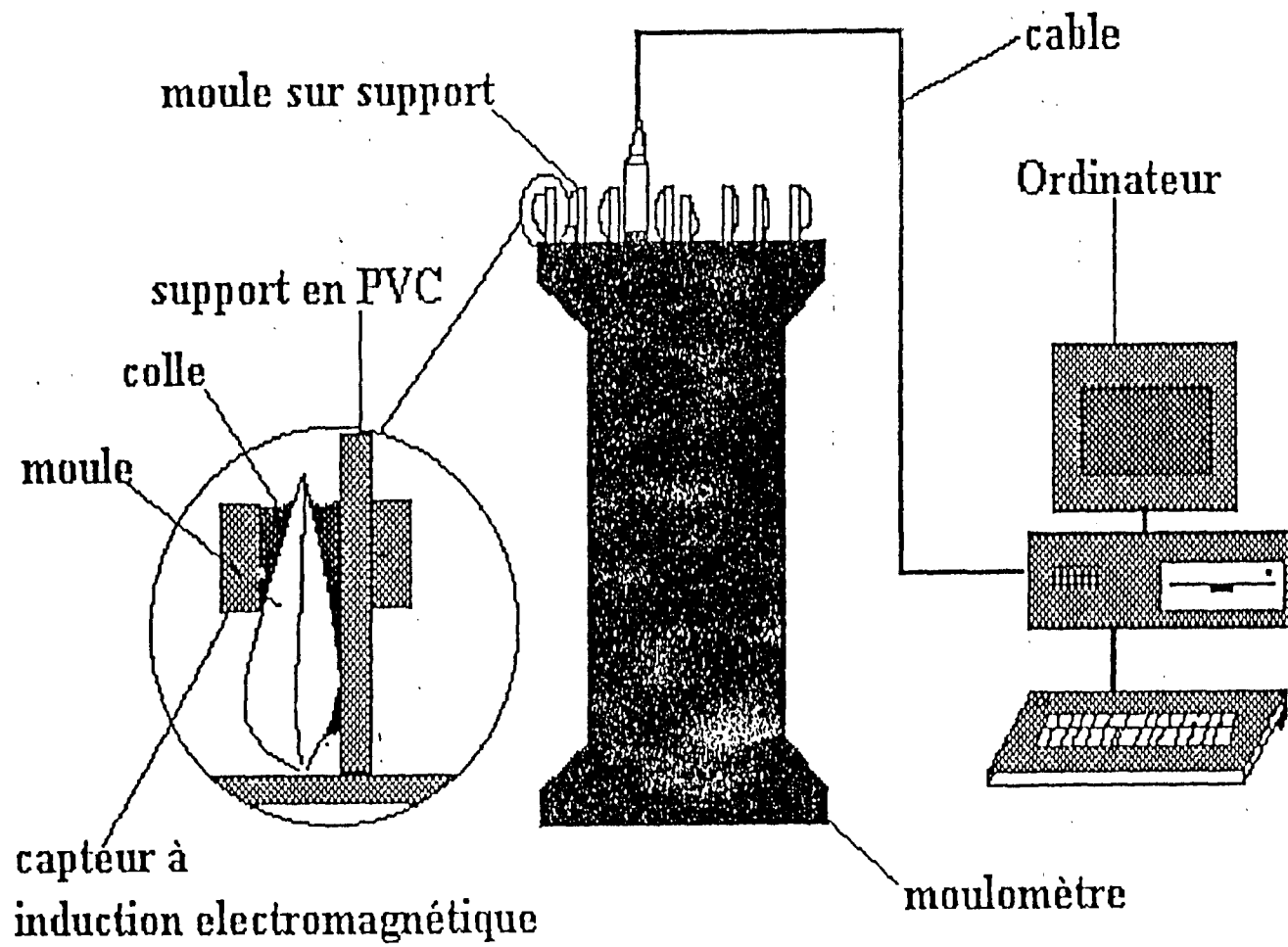
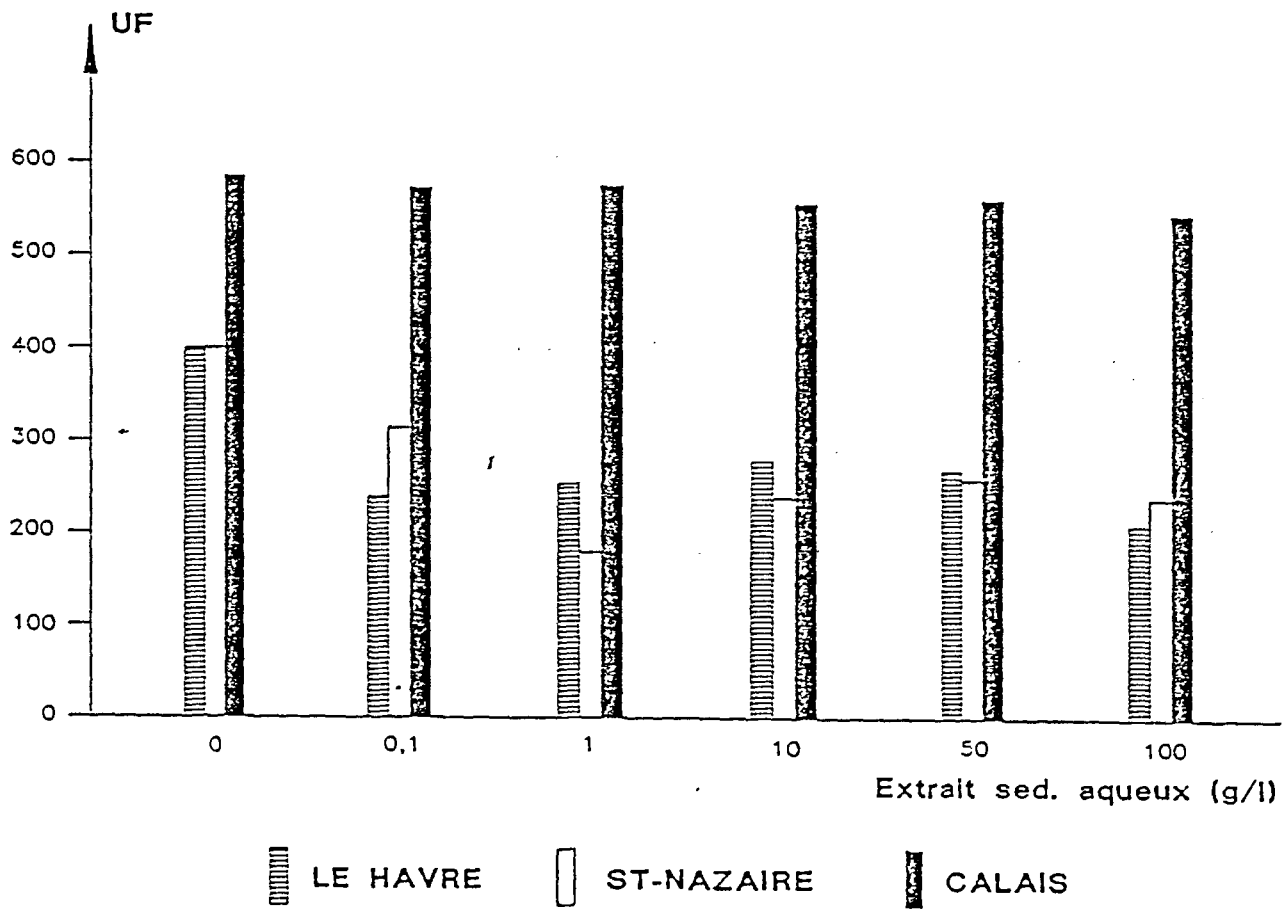


fig2 Schéma du moulomètre



9
 FIGURE 2 : Mesure de l'activité estérasique de cyanobactéries (*Calothrix*) en présence de concentrations croissantes de sédiment décanté (extrait sédiment aqueux) pour les sites de ST-NAZAIRE, LE HAVRE et CALAIS. UF (unité de fluorescence) est l'unité choisie pour exprimer l'activité enzymatique.

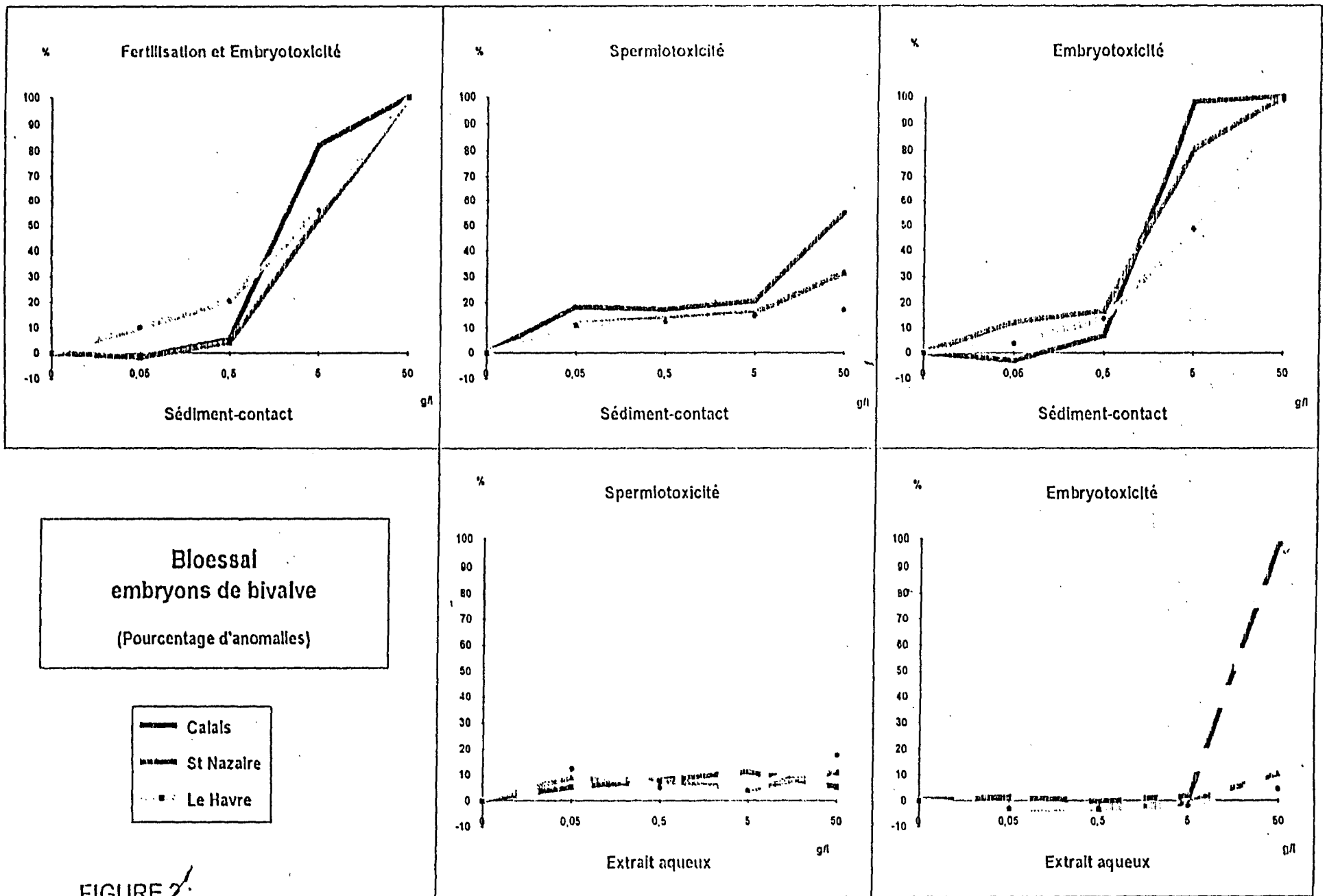


FIGURE 2:

4

| | | | | | |
|--------------|------|-----|---|----|-----|
| poids humide | | | | | |
| poids sec | 0,05 | 0,5 | 5 | 50 | 100 |
| Calais | | | | | |
| St Nazaire | 0,02 | 0,2 | 2 | 20 | 40 |
| Le Havre | 0,03 | 0,3 | 3 | 30 | 60 |

Correspondance entre
poids sec et poids humide
de sédiment

TABLEAU 2 :

INHIBITION AChE (%)
(Extrait enzymatique de poisson)

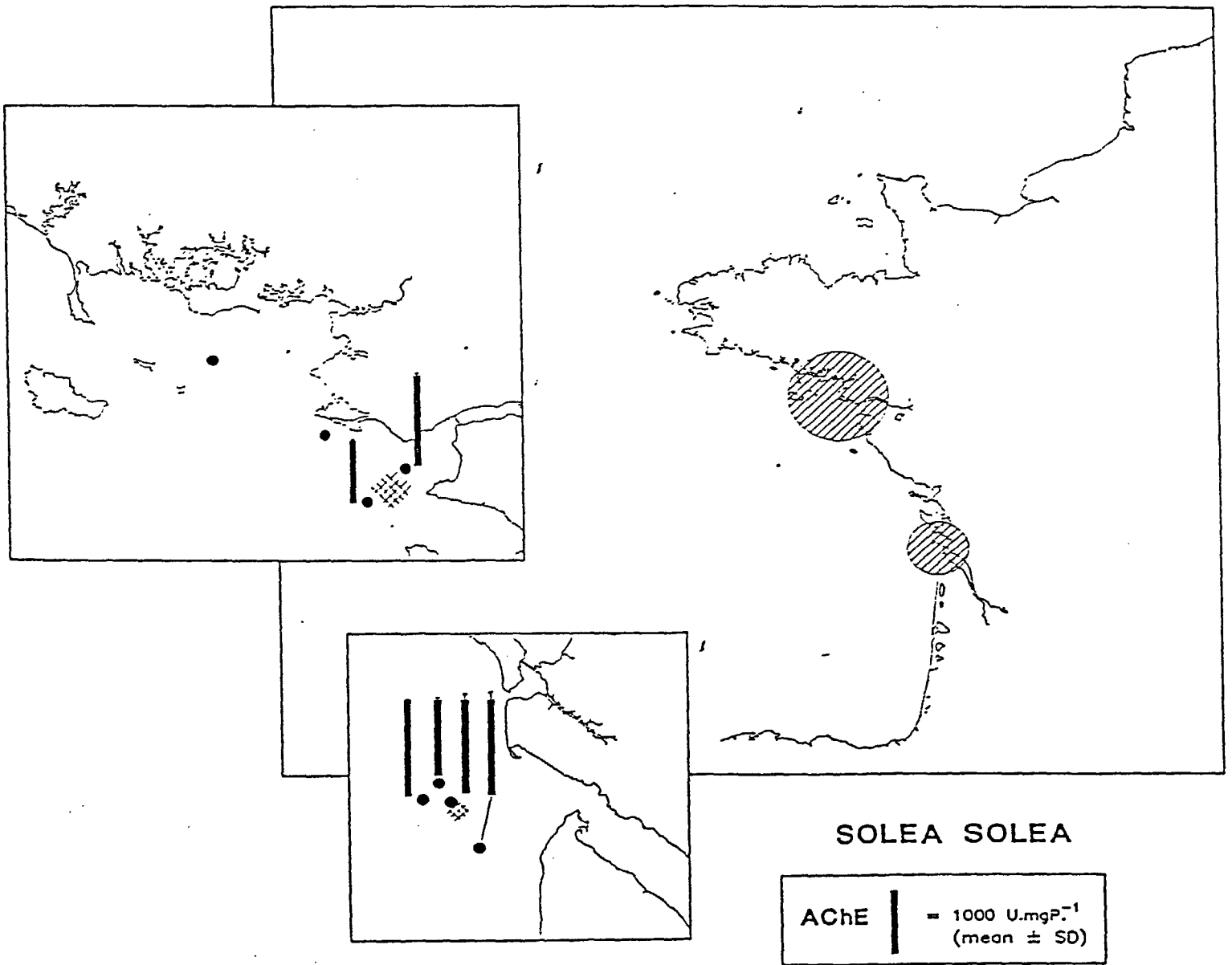
| | | |
|--|------|-----|
| EXTRAIT AQUEUX g/l sédiment humide | 25 | 100 |
| Calais | 41 | 63 |
| St Nazaire | 12,7 | 33 |
| Le Havre | 10,3 | 19 |



CALLIONYMUS LYRA

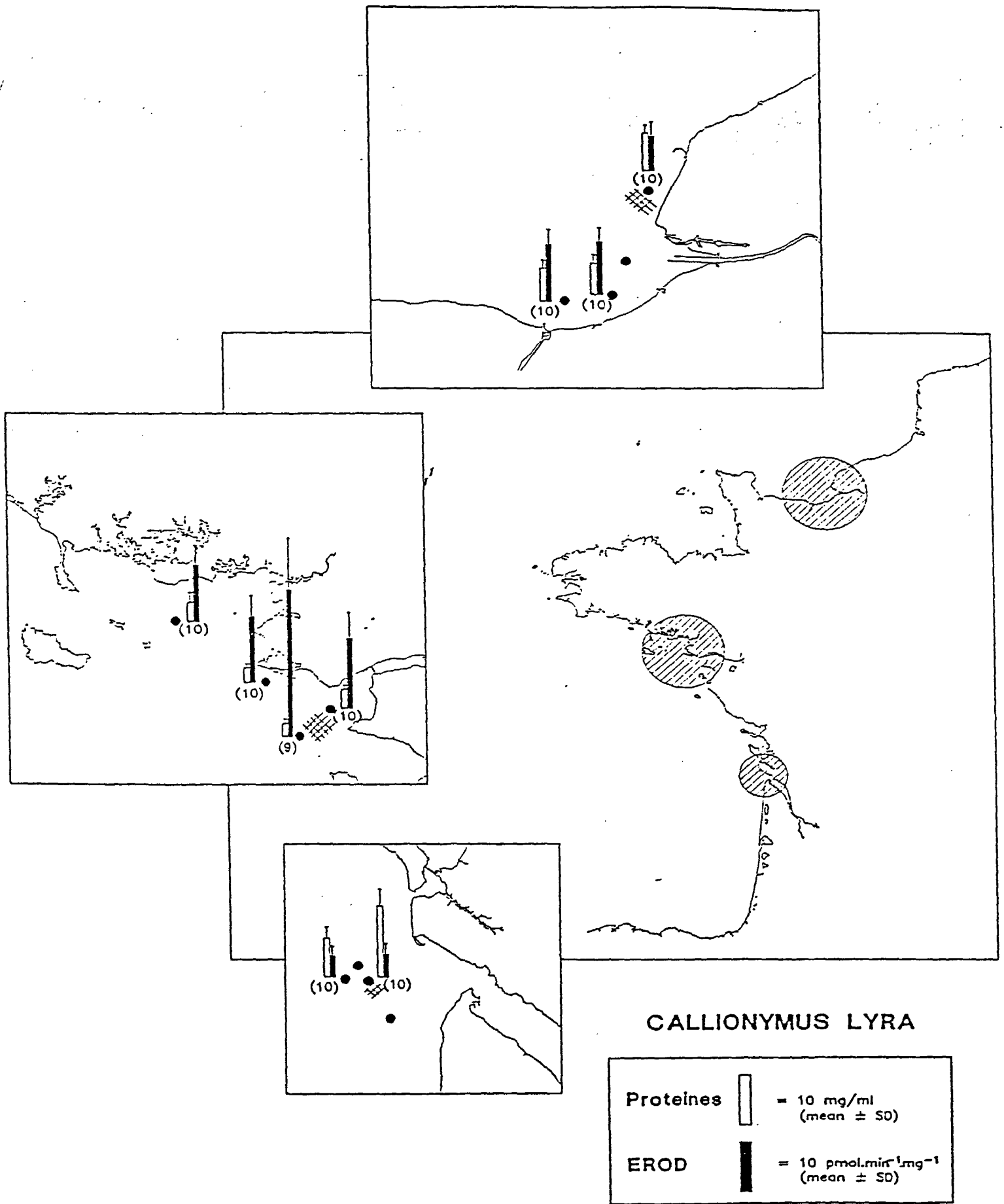
AChE | = 1000 U.mgP.⁻¹
(mean ± SD)

FIGURE 3: ⁵ : Mesures d'activité AChE sur le callionyme (*Callionymus lyra*) en estuaire de Loire (Mai 1993) et Baie de Seine (Septembre 1993).



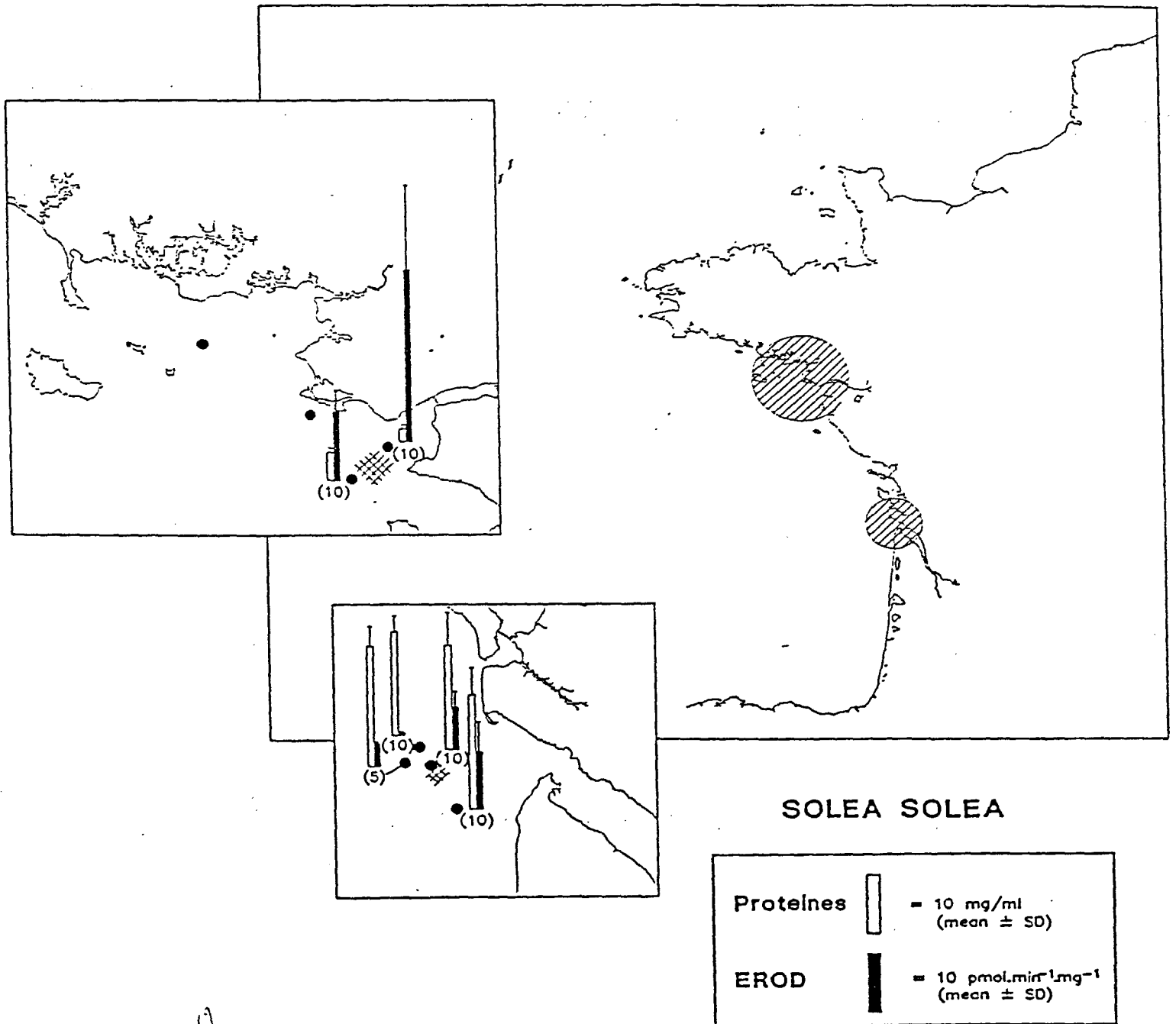
6
 FIGURE 4: Mesures d'activité AChE
 Loire (Mai 1993) et Baie de Seine (Septembre 1993).

en estuaire de



7

FIGURE 5 : Mesures d'activités enzymatiques EROD associées aux protéines dissoutes sur des Callionymes (*Callionymus lyra*) pêchés en Baie de Seine (Septembre 1993), dans l'estuaire de la Loire (Mai 1993) et en Gironde.(Octobre 1993).



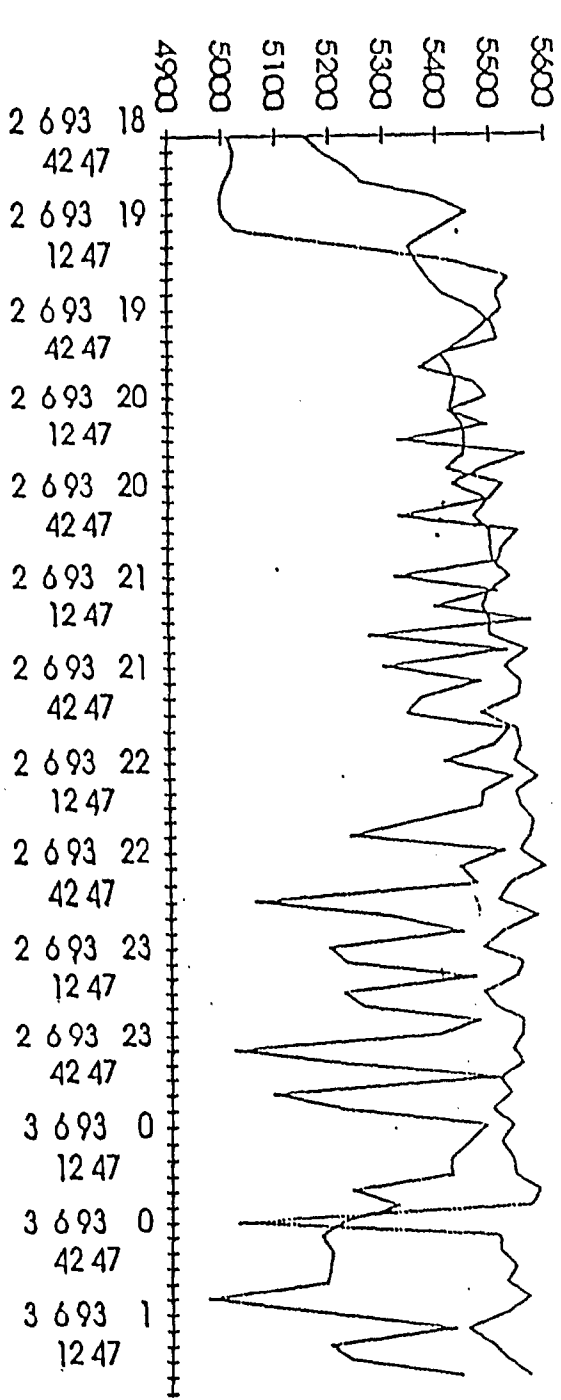
8
FIGURE 6 : Mesures d'activités enzymatiques EROD associées aux protéines sur des Soles (*Solea solea*) pêchées dans l'estuaire de la Loire (Mai 1993) et en Gironde (Octobre 1993).

| Site | Respiration (mg d'oxygène/16l) | Concentration d'azote ammoniacal (µatg/l/14) | Rapport O/N |
|----------|-----------------------------------|---|-------------|
| Argenton | 0.0284 | 0.1936 | 128.6 |
| | 0.0170 | 0.2021 | 73.6 |
| | 0.0159 | 0.1764 | 78.86 |
| | 0.0091 | 0.1166 | 68.35 |
| | 0.0170 | 0.1324 | 112.43 |
| | 0.0148 | 0.2366 | 54.73 |
| | 0.0148 | 0.1293 | 100.21 |
| | 0.0057 | 0.0736 | 67.85 |
| | 0.0136 | 0.2207 | 54.14 |
| Moyenne | 0.0151 | 0.1646 | 82.08 |
| Anrifer | 0.0182 | 0.1193 | 133.5 |
| | 0.0182 | 0.1893 | 84.25 |
| | 0.0091 | 0.0814 | 97.89 |
| | 0.0091 | 0.1528 | 52.17 |
| | 0.0102 | 0.1957 | 45.86 |
| | 0.0171 | 0.2178 | 68.95 |
| | 0.0080 | 0.1200 | 58.82 |
| | 0.0046 | 0.1385 | 29.33 |
| | 0.0284 | 0.2943 | 84.52 |
| Moyenne | 0.0137 | 0.1677 | 72.81 |

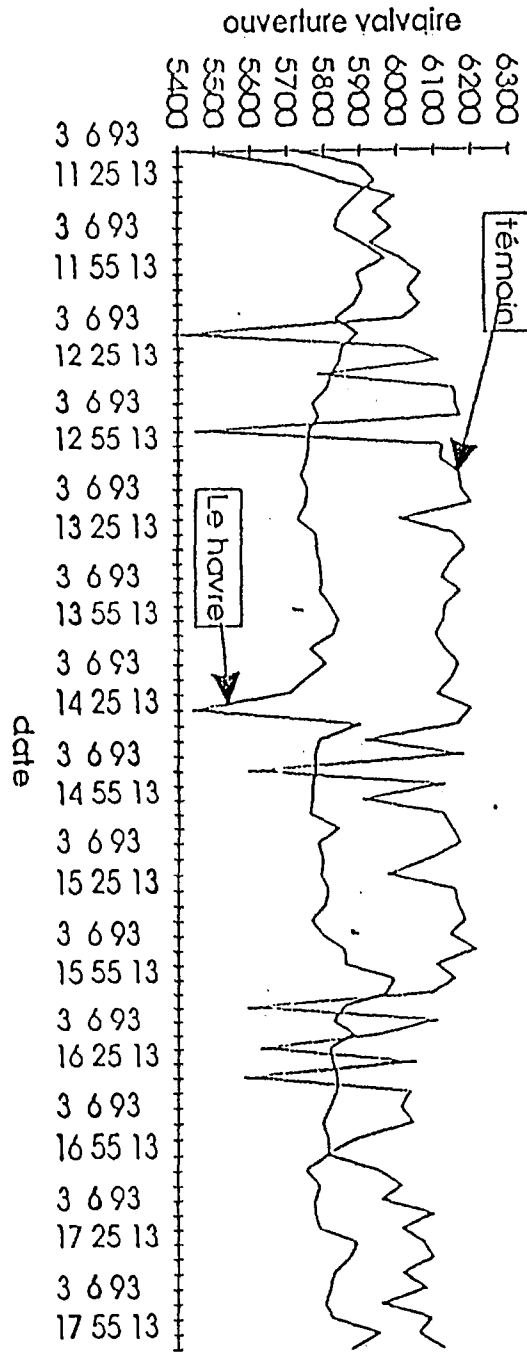
TABLEAU 3 : Résultat des mesures du rapport O/N réalisées in situ.

| Concentration sédimentaire (g/l) | Consommation d'oxygène | | Excretion ammoniacale | | Rapport O/N (maxima) |
|-------------------------------------|------------------------|--------|-----------------------|-------------|-------------------------|
| | ppm | ppm/16 | (µatg/l) | (µatg/l/14) | |
| 50 | 0.2534 | 0.0158 | >50 | >3.57 | 70.98 |
| | 0.1705 | 0.0107 | >50 | >3.57 | 47.75 |
| | 0.1250 | 0.0078 | >50 | >3.57 | 35.00 |
| | 0.0716 | 0.045 | >50 | >3.57 | 20.05 |
| | X | X | >50 | >3.57 | . |
| | 0.2341 | 0.0146 | >50 | >3.57 | 65.57 |
| Moyenne | 0.1709 | 0.0107 | >50 | >3.57 | 47.87 |
| 100 | 0.1023 | 0.0064 | >50 | >3.57 | 28.65 |
| | 0.1364 | 0.0085 | >50 | >3.57 | 38.20 |
| | 0.1386 | 0.0087 | >50 | >3.57 | 38.82 |
| Moyenne | 0.1258 | 0.0079 | >50 | >3.57 | 35.22 |

TABLEAU 4 : Résultats des mesures du rapport O/N en présence de sédiment



Comparaison du témoin et de l'eau contaminée (moule 6)



Comparaison d'un témoin et du sédiment du Havre (moule 6)

FIGURE 7:

3

ANNEXE 1

ETUDE DE L'ECOTOXICITE DES SEDIMENTS DRAGUES

I - OBJET DE L'ETUDE

Sur la base de campagnes pluriannuelles de mesure de teneurs en métaux et composés organochlorés (PCB) le Groupe d'Etude Opération de Dragage et Environnement a proposé des normes provisoires correspondant au bruit de fond et aux niveaux 1 et 2 définis par la Convention d'Oslo. Ces normes ne tiennent pas compte du caractère toxique de chaque élément et il a été convenu que celles correspondant au niveau 2 seraient revues en fonction de données toxicologiques nouvelles (version GEODE du 8.10.1992). De plus, la Convention d'Oslo recommande aux autorités compétentes de procéder à une évaluation de la nocivité des sédiments immergés et à l'étude de leur impact sur le milieu.

La présente étude a pour objectif de :

- Déterminer la toxicité intrinsèque des sédiments dragués à partir de tests de laboratoires sublétaux,
- Evaluer in situ l'impact des immersions sur la faune des principales zones de dépôt des sédiments dragués.

Ces objectifs correspondent au plan de travail que s'était fixé GEODE lors de sa création ; ils devraient permettre de sélectionner les méthodes de laboratoire et de terrain les mieux appropriés à l'évaluation écotoxicologique des sédiments.

II - PROGRAMME D'ETUDE

1) Toxicité intrinsèque

La toxicité intrinsèque sera évaluée sur 3 échantillons de sédiments prélevés lors de campagnes annuelles de mesure à :

CALAIS

Responsable du prélèvement : M. François VICTOR

Port Autonome de Dunkerque

Terre Plein Guillain

B.P. 6534

59386 DUNKERQUE CEDEX 1

Tél. : 28 29 70 70

Fax : 28 29 71 06

ESTUAIRE DE SEINE

Responsable du prélèvement : M. NADAUT
Port Autonome du Havre
Terre Plein de la Barre
B.P. 1413 – 76 067 LE HAVRE CEDEX

Tél. : 35 21 74 00
Fax : 35 21 74 29

ESTUAIRE DE LOIRE

Responsable du prélèvement : M. B. GALLENNE
Port Autonome Nantes St Nazaire
18, Quai Ernest Renaud
44 031 NANTES CEDEX

Tél. : 40 44 20 99
Fax : 40 44 21 81

Seront utilisés quatre tests sublétaux de laboratoire :

a. Essais sur protozoaires

- * Inhibition de la croissance de *Colpidium campylum*
Université de Rouen (Pr JOUANY)

b. Mesures sur phytoplancton

- * Mesure de l'influence sur l'activité estérasique de microalgues marines
IFREMER Nantes (F. GALGANI)

c. Bio-essais sur bivalves et/ou oursins

IFREMER Brest, Arcachon (F. QUINIOU – E. HIS)

* La fécondation et le développement embryonnaire sont choisis en raison de leur grande sensibilité à la qualité du milieu. Ces types de tests sont réalisés et recommandés depuis le début des années 1970.

* Trois types de tests sont possibles :

- La fécondation est réalisée directement dans le milieu à tester et le taux de larves normales est comparé au témoin (24 à 48 h pour les bivalves, 48 à 72 h pour les oursins).
- Le sperme est mis en contact avec le milieu 10 mn et on mesure sa capacité à féconder les ovocytes en eau propre, observation à fécondation + 1 h (spermiotoxicité). Un effet sur la qualité des descendants peut être observé en fin de test (génotoxicité).
- La fécondation est réalisée en eau de référence, puis les jeunes embryons (10') sont introduits dans les milieux, le taux de larves normales est mesuré (embryotoxicité).

* Quantité de sédiments nécessaire : 500 g par site en pot de 100 g x 2 pour replicat

d. Indice du scope for growth sur des bivalves adultes

IFREMER Brest (M. BLANCHARD)

* **Indice O/N**

Mesure de la consommation d'oxygène (oxymètre) et de l'excrétion par dosage colorimétrique de l'ammoniac (NH₄) chez les bivalves adultes (moules) mis en présence de boue ou extrait aqueux de boue (1 h de mesure). Un individu par bac d'un litre. Comparaison du rapport O/N avec témoin pour chaque site et chaque concentration.

* **Moulomètre**

Mesure en laboratoire d'un stress engendré par la "qualité" de l'eau ou baignent les moules.

30 litres d'eau par lot de 8 individus dans un bac clos avec agitation.

Le stress est mesuré par la modification (augmentation) du rythme des mouvements valvaires des bivalves en comparaison à celui des témoins.

* **Quantité de sédiment nécessaire : 20 kg par site en pot de 1 kg (10 kg par indice).**

2) Suivi des zones à dépôt

* **Objectif : déterminer l'impact biologique, au niveau sublétal, dans les zones de dépôt par référence avec des zones non exposées.**

* **Nature du suivi**

a. Indicateurs biochimiques d'exposition

Mesure de l'acétylcholinestérase AChE et des fonctions oxydase mixtes (EROD) sur des poissons (limande, dragonnet) pêchés sur la zone de dépôt et à proximité.

- . Sites concernés : Calais – Baie de Seine – Estuaire de Loire – Estuaire de Gironde
- . Une campagne printemps 1993.

b. Bilan énergétique

. Immersion de lots de moules adultes dans des cages durant 2 à 3 mois. Un site propre sert de référence (Argenton).

. En fin de la période, transport des échantillons sur Brest et mesures en laboratoire : nutrition, excrétion, égestion, taux d'assimilation, respiration...

- . Sites concernés : Baie de Seine

3) Remise du rapport

15 Octobre 1993

///III - COUT DE L'ETUDE

1) Toxicité intrinsèque

non compris frais de prélèvement à la charge des Ports Autonomes concernés

| | |
|--------------------------------------|----------|
| - Frais d'analyse et mission : | 60 KF HT |
| - Personnel : | 20 KF HT |

2) Suivi des zones de dépôt

bilan énergétique (frais d'analyse)

non compris frais de prélèvements à la charge du Port Autonome concerné

| | |
|--------------------------------------|----------|
| - Frais d'analyse et mission : | 60 KF HT |
| - Personnel : | 20 KF HT |

TOTAL 200 KF HT

TOXICITE INTRINSEQUE : Protocole expérimental

1) Prélèvements

Lors du dragage, prélever un volume homogène de sédiment et le répartir de la manière suivante :

- | | |
|--|---------------------------|
| • Test Colpidium – Université de Rouen | 5 pots de 100 g (environ) |
| • Phytoplancton – IFREMER Nantes | 5 pots de 100 g |
| • Bio-essais Bivalves – IFREMER Arcachon | 10 pots de 100 g |
| • Scope par Growth – IFREMER Brest | 20 pots de 1 kg |

2) Stockage

Dès que possible après le prélèvement les échantillons seront stockés en chambre froide ou au réfrigérateur, à l'abri de l'air et de la lumière.

L'expédition au laboratoire pratiquant les tests devra s'effectuer le plus rapidement possible afin d'utiliser un sédiment ayant moins de 20 jours de stockage.

3) Bio-essais

* Pour chaque site seront testés :

- Le sédiment (sédiment tel quel)
- Un extrait aqueux du sédiment

* Dans chaque cas une gamme de 5 à 6 concentrations sera étudiée :

0-0,05-0,5-50 g/l

+ 100 g/l si à 50 g/l aucun effet n'est détecté

"Poids de sédiment humide par litre d'eau de mer référence".

4) Préparation des solutions à tester

* Sédiment tel quel

- Les quantités de sédiment nécessaires pour réaliser la gamme précitée sont déposées dans les récipients expérimentaux contenant l'eau de référence.

Ceux-ci sont agités une fois pour homogénéiser les milieux.

- Après redéposition du sédiment les bio-essais sont réalisés sans agitation ultérieure.

- L'effet observable sera alors dû au contact des organismes avec le sédiment et/ou au relargage naturel des "contaminants" dans la solution testée.

* **Extrait aqueux**

- Une solution mère de 50 ou 100 g de sédiment humide pour 1 l d'eau référence sera réalisé et mise en agitation magnétique pendant 12 h (par exemple pendant la nuit de 17 h à 5 h).

- Après décantation de 3 h, le surnageant non filtré sera prélevé et utilisé tel quel ou dilué pour réaliser les différentes concentrations à tester.

- Ici c'est la partie des "contaminants" passée en phase dissoute qui sera responsable de l'éventuelle toxicité mesurée.

5) Résultats

Les résultats seront exprimés en équivalent poids sec ; une courbe "effet-dose" pourra être tracée permettant une comparaison de la toxicité des boues provenant de sites différents.

6) Période pour prélèvements et tests

* Les prélèvements pourront être réalisés entre fin mai et début juin à Calais, Baie de Seine et en Loire.

* Les expériences pouvant se dérouler début juin ou mi juin.

7) Responsable du programme

Françoise QUINIOU
Centre IFREMER de BREST
B.P. 70
29280 PLOUZANE

Tél. : 98 22 44 67
Fax : 98 22 45 48

8) Destinataires des prélèvements

Sédiments prélevés à Calais - Estuaire de Seine - Estuaire de Loire

1) Université de Rouen

Echantillons à adresser en 5 pots de 100 g par site à :

Melle Anne LEDU - S/c Professeur J.M. JOUANY
UER de Médecin et Pharmacie de Rouen
Laboratoire de toxicologie
B.P. 97
76800 ST ETIENNE DU ROUVRAY

Tél. : 35 65 47 71

2) IFREMER NANTES Phytoplancton

Sédiments à adresser en 5 pots de 100 g par site à :

M. Thierry BURGEOT

Centre IFREMER de Nantes

B.P. 1049

44037 NANTES CEDEX 01

Tél. : 40 37 40 51

Fax : 30 37 40 73

3) IFREMER ARCACHON – Bioessais bivalves

Sédiments à adresser en 10 pots de 100 g à :

M. Edouard HIS

IFREMER

Quai du Commandant Silhouette

33120 ARCACHON

Tél. : 56 83 85 60

Fax : 56 83 89 90

4) IFREMER BREST – Scope for growth

Echantillons à adresser à raison de 20 pots de 1 kg par site à :

M. Michel BLANCHARD

Centre IFREMER de Brest

B.P. 70

29280 PLOUZANE

Tél. : 98 22 43 36

Fax : 98 22 45 48

ANNEXE 2

ETUDE DE L'ECOTOXICITE DES SEDIMENTS DRAGUES

GEODE

Thierry BURGEOT

Gilles BOCQUENE

Louis GIBOIRE

DEL/EX

IFREMER

NANTES

1. MESURE DE L'INFLUENCE DU SEDIMENT SUR L'ACTIVITE ESTERASIQUE DE CYANOBACTERIES

Test FDA

L'impact des sédiments dragués sur le métabolisme cellulaire de cyanobactéries (*Calothrix PCC 7601*) a été évalué par mesure de l'activité estérasiq. Cette activité, étroitement liée à l'état physiologique et métabolique de l'organisme, peut être suivie par fluorimétrie en utilisant la fluoresceine diacétate (FDA) comme substrat de réaction. La fluoresceine diacétate, molécule apolaire et non fluorescente, est hydrolysée à l'intérieur des cellules par l'activité estérase. Le produit formé par hydrolyse est la fluoresceine. Ce composé de dégradation est fluorescent et polaire. La mesure de l'apparition de la fluoresceine dans des microplaques, où se trouvent du sédiment et les *Calothrix*, permet de caractériser l'activité estérasiq. Cette activité enzymatique représente ainsi un outil d'évaluation de l'activité métabolique des cyanobactéries (*Calothrix*) exposées à des sédiments.

1.1. Matériel et Méthode

1.1.1. Préparation des solutions à tester

*Extrait aqueux

Une solution mère de 100g de sédiment humide pour 1l d'eau de mer stérile est placée sous agitation pendant 12 heures. Après décantation de 3 heures, le surnageant non filtré est prélevé et utilisé pour réaliser les différentes concentrations à tester. C'est la partie des contaminants passés en phase dissoute qui est responsable de l'éventuelle toxicité. Une gamme de 6 concentrations est préparée : 0-0.05-0.5-5-50 et 100 g de sédiment humide par litre d'eau de mer stérile.

1.1.2. Cellules

Calothrix PCC 7601 provenant de la collection pasteur, cultivée dans le milieu BG 11.

1.1.3. Marquage cellulaire

310 μ l de culture cellulaire (*Calothrix*) sont répartis dans chaque puits d'une microplaque de microtitration (microplaque 96 puits sans propylène transparent). 10 μ l de fluoresceine diacétate (FDA, Sigma Chemical Company) à 0.333 mg/ml dans l'acétone, sont ajoutés par puits. La réaction se déroule pendant 40 min.

1.1.4. Lecture du marquage cellulaire

L'accumulation cellulaire de fluoresceine, produit de l'activité estérase des algues, est mesurée pendant les vingt dernières minutes de réaction à l'aide d'un lecteur de microplaque en fluorescence (Fluoroskan II) avec un filtre d'excitation à 485 nm et un filtre d'émission à 540 nm.

1.1.5. Action des sédiments dragués sur la fluorescence de la résorufine

Les sédiments ont été dilués dans de l'eau de mer et placés sous agitation pendant 12 heures. L'action des sédiments sur la fluorescence de la résorufine (2 μ M) a été mesurée avant et après décantation (3 h de décantation.).

1.2. Résultats et Discussions

La mesure de l'activité estérasique non spécifique des cyanobactéries (*Calothrix*) à été réalisée en présence de sédiments collectés sur les sites de Calais, l'Estuaire de la Loire et le Havre. Nous avons démontré que les sédiments ont une action d'inhibition sur la fluorescence d'un composé, tel que la fluorescéine, en l'absence de sédiment. La résorufine autre composé fluorescent a été choisi pour démontrer que des concentrations croissantes de sédiment ont une action d'inhibition de la fluorescence. (Fig. 1a et 1b).

Afin de s'affranchir de l'action des sédiments sur la fluorescence de la fluoresceine nous avons mesuré l'effet de particules de sédiment restant dans la phase aqueuse, c'est à dire dans le surnageant non filtré après décantation de 3 heures. Dans ces conditions, seules les particules présentes dans la phase dissoute peuvent exercer un effet toxique sur les *Calothrix*.

L'effet toxique des concentrations croissantes de sédiment ne peut être observé sur le site de Calais car il n'y a aucune différence entre le témoin et la gamme de concentration de sédiment. Pour les stations du Havre et de l'Estuaire de la Loire, l'activité estérasique (en UF : Unité de fluorescence) des puits contenant du sédiment est inférieure au témoin (Fig. 2). Cependant la gamme de concentration testée ne permet pas de conclure un effet significatif des sédiments sur l'activité estérasique de *Calothrix*.

2. INDICATEURS BIOCHIMIQUES D'EXPOSITION

Un indicateur biochimique peut être défini comme une réponse biochimique ou cellulaire provoquée par un stress chimique sur un organisme marin. La mesure d'un indicateur biochimique au niveau de la cellule permet d'accéder à une réponse rapide de l'organisme exposé à des polluants présents dans le sédiment. L'avantage principal d'un indicateur biochimique est de montrer qu'un organisme est exposé ou non à des niveaux de contamination qui dépassent ses capacités normales de détoxification. L'objectif de ce suivi est de déterminer l'impact biologique des sédiments dans les zones de dépôt par référence avec des zones non exposées. La mesure des indicateurs biochimiques EROD (Ethoxyrésorufine -O- dééthylase) et AChE (Acétylcholinestérase) a été réalisée sur les sites de la Baie de Seine, l'estuaire de la Loire et l'estuaire de la Gironde. Le site de Calais n'a pas été échantillonné car nous n'avons pas trouvé de bateaux équipés pour le chalutage en Octobre et les mauvaises conditions météo, rencontrées à cette période, n'ont pas permis de faire les prélèvements avec le Gwen-Drez (navire océanographique de l'IFREMER).

2.1. Choix des indicateurs

2.1.1. Mesure des fonctions oxydases mixtes (EROD)

L'EROD est une enzyme impliquée dans le métabolisme de détoxification des hydrocarbures polycycliques et des polychlorobiphényles. Ce système permet à l'organisme d'éliminer ce type de molécule. L'intérêt d'utiliser cette enzyme comme bioindicateur (indicateur biochimique) est qu'elle est activée par les polluants qui pénètrent dans l'organisme. Plus la concentration des polluants est élevée, plus l'activité enzymatique EROD est élevée. Le principe d'analyse est basé sur la mesure de l'activité EROD dans des foies de poissons utilisés comme témoins de la santé de leur environnement. Le choix de l'organisme témoin doit intégrer trois critères : une large répartition dans le site étudié, une certaine sédentarité et représentativité de l'écosystème côtier. La sole (*Solea solea*) la limande (*Limanda limanda*) et le Callionyme (*Callionymus lyra*) sont les espèces étudiées car elles répondent le mieux aux critères de surveillance sur les sites concernés.

2.1.2. Activité AChE

L'acétylcholinestérase est une enzyme essentielle à la transmission correcte de l'influx nerveux. Cette fonction en fait la cible directe des insecticides organophosphorés (OP) et organocarbamates (C) qui agissent en inhibant l'enzyme. L'affinité de ces composés pour l'AChE est telle que les concentrations en OP et C induisant une inhibition de 50% de l'activité AChE atteignent 10^{-10} M (0.01µg/l). L'étude de l'activité AChE permet la mise en évidence de variations de l'activité liées à la présence d'inhibiteurs dans le milieu.

Deux types d'étude ont été engagés dans le suivi des effets de relargage de boues de dragage :

- l'analyse de l'activité AChE a été entreprise sur le muscle de poissons capturés sur ou à proximité des sites de relargage. Les mesures en niveau d'activité ont été comparées aux activités de la même espèce sur une zone distincte du site de rejet,

- après incubation de différentes dilutions de l'extrait aqueux obtenu à partir du sédiment (boue) avec deux extraits enzymatiques de poissons (qui contiennent l'AChE), des mesures d'activité ont permis la recherche d'éventuels effets inhibiteurs de contaminants passés en phase dissoute.

Les mesures ont été réalisées sur deux espèces benthiques selon leur disponibilité sur zones : la sole (*Solea solea*) sur les zones Gironde et estuaire de Loire et le callionyme (*Callionymus lyra*) sur les zones estuaire de Loire et Baie de Seine.

2.2. Matériel et Méthode

2.2.1. Stratégie d'échantillonnage

Dix poissons sont pêchés par chalutage de 30 minutes sur chaque station. Chaque individu est mesuré et sexé. Le foie est extrait, lavé dans un premier tampon (TRIS 0.1M, PH7.8 ; NaCL 0.1 M) et conservé dans l'azote liquide.

2.2.2. Préparation des extraits

Les foies sont broyés dans un tampon d'extraction (TRIS 50mM, PH7.4; KCL 150 mM; EDTA 1mM et glycérol 20 % vol) à 4°C dans des Potters-Elvehjem et centrifugés à 9000g pendant 15 minutes à 4°C. Le surnageant est utilisé pour la mesure d'activité enzymatique.

Les muscles sont broyés dans un tampon TRIS 0.1 M pH 7.8 et centrifugés à 10 000g pendant 30 minutes. Le surnageant est directement utilisé pour la mesure de l'activité cholinestérasique.

2.2.3. Analyse de l'activité EROD

L'analyse est réalisée sur des microplaques contenant 96 puits. Dans chacun des puits sont déposés 200µl de tampon (TRIS 0.1M; PO4 0.1M; PH8) 10µL de Ethoxyrésorufine 2µM, 10µl d'extrait et 10µL de NADPH. L'activité est déterminée par cinétique enzymatique à température ambiante pendant 10 minutes avec un fluorimètre (fluoroskan II) aux longueurs d'ondes d'excitation de 544 nm et d'émission de 584 nm. Les résultats sont exprimés en pmol min⁻¹ mg protéines⁻¹.

2.2.4. Mesure de l'activité AChE

La méthode d'Ellman (1961) modifiée pour une utilisation de systèmes microplaques est appliquée à la mesure de l'activité AChE. La lecture est donnée à 405 nm par l'hydrolyse de l'acétylthiocholine par l'acétylcholinestérase développant une coloration jaune en présence de DTNB. Cette mesure est obtenue à chaque poisson capturé sur les différents sites.

Dans le cas des études des effets des extraits aqueux issus des boues relargués, différentes dilutions de ces extraits sont mis en incubation pendant 4 heures à température ambiante (22°C) avec des extraits de muscle de callionymes et de sole à , respectivement, 1.8 et 1.3 mg de protéine par ml d'extrait. La mesure de l'activité est alors lancée et la cinétique est suivie pendant 60 minutes.

2.2.5. Analyse des protéines

Les protéines sont mesurées dans le surnageant suivant la méthode de Bradford (1976), en utilisant du sérum albumine de boeuf comme standard. Les mesures sont réalisées sur microplaques avec un spectrophotomètre à 595nm et exprimées en mg ml⁻¹.

2.3. Résultats et Discussion

2.3.1. Mesures d'EROD *in situ*

Les résultats obtenus par mesure de l'EROD, sur les trois sites échantillonnés, donnent une indication ponctuelle sur l'état de santé des poissons vivant dans ces zones. L'objectif est de comparer la réponse biochimique de poissons vivants directement en contact avec des sédiments dragués et des poissons vivants en dehors de la zone de dépôt des sédiments dragués. L'indicateur biochimique (EROD) est le paramètre étudié pour caractériser la réponse enzymatique des espèces témoins vivants en contact avec des sédiments susceptibles d'être contaminés par des hydrocarbures. L'EROD est une enzyme spécifique de la métabolisation des hydrocarbures polyaromatiques (PAH) et des polychlorobiphényles (PCB). Son activité sera donc particulièrement induite par ces polluants s'ils sont présents à des concentrations élevées. Les mesures enregistrées, même au sein de l'espèce *Callionymus lyra*, n'autorisent pas de comparaisons entre les sites car les échantillons n'ont pas été prélevés dans la même période de temps. Seules les individus d'une même espèce pêchés sur le même site, le même jour, peuvent être comparés. L'interprétation des mesures d'EROD sur les stations d'un même site est basée sur la comparaison des différences d'activité enzymatique pour la même espèce. Une différence significative entre deux stations permet de suspecter l'effet biologique des polluants PAH ou PCB.

* LE HAVRE

. *La Limande*

La station située sur la zone de dépôt indique une activité EROD inférieure à la station située dans l'axe de l'estuaire. Les Limandes vivant sur la zone de dépôt semblent donc moins influencées par les polluants que celles vivant dans la zone subestuarienne. (Fig. 3).

. *Le Callionyme*

Les mesures effectuées sur le Callionyme montrent comme pour la Limande que les poissons vivant sur la zone de dépôt ne sont pas plus exposés que ceux vivant dans la zone subestuarienne (Fig. 4).

* ESTUAIRE DE LA LOIRE

. *La Sole*

La station la plus proche de Saint Nazaire, située en limite de la zone de dépôt montre une induction de l'activité EROD supérieure à la station située un peu plus au large. L'absence de soles sur des stations situées en dehors de la zone de dépôt directement influencée par les apports de la Loire ne permet aucune comparaison avec des soles *à priori* moins exposées (Fig. 5). Il n'est pas possible de préciser à partir de ces seules mesures si l'induction de l'activité EROD est due aux polluants dans le sédiment dragué ou aux polluants apportés par la Loire. Cependant des mesures réalisées en juin 1992 confirment une induction de l'EROD plus élevée sur la zone de dépôt que les stations plus amont, dans l'estuaire (données non publiées).

. Le Callionyme

Les deux stations situées de part et d'autre des limites de la zone de dépôt montrent une induction de l'activité EROD supérieure aux stations situées au nord de l'estuaire. Les callionymes vivant sur la zone de dépôt située dans l'estuaire de la Loire semblent plus influencés par l'effet des polluants que les callionymes vivant en dehors de l'estuaire (Fig. 4). Il est cependant difficile de discerner dans ce cas si les responsables de l'augmentation de l'activité EROD sont les sédiments où les polluants apportés par la Loire.

** ESTUAIRE DE LA GIRONDE*

. La Sole

Si les stations situées au nord de la zone de dépôt montrent une activité EROD inférieure à celle située dans la zone de dépôt il ne peut être conclu à partir de ces seules mesures que les sédiments dragués sont les responsables de l'augmentation de l'activité EROD (Fig. 5). La station au sud montre une induction de l'activité EROD supérieure à celle enregistrée sur la zone de dépôt ce qui tend à signifier que les poissons vivant dans le secteur le plus proche de l'estuaire sont plus exposés que ceux vivant légèrement plus au large. Il serait judicieux de prélever des poissons sur des stations plus éloignées de la zone de dépôt en allant plus au large (les conditions météo n'ont pas permis de réaliser de chalutage plus au large).

. Le Callionyme

Les mesures effectuées sur les Callionymes présents sur deux des quatre stations échantillonnées, ne permettent pas de discerner un quelconque impact des sédiments dragués (Fig. 4). Les mesures d'activités EROD sont pratiquement identiques sur les deux stations.

2.3.2. Mesure de l'Activité AChE

Les résultats sont donnés par les figures 6 et 7.

Les activités AChE des poissons prélevés à des saisons différentes ne sont pas comparables entre elles. En effet les paramètres tels que la température du milieu influent considérablement sur les niveaux d'activité. Les prélèvements sur une même zone doivent être simultanés et la température de l'eau de mer contrôlée.

** BAIE DE SEINE*

La mesure des activités AChE de callionymes capturés dans la Baie de Seine met en évidence des activités sensiblement plus faibles sur les stations situées dans l'estuaire même de la Seine ainsi que dans l'estuaire de l'Orne (respectivement 640 et 636 U). En revanche les animaux capturés sur la zone de rejets montrent des activités supérieures aux deux stations précédentes (712 U). Aucun effet inhibiteur n'est évident sur cette zone.

* ESTUAIRE DE LOIRE

En estuaire de Loire, les callionymes pêchés sur la zone de relargage des boues montrent des activités significativement plus faibles (1345 + 74 U) que les animaux capturés plus en amont dans la zone estuarienne (1679 +109 U). Ces résultats sont confirmés par les mesures réalisées sur les soles et qui montrent le même profil (respectivement 996 + 34 et 1453 + 51).

En l'absence de mesures chimiques confirmant la présence d'organophosphorés et de carbamates sur cette zone il est difficile de conclure à une inhibition liée spécifiquement à ces molécules, néanmoins la variation d'activité est manifeste et suggère la présence sur cette zone de molécules inhibitrices.

* ESTUAIRE DE GIRONDE

En estuaire de Gironde, les soles prélevées sur la zone de rejets présentent des activités semblables en niveau aux autres stations de cet estuaire (1515, 1490 et 1546 U). Une quatrième station située au nord ouest de la zone de dépôt montre des activités plus faibles (1207 + 51). Ces résultats ne permettent pas de suspecter un effet particulier sur cette zone.

2.3.3. Effets d'extraits aqueux sur l'activité AChE *in vitro*

Les résultats donnés par les histogrammes de la figure 8 regroupent les effets des incubations de différentes dilutions d'extraits aqueux obtenus à partir des boues rejetées (100g de boue par litre d'eau de mer stérile).

Si les effets inhibiteurs sont sensibles dès la dilution de cet extrait au 1/4 pour les prélèvements du Havre et de St Nazaire (on constate une inhibition de, respectivement, 10.3% et 12.7% par rapport aux activités AChE de callionymes témoins), les effets inhibiteurs de l'extrait de Calais sont significativement plus forts et atteignent 41% pour la même dilution. Les extraits purs (100g de boue par litre) montrent les effets les plus forts avec 19% d'inhibition au Havre, 33.3% à St Nazaire et 63% à Calais. Les mêmes essais réalisés sur des extraits enzymatiques de sole révèlent des effets inhibiteurs plus faibles dus à la moins grande sensibilité de cette espèce (13,8% au Havre et 25% à St Nazaire avec les extraits concentrés à 100g/l). Les essais sur cette espèce n'ont pas été effectués avec les extraits de Calais.

Dans les trois cas les effets sur les niveaux d'activité de l'acétylcholinestérase sont manifestes mais les effets les plus forts sont observés avec l'extrait de Calais. Pour les mêmes raisons que celles évoquées précédemment (absence de données chimiques sur les insecticides organophosphorés et carbamates dans la couche sédimentaire de ces zones) il est impossible d'affirmer que ces effets sont exclusivement liés à ces produits mais l'expérience acquise au laboratoire sur les causes des inhibitions des cholinestérases permet de conclure à un effet global de la contamination de l'extrait préparé à partir de 100g /l. Ces informations concernant un effet inhibiteur marqué mais obtenu *in vitro* ne permettent pas de prédire un effet semblable dans le milieu, l'effet de dilution de la masse d'eau est probablement très supérieur à 100g/l en mer, cette concentration paraît peu probable dans le milieu.

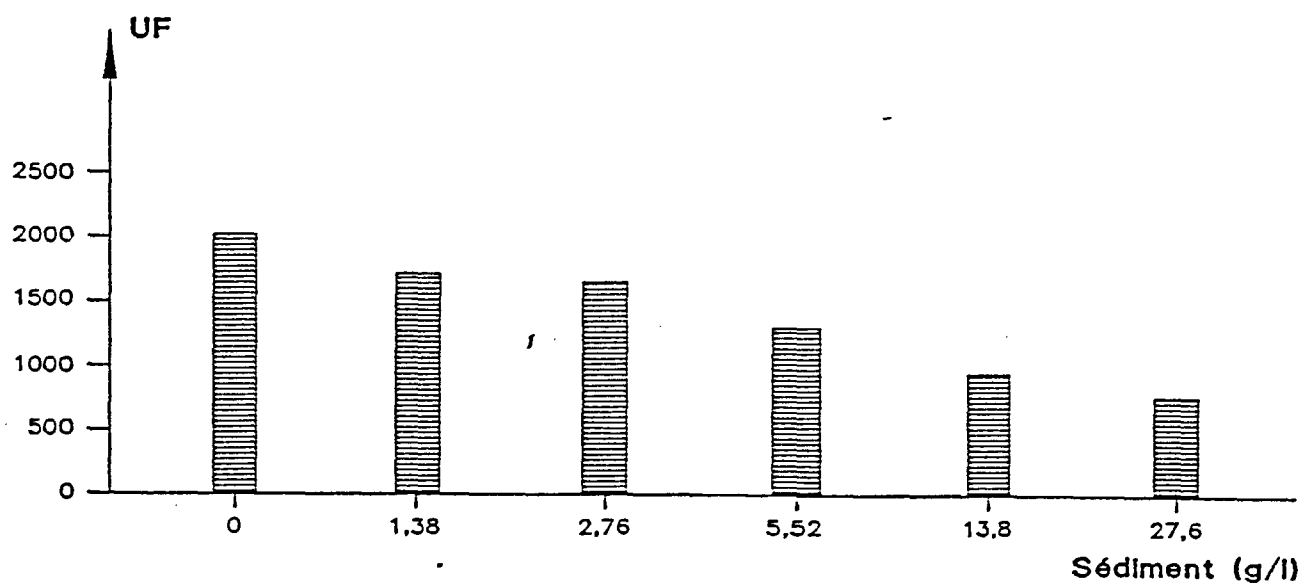
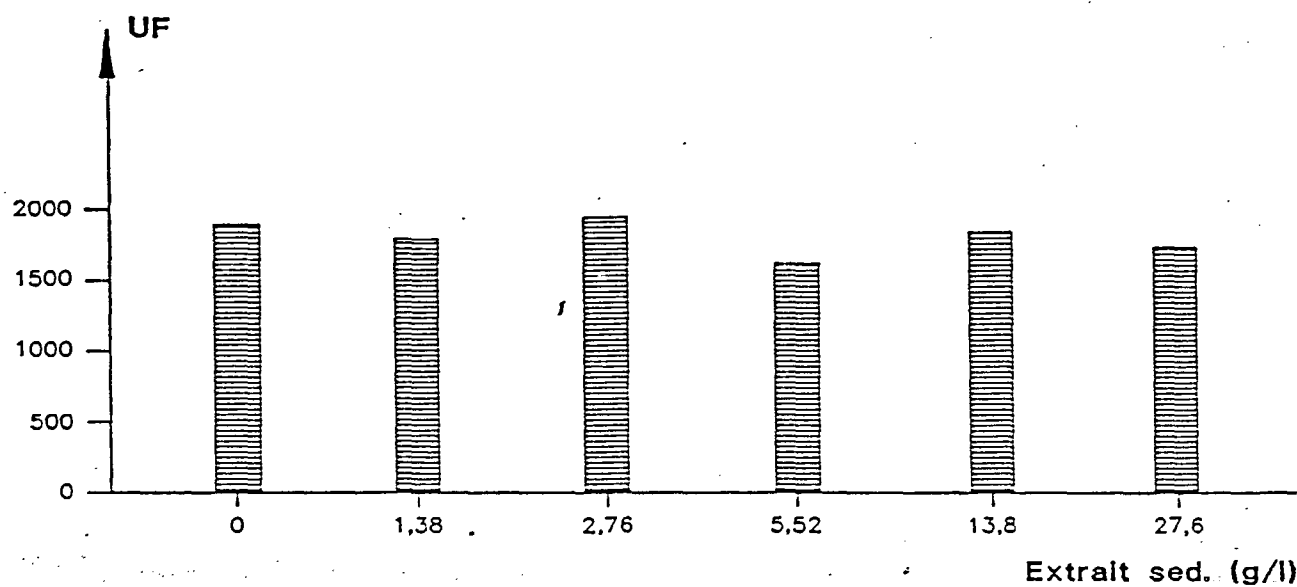


FIGURE 1 : 1a-Action des sédiments décantés (extrait de sédiment aqueux) sur la fluorescence de la résorufine. 1b-Action des sédiments avant décantation sur la fluorescence de la résorufine. UF : Unité de Fluorescence permettant de caractériser l'activité enzymatique.

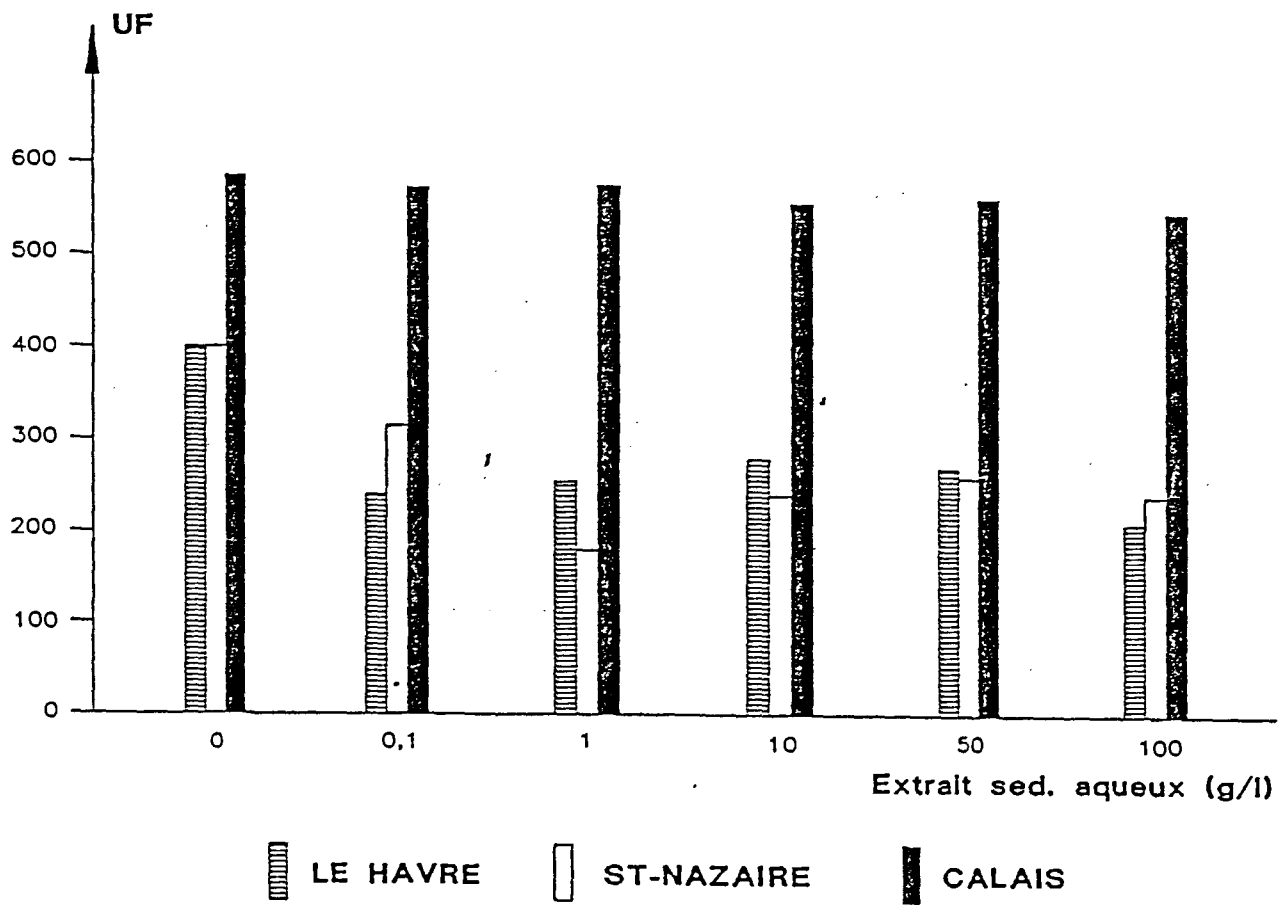
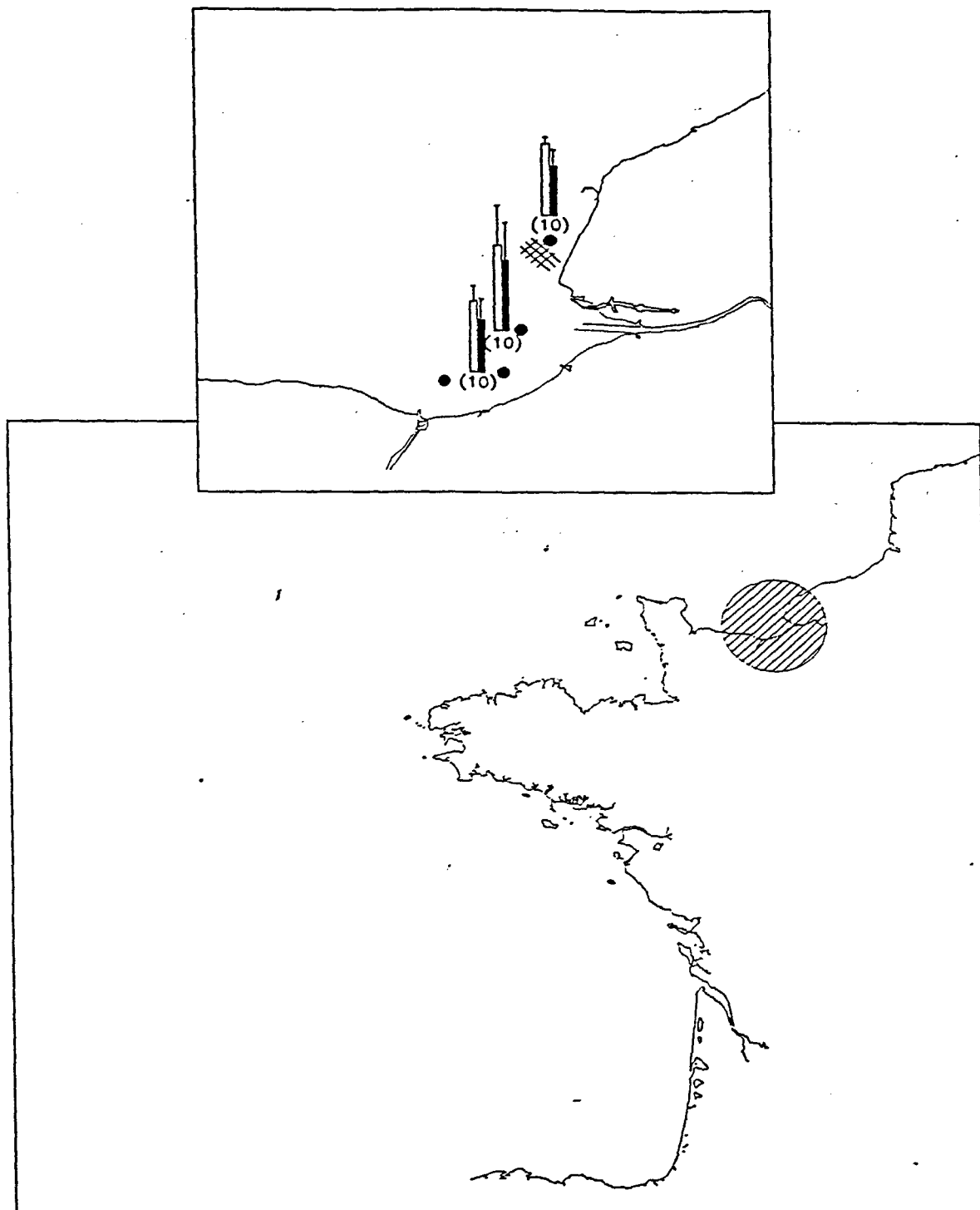


FIGURE 2 : Mesure de l'activité estérasique de cyanobactéries (*Calothrix*) en présence de concentrations croissantes de sédiment décanté (extrait sédiment aqueux) pour les sites de ST-NAZAIRE, LE HAVRE et CALAIS. UF (unité de fluorescence) est l'unité choisie pour exprimer l'activité enzymatique.



LIMANDA LIMANDA

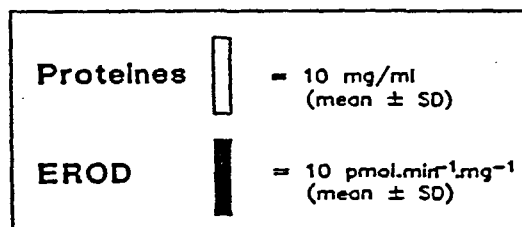


FIGURE 3 : Mesures d'activités enzymatiques EROD associées aux protéines dissoutes sur des Limandes (*Limanda limanda*) pêchées en Baie de Seine en Septembre 1993.

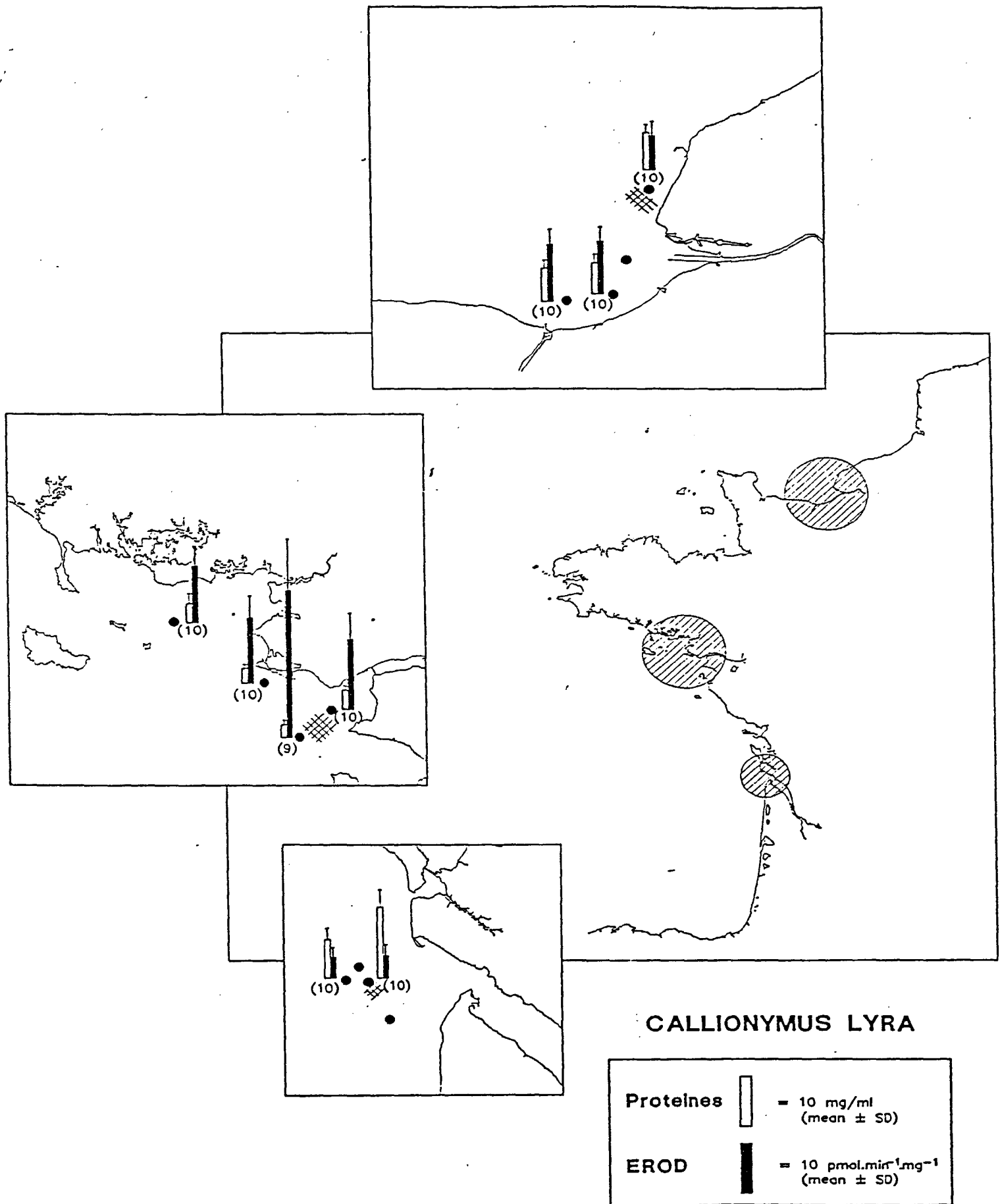


FIGURE 4 : Mesures d'activités enzymatiques EROD associées aux protéines dissoutes sur des Callionymes (*Callionymus lyra*) pêchés en Baie de Seine (Septembre 1993), dans l'estuaire de la Loire (Mai 1993) et en Gironde.(Octobre 1993).

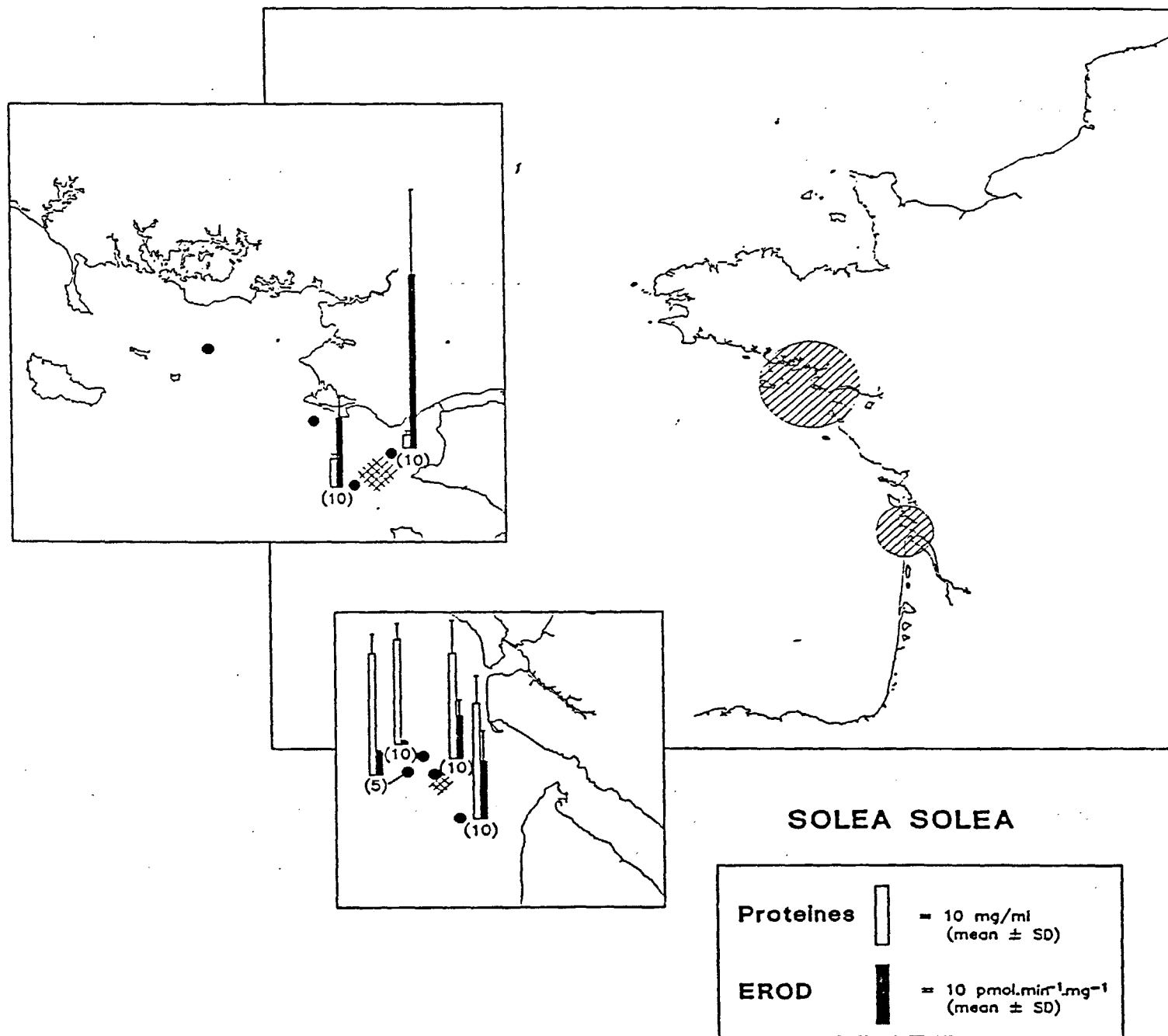
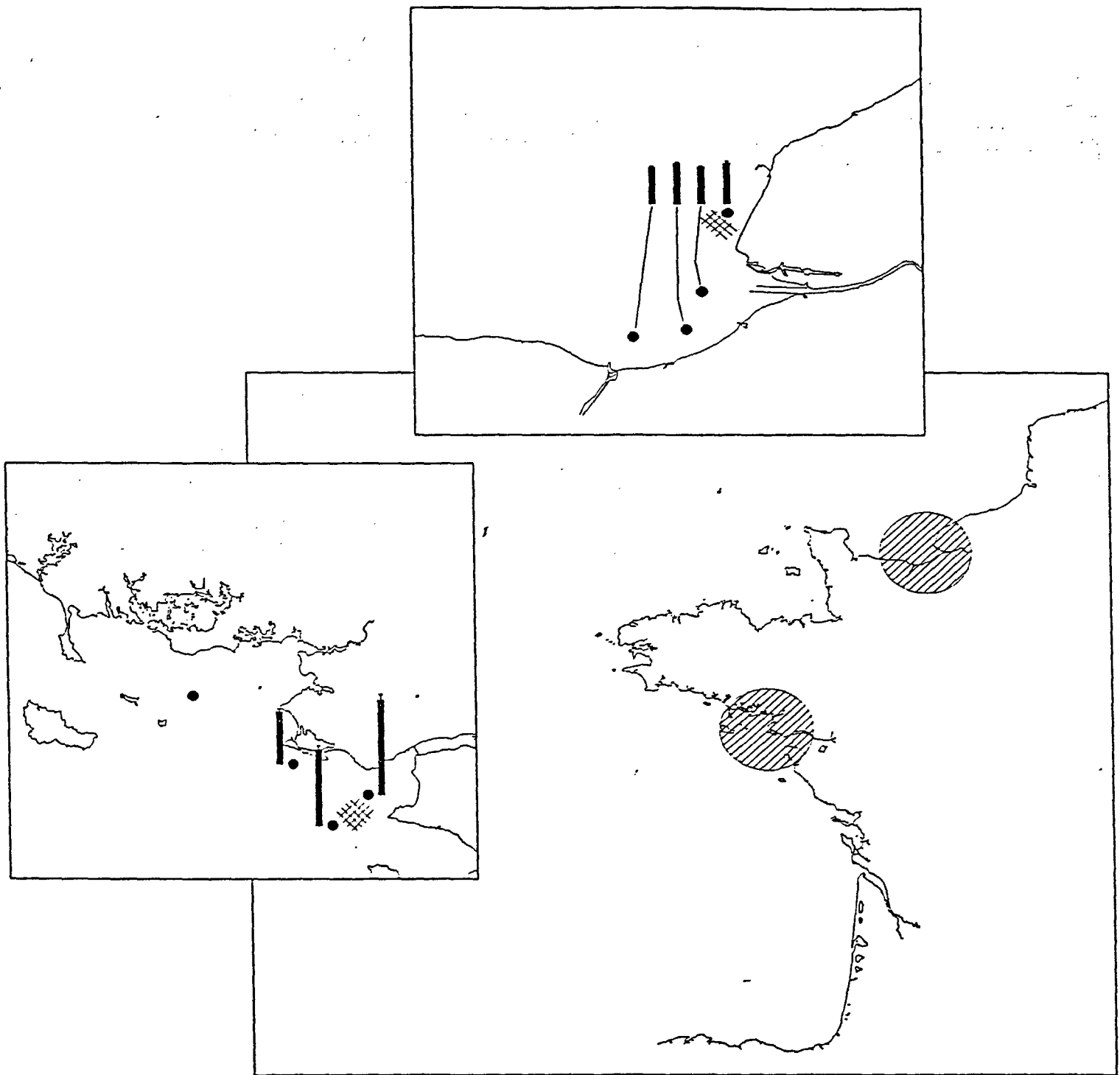


FIGURE 5 : Mesures d'activités enzymatiques EROD associées aux protéines sur des Soles (*Solea solea*) pêchées dans l'estuaire de la Loire (Mai 1993) et en Gironde (Octobre 1993).



CALLIONYMUS LYRA

AChE | = 1000 U.mgP⁻¹
(mean ± SD)

FIGURE 6 : Mesures d'activité AChE sur le callionyme (*Callionymus lyra*) en estuaire de Loire (Mai 1993) et Baie de Seine (Septembre 1993).

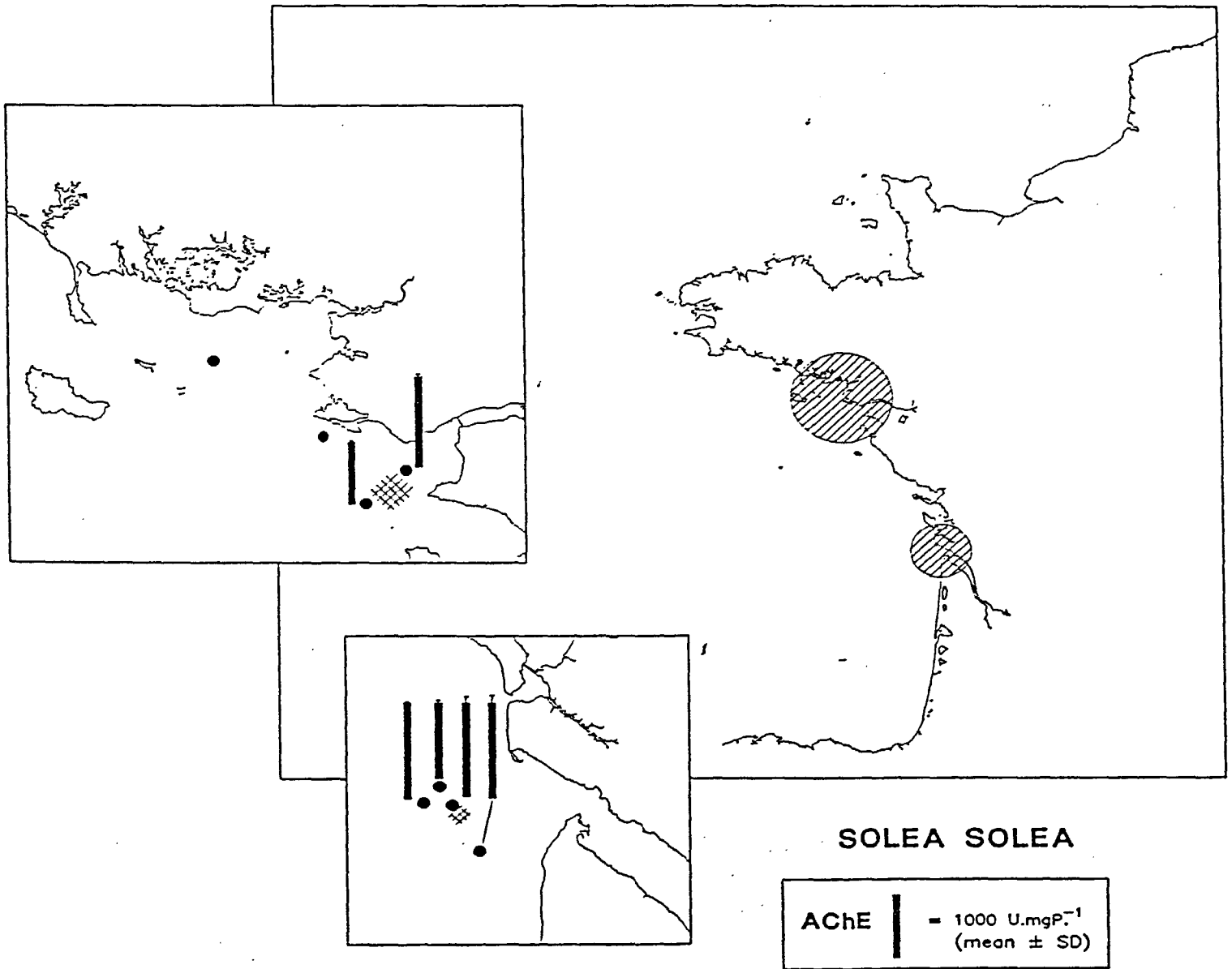


FIGURE 7 : Mesures d'activité AChE
Loire (Mai 1993) et Baie de Seine (Septembre 1993).

en estuaire de

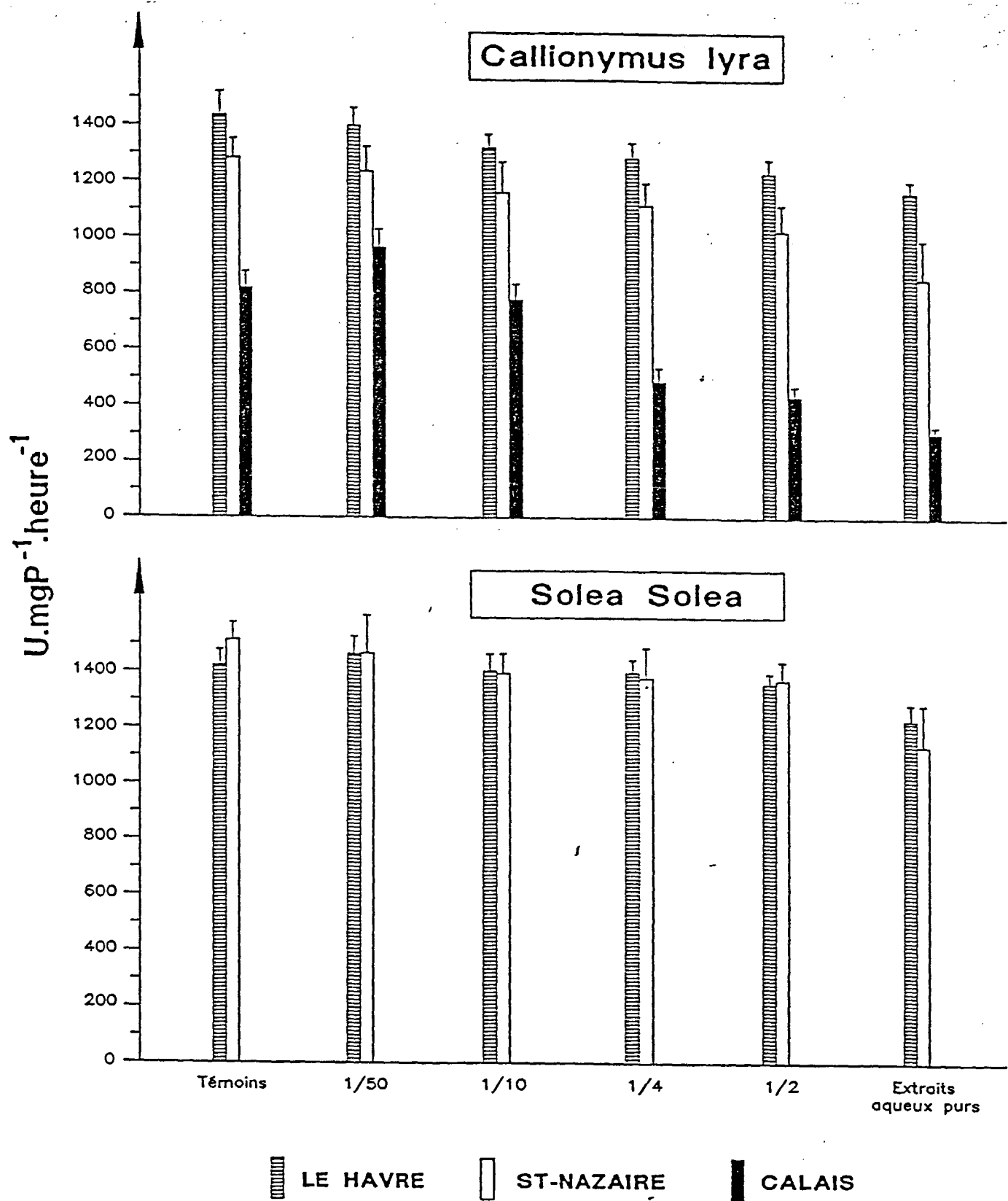


FIGURE 8 : Mesures des effets inhibiteurs *in vitro* de différentes dilutions d'un extrait aqueux de boue de dragage sur l'activité AChE d'extraits musculaires de callionymes et de soles.

ANNEXE 3

LABORATOIRE DE TOXICOLOGIE
UFR DE MEDECINE-PHARMACIE
AVENUE DE L'UNIVERSITE BP. 97
76800 SAINT ETIENNE DU ROUVRAY

IFREMER
LABORATOIRE D'ECOTOXICOLOGIE
CENTRE DE BREST BP. 70
29280 PLOUZANE

ETUDE DE L'ECOTOXICITE DE SEDIMENTS
DRAGUES
APPLICATION D'UN TEST PROTOZOAIRE MARIN

REALISATION : MADEMOISELLE LE DU ANNE

15 OCTOBRE 1993

INTRODUCTION

Les travaux présentés dans ce rapport s'inscrivent dans le programme GEODE supervisé par l'IFREMER et relatif aux sédiments dragués. Des analyses chimiques de nombreux échantillons de sédiments ont permis de définir un classement des sédiments dragués sur la base de leurs teneurs en métaux et en PCB, mais pas ou peu de données toxicologiques existent. Il a donc été décidé de mesurer la toxicité des sédiments de classe 2 par la voie de plusieurs bioessais afin d'appréhender le risque toxique potentiel de ces sédiments.

Pour sa part, le Laboratoire de Toxicologie de Rouen a mesuré la toxicité des sédiments dragués dans les ports de Calais, du Havre et de Nantes par un bioessai protozoaire mis au point dans ce même laboratoire.

MATERIELS ET METHODES

1) Le bioessai protozoaire

Le protocole défini par l'IFREMER préconisait d'utiliser le test protozoaire *Colpidium campylum* mis au point Dive & coll., (1991). Cet organisme est un protozoaire cilié d'eau douce, le test ne peut être effectué que sur de l'eau douce reconstituée ou de l'eau déminéralisée, de l'eau distillée etc ... Par conséquent, nous avons utilisé le test protozoaire *Pseudocohnilembus marinus* mis au point par Le Dû & coll., (1991). Il s'agit d'un petit cilié marin, isolé sur la côte de Virginie (Thompson, 1966).

Le principe de ce test protozoaire marin repose sur la mesure d'inhibition de croissance d'une population connue de ciliés, sous l'effet de toxiques. La population de chaque essai est déterminée par comptage automatique grâce à un compteur électronique de particules de type Coulter counter. Le pourcentage de croissance des essais par rapport aux témoins est défini, on calcule alors la CI50, c'est-à-dire la concentration qui inhibe 50% de croissance des essais par rapport aux témoins. Les paramètres de croissance ont été calculés par un programme informatique mis au point à l'INSERM U146 de Villeneuve d'Ascq, la CI50 est déterminée en traçant, sur papier log-probit, la droite des moindres carrés qui lie les concentrations de milieu toxique testées aux pourcentages d'inhibition de croissance observés.

Le protocole de test est schématisé à la figure 1. Le milieu utilisé pour la souche de collection, les précultures, les témoins et la dilution des toxiques est le milieu Grasshoff (Grasshoff mentionné par Aminot & Chassepied, 1983). Sa composition est : solution A, en mg/l - NaCl : 23900 ; Na₂SO₄ : 4000 ; KCl : 700 ; NaHCO₃ : 200 ; KBr : 100 ; H₃BO₃ : 30 ; NaF : 3 ; solution B en mg/l - MgCl₂ : 10800 ; CaCl₂, 2H₂O : 1500 ; SrCl₂, 6H₂O : 25 ; salinité 35‰, le milieu a été filtré sous vide à 0,45 µm et conservé à l'obscurité à 4°C. Pour la réalisation des précultures et des essais, une quantité suffisante de milieu était mise à l'étuve à 28°C (température de réalisation du test), 24 heures avant utilisation. *Pseudocohnilembus marinus*, comme beaucoup de ciliés est bactériophage. La source de nourriture utilisée pour la souche de "collection", les précultures et les essais est une bactérie lyophilisée *Aerobacter aerogenes* (Sigma A6634), remise en suspension dans du milieu Grasshoff à la concentration de 2,5 mg/ml de bactéries. Le produit de référence utilisé est le cadmium (CdCl₂, Aldrich, 99,99% de pureté).

Figure 1 : schéma du protocole du test protozoaire marin *Pseudocohnilembus marinus*

souche dite de "collection"

- * erlenmeyers stériles de 500 ml
- * temps de génération de l'ordre de 6 jours
- * utilisation de souches âgées de 2 à 6 semaines

- * qsp de milieu Grasshoff pour un volume final de 50 ml
- * 10 ml de suspension bactérienne
- * qsp de la souche antérieure pour obtenir un inoculum initial de 6000 cellules par ml
- * 4°C, obscurité
- * repiquage toutes les 6 semaines



préculture

- * erlenmeyers stériles de 500 ml
- * temps de génération : 4-5 heures

- * qsp de milieu Grasshoff pour obtenir un volume final de 50 ml
- * 10 ml de suspension de bactéries
- * qsp de la souche de "collection" pour un inoculum initial de 1000 cellules/ml
- * 28°C, obscurité
- * 24 heures



essais

- * acuvettes coulter
- * temps de génération : 4-5 heures

- * 4 ml de milieu toxique ou de contrôle (Grasshoff)
- * 0,25 ml de suspension bactérienne
- * 0,75 ml de dilution de la culture de *Pseudocohnilembus marinus*, à 3333 cellules/ml pour obtenir un inoculum initial de 500 cellules/ml
- * 28°C, obscurité
- * 24 heures



Après 24 heures d'incubation à 28°C, l'ensemble des essais et des témoins est fixé par

de la glutaraldéhyde (Merck, solution pour microscopie électronique à 25%) diluée à 5%, puis, après ajout de 10ml de NaCl à 1% et agitation, le nombre de cellules dans chacun des flacons est compté grâce à un compteur de particules.

L'ensemble des calculs des concentrations d'organismes sont identiques à ceux du test *Colpidium campylum* et se trouvent expliqués dans l'article de Dive & coll., (1991), fourni en annexe.

2) Sites de prélèvement, stockage des échantillons

Trois sites ont été étudiés par le Laboratoire de Toxicologie de l'Université de Médecine-Pharmacie de Rouen : le port de Calais, le port du Havre et le port de Nantes.

Les sédiments ont été envoyés par transporteurs au laboratoire dans des flacons de verre ou de plastique selon les organismes de prélèvement, conservés à l'abri de la lumière et de l'air à température basse grâce à des blocs de glace.

Dès leur arrivée, les flacons ont été entreposés à 4°C, à l'obscurité, à l'abri de l'air. Les expérimentations ont été effectuées dans les 20 jours suivant la réception des échantillons tel que le préconisait le protocole de l'IFREMER.

3) Détermination du poids sec des échantillons de sédiments

Dès réception, 50 g de sédiments humides ont été placés à l'étuve à 28°C afin de déterminer le poids sec de sédiments des échantillons. Des pesées régulières ont été faites jusqu'à l'obtention d'un poids stable de l'échantillon.

4) Préparation des échantillons, gamme de toxicité utilisée

La préparation des échantillons de sédiments a été effectuée selon le protocole préconisé par l'IFREMER tant pour l'étude de la toxicité intrinsèque des sédiments que pour l'étude du relargage potentiel de toxiques à partir de ces sédiments.

Cependant, le comptage des protozoaires par un compteur électronique de particules suppose une filtration préalable (0,45 µm) des échantillons à tester. Afin de concilier les exigences du protocole défini par l'IFREMER et celles requises par le test protozoaire marin *Pseudocohnilembus marinus*, nous avons effectués systématiquement, en parallèle avec la même souche, un test sur échantillon non filtré et un test sur échantillon filtré afin de définir l'impact des particules de sédiments lors des comptages des essais et le biais qu'elles pouvaient entraîner dans la détermination de la CI50. Pour chaque site, les expériences ont été répétées deux fois avec des souches différentes d'organismes.

De plus, nous avons effectué pour chaque site, une étude du relargage de toxiques par acidification. Pour cette étude, 100 mg de sédiments ont été mis en suspension dans 1 litre de milieu Grasshoff, le pH a alors été mesuré et ramené à 5,5+/-0,3 par une solution d'HCl 1N. La

suspension obtenue a été agitée pendant 12 heures, le pH a alors été mesuré et ramené à sa valeur initiale avant l'acidification. Après une décantation de 3 heures, la suspension a été testée selon le protocole utilisé pour l'ensemble de l'étude de relargage. Les expériences d'acidification n'ont été effectuées qu'une fois.

La gamme de concentrations de suspension de sédiments étudiée pour l'ensemble des sites et des expériences a été : 0 ; 0,05 ; 0,5 ; 5 ; 50 ; 100 mg/l.

RESULTATS ET DISCUSSION

1) Paramètres de test

Les paramètres de test sont les mesures de la croissance et de la sensibilité au produit de référence des souches de protozoaires utilisées pour l'ensemble des expériences.

Ces résultats sont présentés au tableau 1.

Tableau 1 : paramètres de croissance et de sensibilité du test protozoaire marin *Pseudocohnilembus marinus*

| | précultures nombre de cellules/ml | inoculum nombre de cellules/ml | témoins nombre de cellules/ml | témoins nombre de générations | cadmium CI50 mg/l |
|---|---|--|--|--|---|
| mesures | 99638 126188 56981 62784 72161 55224 | 486 718 644 583 568 726 | 38004 52475 40453 44578 50399 45386 | 6.30 6.20 5.99 6.27 6.48 5.98 | ND 0.060 0.050 0.041 0.040 0.033 |
| moyennes = m | 78829 | 620 | 45215 | 6.20 | 0.045 |
| écart-type = Sn-1 | 28327 | 93 | 5562 | 0.19 | 0.010 |
| coefficient de variation en % = m/Sn-1 | 35.94 | 15.00 | 12.30 | 3.11 | 23.27 |
| nombre de valeurs considérées | 6 | 6 | 6 | 6 | 5 |

D'après ces résultats, il apparaît que le nombre de générations des témoins est proche de celui déjà obtenu pour l'ensemble des expériences effectuées avec le test *Pseudocohnilembus marinus* (Le Dû, 1992), de même le nombre de cellules/ml des précultures est toujours difficilement maîtrisé, tel que l'atteste le coefficient de variation élevé (35.94%) obtenu. Par contre l'ensemble des autres paramètres du test présentent une bonne reproductibilité dans la

mesure où le coefficient de variation est inférieur ou peu éloigné de 20% qui est une limite généralement acceptée pour les essais biologiques. Les valeurs de CI50 du cadmium sont élevées par rapport à celles obtenues en moyenne avec cet organisme, au cours des travaux précédents (Le Dû, 1992). Une erreur dans la pesée du sel de cadmium a pu avoir lieu lors de la réalisation de la solution mère, mais, nous ne disposons ici que de cinq résultats ce qui est peu. De même, le nombre total de mesures qui ont été effectuées avec cet organisme sur le cadmium est restreint, rien ne permet donc de rejeter ces expériences.

Comme pour le test *Colpidium campylum* qui a servi de modèle à l'élaboration du test *Pseudocohnilembus marinus*, l'inoculum théorique de 500 cellules/ml n'est obtenu qu'avec un très grand nombre de mesures (Dive & coll., 1990). Ceci est probablement dû à la difficulté d'obtenir une bonne homogénéisation des suspensions de ciliés. Ce sont des organismes aérophiles qui ont tendance à se maintenir à la surface dans les flacons de culture.

Pour résumer, le test *Pseudocohnilembus marinus* n'a été validé que par un petit nombre de mesures de toxicité sur quelques produits toxiques, par conséquent, seul le nombre de générations des témoins, qui a lui été validé à plusieurs reprises, permet de considérer les expériences effectuées au cours de cette étude comme acceptables.

2) Les mesures de CI50 des sédiments des sites de Calais, Le Havre et Nantes

* Résultats des mesures du poids sec de sédiments des échantillons étudiés

Ces valeurs sont présentées dans le tableau 2 pour les trois sites étudiés.

Tableau 2 : résultats des mesures du poids sec des échantillons testés

| | Calais | Le Havre | Nantes |
|---------------------------------|--------|----------|--------|
| poids humide en g | 50 | 50 | 50 |
| poids sec en g | 16.78 | 23.63 | 29.94 |
| % de matière sèche de sédiments | 33.56 | 47.26 | 59.88 |

* Résultats des mesures de CI50 des sédiments des sites de Calais, Le Havre et Nantes

Le tableau 3 présente les résultats des mesures de CI50 des sédiments des trois sites portuaires étudiés selon le protocole de la toxicité intrinsèque des sédiments, de leur toxicité par relargage et de leur toxicité par relargage après acidification. Pour chaque protocole, les mesures ont été faites sur des suspensions de sédiments non filtrées et filtrées, inoculés avec la même souche de protozoaire pour chaque répétition d'expérience.

Tableau 3 : mesures des CI50 des sédiments des trois sites étudiés

| | mesures : CI50 en mg/l de sédiments | |
|---|-------------------------------------|------|
| Calais : toxicité intrinsèque | | |
| * échantillon non filtré | >100 | >100 |
| * échantillon filtré | >100 | >100 |
| Calais : toxicité par relargage | | |
| * échantillon non filtré | >100 | >100 |
| * échantillon filtré | >100 | >100 |
| Calais : toxicité après acidification | | |
| * échantillon non filtré | >100 | |
| * échantillon filtré | >100 | |
| Le Havre : toxicité intrinsèque | | |
| * échantillon non filtré | >100 | >100 |
| * échantillon filtré | >100 | >100 |
| Le Havre : toxicité par relargage | | |
| * échantillon non filtré | >100 | >100 |
| * échantillon filtré | >100 | >100 |
| Le Havre : toxicité après acidification | | |
| * échantillon non filtré | >100 | |
| * échantillon filtré | >100 | |
| Nantes : toxicité intrinsèque | | |
| * échantillon non filtré | >100 | >100 |
| * échantillon filtré | >100 | >100 |
| Nantes : toxicité par relargage | | |
| * échantillon non filtré | >100 | >100 |
| * échantillon filtré | >100 | >100 |
| Nantes : toxicité après acidification | | |
| * échantillon non filtré | >100 | |
| * échantillon filtré | >100 | |

Les résultats des mesures de CI50, dans tous les cas de figure testés, montrent qu'aucune toxicité n'a été détectée par le test protozoaire marin *Pseudocohnilembus marinus* pour aucun des trois sites portuaires considérés.

Il est peu probable que la sensibilité du test *Pseudocohnilembus marinus* soit à remettre en question, cet organisme a déjà montré sa sensibilité et sa capacité de discrimination tant sur

produits purs que sur échantillons naturels (Le Dû, 1992). Par contre, ce type d'échantillons (sédiments) n'est pas recommandé pour ce test. En effet, le fait de travailler sur des suspensions de particules solides de petite taille non filtrées est très délicat, car au cours du comptage, il y a une très grande interférence avec le dénombrement des organismes-test. D'autre part, les expériences faites sur les échantillons filtrés n'ont pas révélé d'inhibition de croissance des organismes, il n'était donc pas nécessaire de faire une correction du biais dû aux particules de sédiments pour chacune des concentrations testées. De plus, la filtration à 0,45 µm a probablement retenu beaucoup des toxiques qui se trouvaient sous forme précipités ou adsorbés sur les particules en suspension. Dans ce cas, seuls les toxiques en solution ont pu agir sur le protozoaire; dès lors, du fait des résultats obtenus, soit la quantité de toxiques relargables était très réduite, auquel cas les sédiments sont effectivement non toxiques pour la faune de la colonne d'eau, soit, du fait de la richesse minérale du milieu Grasshoff, des réactions d'adsorption, de complexation et de précipitation se sont produites et ont ainsi rendu les toxiques non biodisponibles pour le protozoaire.

Seule l'analyse chimique des échantillons étudiés ainsi que les résultats obtenus par les autres biotests permettront de connaître d'une part la richesse totale des échantillons en xénobiotiques d'autre part, la sensibilité relative du test *Pseudocohnilembus marinus* dans les conditions de protocole suivies.

CONCLUSION

L'analyse toxicologique de sédiments de trois sites portuaires (Calais, Le Havre et Nantes) par le test protozoaire marin *Pseudocohnilembus marinus* n'a révélé aucune toxicité des échantillons testés tant du point de vue de la toxicité directe que de celui de la toxicité par relargage avec ou sans acidification des échantillons.

Cependant, il faut impérativement noter la difficulté d'étude d'échantillons de cette nature avec le test protozoaire *Pseudocohnilembus marinus*. En effet, le comptage des organismes se fait grâce à un compteur électronique de particules, par conséquent, il faut filtrer les échantillons (0,45 µm) pour pouvoir faire un comptage sans interférences avec les particules solides. Or, avec les sédiments, le risque toxique réside essentiellement dans le fait des microparticules solides ingérées par les organismes et sur lesquelles les xénobiotiques se fixent par diverses réactions chimiques. Dans le cadre du protocole de test, il n'était pas possible de faire une détection de l'impact de la toxicité des sédiments dans leur globalité car les interférences entre les particules solides et les organismes-test ont été très nombreuses lors du comptage des essais effectués sur les suspensions de sédiments non filtrés. Les suspensions de sédiments filtrées ne se sont pas révélées toxiques ce qui laisse supposer que soit le protozoaire *Pseudocohnilembus marinus* est peu sensible aux toxiques présents dans ces sédiments, soit il y avait effectivement peu de toxiques relargables dans ces échantillons, soit que les éléments relargués ont réagi avec le milieu Grasshoff qui est très minéralisé, soit enfin, que des antagonismes se sont produits entre les divers toxiques, de tels phénomènes d'interaction qui ont déjà été montrés par divers auteurs (Vasseur & coll., 1988 ; Bonnemain & Dive, 1990 ; Hansen & coll., 1990 ; Le Dû & coll., 1990). Une alternative aux problèmes de comptage était d'effectuer les comptages des organismes au microscope, mais ce procédé est laborieux et contraire à l'application en routine du test. De plus, il aurait été nécessaire d'effectuer une calibration des résultats obtenus par le comptage au microscope avec ceux obtenus par le comptage électronique, ceci ne rentrait pas dans le cadre de l'étude. Ces résultats ne pourront prendre leur valeur que dans le cadre d'une comparaison avec l'ensemble des bioessais effectués lors de cette étude et avec les résultats de l'analyse chimique.

REFERENCES

- Bonnemain H., Dive D., 1990, Studies on synergistic toxic effects of copper and dithiocarbamates pesticides with the ciliate protozoan *Colpidium campylum* Stokes, Ecotoxicol. Environ. Saf., 19, 320-326.
- Dive D., Blaise C., Robert S., Le Dû A., Bermingham N., Cardin R., Kwan A., Legault R., Mc Carthy L., Moul D., Veilleux L., 1990, Canadian workshop on the *Colpidium campylum* ciliate protozoan growth inhibition test, Angewandte Zoologie, 76, 1, 49-64.
- Dive D., Blaise C., Le Dû A., 1991, Standard protocol proposal for undertaking the *Colpidium campylum* ciliate protozoan growth inhibition test, Angewandte Zoologie, 78, 1, 80-90.
- Grasshoff cité par Aminot A., Chassepied M., 1983, Manuel des analyses chimiques en milieu marin, CNEXO, 395 pp.
- Hansen A.M., Leckie J.O., Mandelli E.F., Altmann R.S., 1990, Study of copper II association with dissolved organic matter in surface waters of three Mexican Coastal Lagoons, Environ., Sci., Technol., Vol. 24, N° 5, 683-688.
- Le Dû A., Dive D., Philippo A., 1990, Interactions between components of electroplating industry waste. Influence of receiving water on the toxicity of the effluent, Environ. Pollut., 65, 251-267.
- Le Dû A., Farhat F., Lacroix G., Baille P., Guerbet M., Jouany J.M., 1992, *Pseudocohnilembus marinus* : a protozoan test in the service of marine assessment, XXXI^{ème} Congrès du GPLF, Nédde-Le-Chateau, 25-28 Mai.
- Le Dû A., 1992, Application de tests protozoaires dans l'évaluation du risque en milieu aquatique, Thèse de Docteur es Sciences, option Ecotoxicologie, Université de Rouen, 191 pp.
- Thompson J.C.Jr, 1966, *Pseudocohnilembus marinus* n.sp., a hymenostome ciliate from the Virginia coast, J. Protozool., 13 (3), 463-465.
- Vasseur P., Dive D., Sokar Z., Bonnemain H., 1988, Interactions between copper and some carbamates used in phytosanitary treatments, Chemosphere, 17 (4), 767-782.

ANNEXE 4

ETUDE DE LA TOXICITE DES SÉDIMENTS PORTUAIRES DE CALAIS, DU HAVRE ET DE SAINT NAZAIRE À L'AIDE DES GAMÈTES ET DES EMBRYONS DE L'HUÎTRE CREUSE, *CRASSOSTREA GIGAS* (THUNBERG).

Françoise QUINIOU et Edouard HIS

DEL/EX - IFREMER BREST et ARCACHON

1. INTRODUCTION

Le présent travail a pour objectif de déterminer la toxicité de sédiments dragués avant leur rejet en mer. Cette étude entre dans le plan de travail du groupe GEODE afin d'évaluer la toxicité potentielle de sédiments immergés, selon les recommandations de la convention d'Oslo.

Trois sédiments provenant des ports de Calais, Le Havre et Saint Nazaire ont été testés à l'aide du test développement embryonnaire de bivalve choisi en raison de sa grande sensibilité à la qualité du milieu (Woelke, 1972 ; His et Robert, 1986).

Les sédiments et leurs extraits aqueux ont été testés de trois manières sur le développement embryonnaire de l'huître creuse *Crassostrea gigas* :

- effet sur le développement embryonnaire lorsque le bio-essai est réalisé avec des oeufs embryonnés 15mn après la fécondation : "embryotoxicité".

- effet sur la fécondation et le développement embryonnaire, jusqu'au stade larve D en eau de référence, après 15 mn de pré-traitement du sperme dans les milieux à tester : "spermiotoxicité".

- effet sur la fécondation et le développement jusqu'au stade larve D, lorsque la fécondation et le développement se déroulent dans les milieux à tester : "fécondation et embryotoxicité".

2. MATERIEL ET METHODES

2.1. Préparation des sédiments

2.1.1. Extraits aqueux

Dans les trois cas, 50 g de sédiment frais ont été mis en suspension dans un litre d'eau de mer de référence filtrée à 0,2 μm , par agitation magnétique, à température ambiante ($20 \pm 1^\circ\text{C}$), pendant 12h. Après arrêt de l'agitation magnétique et décantation de 3h, le surnageant a été récupéré pour préparer les différentes concentrations testées :

- 0 g/l : témoins = eau de mer référence à la salinité de 30 ‰, filtrée à 0,2 μm).
- 50 g/l : surnageant ou "extrait aqueux" sans dilution.
- 5 g/l : 100 ml de surnageant dans un litre d'eau de mer filtrée.
- 0,5 g/l : 10 ml de surnageant " "
- 0,05 g/l : 1 ml de surnageant " "

2.1.2. Contact direct avec le sédiment : "sédiment contact".

Une solution de 50g/l de sédiment frais a été préparée puis, les différentes concentrations (0 g/l ; 0,05 g/l ; 0,5 g/l ; 5 g/l) ont été réalisées par dilution au 1/10^{ième}, directement dans les récipients d'élevage.

2.2. Bio-essais

2.2.1. Mise en incubation des oeufs fécondés : "Embryotoxicité".

Des huîtres mûres ont été prélevées dans le bassin d'Arcachon. Dans l'heure qui a suivi, l'émission des gamètes a été induite par chocs thermiques (passages alternatifs en eau de mer à 28°C et 18°C à intervalles d'une demi-heure) et par stimulation chimique (action d'une suspension de gamètes prélevés sur des sujets sacrifiés).

Lorsque le frai a été induit simultanément chez au moins un mâle et une femelle, les géniteurs ont été choisis en fonction de la qualité de leurs gamètes : ovocytes pyriformes, réguliers et spermatozoïdes très mobiles. Chaque géniteur a été placé séparément dans un bécher contenant de l'eau de mer filtrée à 0,02 μm .

Les ovocytes ont été dénombrés afin de les répartir ultérieurement en quantités égales aux différentes concentrations testées et fécondés à l'aide d'une suspension dense de sperme.

Ce dernier a été ajouté de façon à pouvoir observer au microscope, une dizaine de spermatozoïdes actifs , en plaque équatoriale, autour de chaque ovocyte.

Dans le quart d'heure qui a suivi les fécondations, les oeufs fécondés ont été répartis à la pipette automatique aux différentes concentrations testées, à raison de 600 par pot à usage unique en polystyrène cristal.

2.2.2. Pré-traitement du sperme : "Spermiotoxicité".

Les gamètes ont été recueillis et sélectionnés de la même façon que précédemment.

Après dénombrement, les ovocytes sont répartis à la pipette automatique dans des pots de polystyrène cristal contenant 30ml d'eau de mer référence. Alors que le sperme (très dense) est introduit dans les différentes concentrations à tester. Après 15mn de contact, 50µl de chaque solution de sperme, ainsi pré-traité, sont ajoutés aux ovocytes afin de réaliser les fécondations en milieu propre.

2.2.3. Effets sur la fécondation et le développement embryonnaire.

La sélection des gamètes a été réalisée de la même façon que pour les essais précédents.

La répartition des ovocytes et du sperme est effectuée simultanément dans les milieux à tester afin que l'effet des "contaminants" agisse sur les gamètes au moment de la fécondation puis pendant tout le développement embryonnaire.

2.2.4. Incubation et observations.

Les différents milieux à tester ont été mis en incubation à $24^{\circ} \pm 1^{\circ}\text{C}$ pendant 24 heures. Période après laquelle, le contenu de chaque pot a été fixé au formol neutre pour les observations.

Il faut enfin préciser que ces expériences ont été effectuées en triple exemplaire à la salinité de 30‰.

Les observations ont été effectuées, directement dans les pots ou sur un échantillon prélevé après homogénéisation, à l'aide d'un microscope inversé d'Utermöhl au grossissement de 200. L'absence de filtration ou de rétention sur un tamis évite la perte de matériel biologique qui pourrait perturber les résultats (passage à travers le tamis d'embryons en décomposition).

Les anomalies larvaires ont été dénombrées sur deux fois cent individus par répliquât, elles ont concerné :

- les oeufs fécondés non segmentés et les embryons au développement incomplet ou anormal.
- les larves D présentant elles-mêmes des anomalies (charnière convexe ; commissure des valves de la coquille échancrée ; une valve incomplètement formée ; le *vélum* non entièrement rétractable dans la coquille).

3. RÉSULTATS

Les résultats (tableau 1) sont exprimés en pourcentages bruts d'anomalies larvaires (PBA), avec erreur standard, aux différentes concentrations.

Les taux peu élevés, d'anomalies larvaires, observés dans les élevages témoins ($7,6 \pm 0,8$ et $15,5 \pm 1,1$) témoignent de la bonne qualité de l'eau de mer référence et des gamètes utilisés au cours de ces bio-essais.

Les graphes de la figure 1 donnent les effets des sédiments et de leurs extraits aqueux testés observés pour les divers bio-essais. Afin de pouvoir comparer les deux séries de tests, les pourcentages bruts d'anomalies (PBA) ont été transformés en pourcentages nets d'anomalies (PNA), selon la formule de Abbott (Anonyme, 1980).

$$\text{PNA} = (\text{PBA essai} - \text{PBA témoin} / 100 - \text{PBA témoin}) \times 100$$

3.1. Action des extraits aqueux

3.1.1. Embryotoxicité.

Un phénomène d'hormèse (Stebbing, 1972), peu marqué, est observé avec le sédiment du Havre et de St Nazaire, aux plus faibles concentrations (0,05 et 0,5g/l).

Aux teneurs plus élevées, l'action des sédiments est peu marquée (moins de 20% d'anomalies larvaires à la concentration la plus élevée) ; seul le sédiment de Calais, qui se caractérise par un PNA de 98,2 semble fortement toxique.

3.1.2. Spermioxicité.

Toutes les concentrations entraînent un léger effet toxique mais, toujours faible et inférieur à un PNA de 18.

Dans tous les cas, les taux de fécondation sont similaires à ceux dénombrés dans les témoins.

3.2. Action du contact direct avec les sédiments : "sédiment-contact".

3.2.1. Spermioxicité

Lorsque le sperme a été mis en contact avec le sédiment, avant la réalisation des fécondations, les trois concentrations les plus basses (0,05 ; 0,5 et 5g/l) donnent des PNA de 11 à 20 pour les trois sédiments. Notons que celui de Calais est légèrement plus efficace que les deux autres.

Les essais réalisés à 50g/l montrent un gradient net des effets en fonction du sédiment testé : Le Havre génère un PNA 18, Saint Nazaire voit son taux d'anomalies atteindre 31,4% (25,7% correspondant à des embryons n'ayant pas développé de coquille) et Calais entraîne un pourcentage d'anomalies de 55% dont 52,2% d'embryons.

On voit ici que le sédiment de Calais est assez fortement toxique puisque 15mn de pré-traitement du sperme suffisent à affecter le développement embryonnaire dans plus de 50% des cas.

3.2.2. Embryotoxicité.

Le phénomène d'hormèse se manifeste de nouveau dès la valeur de 0,05g/l sur le site de Calais, alors que la toxicité est peu marquée à cette valeur, sur les autres lieux de prélèvement (PNA = 4 et 2,3 au Havre et à St Nazaire respectivement.) ; elle est cependant supérieure à celle qui a été observée en présence d'extrait aqueux à la même concentration.

Dès la valeur de 0,5 g/l, l'effet de nuisance est nettement plus élevé, en particulier sur les sites du Havre et de St Nazaire (PNA = 13,7 et 17,0 respectivement).

Au dessus de cette teneur, le sédiment de Calais se révèle de nouveau le plus toxique (PNA = 98,3 à 5g/l). De la même façon , le sédiment de St Nazaire exerce une action délétère, puisque le pourcentage de 80,5% est atteint à 5 g/l, alors que l'action sur le site du Havre, quoique franchement marquée est moins importante (48,6 %).

On retrouve le même gradient de toxicité que celui observé pour la spermioxicité : Calais >> Saint Nazaire > Le Havre. Pratiquement toutes les végétales sont anormales dans les trois cas à la plus forte teneur en sédiment 50g/l.

3.2.3. Action sur la fécondation et le développement embryonnaire.

Les bio-essais réalisés en "sédiment-contact" donnent des réponses très proches des tests "d'embryotoxicité" : un phénomène d'hormèse à 0,05g/l pour les sédiments de Calais et Saint Nazaire alors que celui du Havre semble légèrement plus toxique.

Comme pour l'embryotoxicité, les effets des trois sédiments augmentent nettement pour la concentration de 5g/l, taux d'anomalies > 50% (PNA respectivement 82,3 ; 52,6 et 56,2 pour Calais, Saint Nazaire et Le Havre).

A la concentration la plus élevée (50g/l) toutes les végétales sont anormales et quasiment aucune n'a dépassé le stade embryonnaire.

4.CONCLUSION

Les données relatives à l'action du sédiment mis en contact directement avec les oeufs embryonnés de *Crassostrea gigas*, permettent de montrer nettement que le sédiment de Calais libère la plus forte toxicité, ainsi que l'indiquait déjà l'action de l'extrait aqueux à la plus forte concentration testée. Puis viennent dans l'ordre le sédiment de St Nazaire et enfin celui du Havre. Il faut enfin souligner que dans les trois cas, il y a une perturbation nettement marquée du développement embryonnaire et de la formation des larves D de *Crassostrea gigas*, à la plus forte concentration testée.

Lorsque la fécondation et le développement embryonnaire se déroulent en présence du sédiment (sédiment-contact), les réponses sont très proches de celles obtenues avec les oeufs embryonnés.

Le pré-traitement du sperme par les extraits aqueux modifie peu le développement embryonnaire et ne permet pas de différencier les trois sites, alors que la mise en contact avec le sédiment (sédiment-contact) induit un effet très net qui donne le même gradient de toxicité que les tests sur les oeufs embryonnés.

En conclusion nous pouvons dire que les différents tests permettent de classifier les trois sédiments selon un gradient : **Calais >> Saint Nazaire > Le Havre**. Le sédiment provenant de Calais a, de plus, une aptitude à libérer des "contaminants" dans l'extrait aqueux qui altèrent fortement le développement embryonnaire de l'huître. Par ailleurs, une gamme de concentrations plus resserrées entre 5 et 50g/l permettrait de déterminer la concentration de l'extrait aqueux qui engendrerait 50% d'anomalies.

BIBLIOGRAPHIE

His. E. & Robert. R. - 1986 : Utilisation des élevages larvaires de *Crassostrea gigas* en écotoxicologie marine. *Haliotis*, 15, 301-308.

Stebbing. A.R.B. - 1982 : Hormesis - The stimulation of growth by low levels of inhibitors. *The Science of the Total Environment*, 22, 213-224.

Woelke. C.H. - 1972 : Development of a receiving water quality bioassay criterion based on the 48hours pacific oyster (*Crassostrea gigas*) embryo. *Washington Department of Fisheries*. report N° 9, 93pp.

| Bioessais | Conc. g/l | CALAIS | ST NAZAIRE | LE HAVRE |
|-----------|-----------|------------|------------|------------|
| FC | 0 | 15,5 ± 1,1 | 15,5 ± 1,1 | 15,5 ± 1,1 |
| | 0,05 | 14,2 ± 1,8 | 14,5 ± 2,0 | 23,7 ± 2,2 |
| | 0,5 | 20,5 ± 2,8 | 19 ± 2,0 | 32,7 ± 3,1 |
| | 5 | 84,9 ± 0,5 | 59,7 ± 0,4 | 63,5 ± 3,2 |
| | 50 | 100 ± 0,0 | 100 ± 0,0 | 100 ± 0,0 |
| SE | 0 | 15,5 ± 1,1 | 15,5 ± 1,1 | 15,5 ± 1,1 |
| | 0,05 | 20,5 ± 1,2 | 25,4 ± 1,2 | 25,5 ± 2,3 |
| | 0,5 | 21,7 ± 2,2 | 21,6 ± 2,1 | 20,2 ± 2,6 |
| | 5 | 24,4 ± 2,3 | 18,6 ± 2,0 | 18,5 ± 2,0 |
| | 50 | 20,3 ± 1,6 | 22,5 ± 2,1 | 16,6 ± 2,8 |
| SC | 0 | 15,5 ± 1,1 | 15,5 ± 1,1 | 15,5 ± 1,1 |
| | 0,05 | 31,5 ± 2,6 | 25 ± 1,8 | 25,2 ± 2,0 |
| | 0,5 | 30,5 ± 1,9 | 26,7 ± 1,6 | 24,4 ± 1,2 |
| | 5 | 33 ± 2,0 | 29 ± 1,8 | 27,3 ± 3,1 |
| | 50 | 62,2 ± 2,1 | 41,7 ± 4,0 | 29 ± 2,6 |
| EE | 0 | 7,6 ± 0,8 | 7,6 ± 0,8 | 7,6 ± 0,8 |
| | 0,05 | 9 ± 0,6 | 4,8 ± 0,9 | 4,8 ± 2,0 |
| | 0,5 | 7,3 ± 0,7 | 4,7 ± 0,6 | 4,8 ± 0,6 |
| | 5 | 9,2 ± 0,9 | 6,7 ± 1,1 | 5,8 ± 2,4 |
| | 50 | 98,3 ± 0,9 | 17,3 ± 1,7 | 11,8 ± 1,1 |
| EC | 0 | 7,6 ± 0,8 | 7,6 ± 0,8 | 7,6 ± 0,8 |
| | 0,05 | 4,7 ± 0,7 | 9,7 ± 1,4 | 11,3 ± 0,7 |
| | 0,5 | 14 ± 0,6 | 23,3 ± 1,7 | 20,3 ± 1,4 |
| | 5 | 98,3 ± 0,9 | 82 ± 5,0 | 52,5 ± 6,5 |
| | 50 | 100 ± 0,0 | 100 ± 0,0 | 99 ± 0,6 |

Tableau 1 - Action des sédiments sur la fécondation et le développement embryonnaire chez *Crassostrea gigas*, selon leur provenance et la concentration testée. Les pourcentages bruts d'anomalies sont indiqués avec erreur-standard.

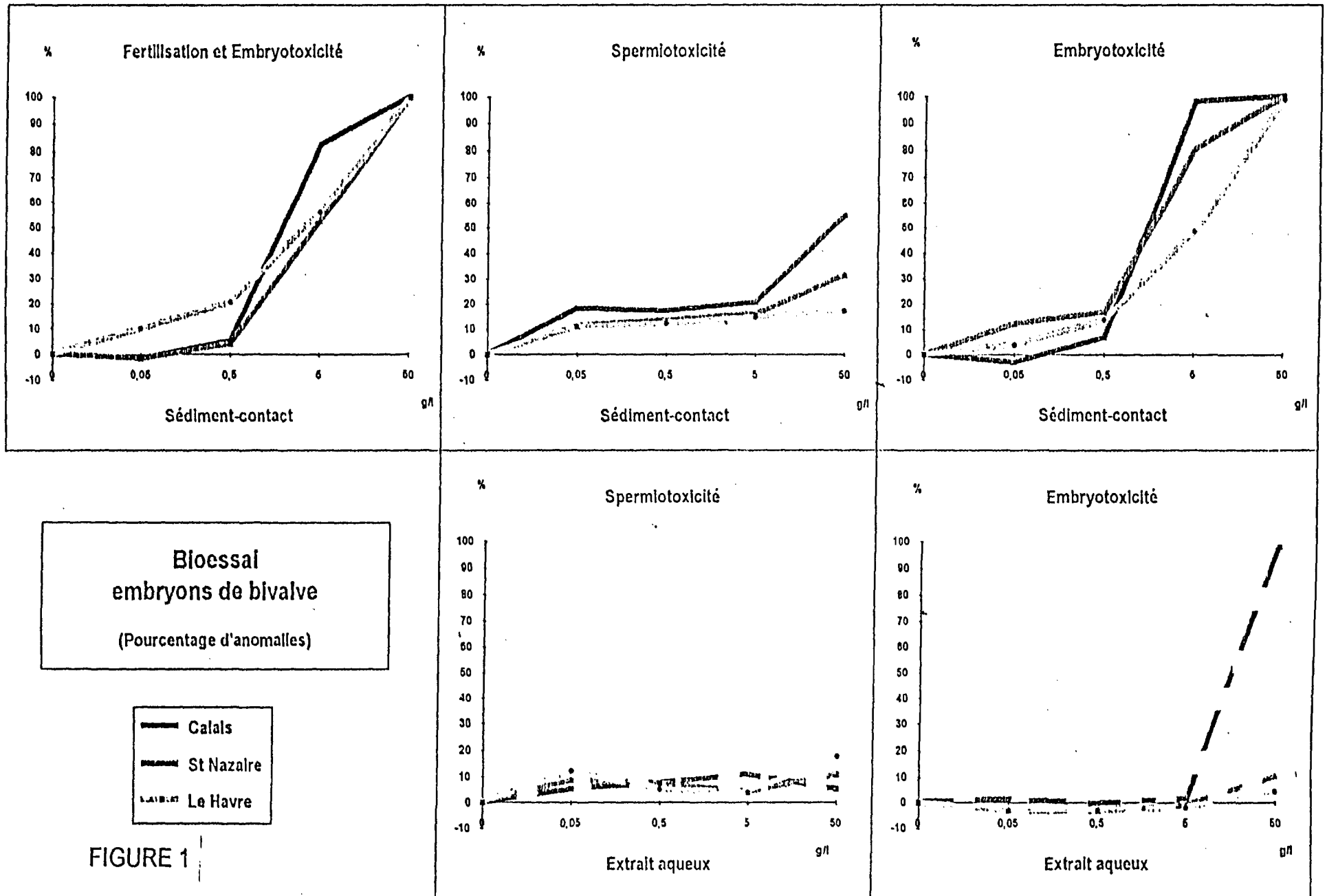
FC : Fécondation et développement embryonnaire en "sédiment-contact"

SE : Spermiotoxicité avec les extraits aqueux

SC : Spermiotoxicité avec le "sédiment-contact"

EE : Embryotoxicité avec les extraits aqueux

EC : Embryotoxicité avec le "sédiment-contact"



ANNEXE 5

UTILISATION D'ANALYSES PHYSIOLOGIQUES COMME BIOINDICES POUR L'ETUDE DE TOXICITE SUR LA MOULE

Michel BLANCHARD
Ifremer - Brest

1 - INTRODUCTION

Cette étude a été réalisée dans le cadre d'un stage IUT, du 1er mai au 30 juin 1993, au sein du laboratoire d'Ecologie de la Direction de l'Environnement de l'Ifremer, stage qui a donné lieu à une soutenance et un rapport (Gentil 1993).

Dans le temps limité du stage, il avait été convenu de réaliser ce travail en deux phases: une partie *in situ*, en immergeant un lot d'animaux au site de rejet des boues de dragage de la baie de Seine durant plusieurs semaines, et d'en étudier la réaction physiologique; une deuxième partie au laboratoire, mettait en présence des animaux et des concentrations différentes de boues de dragage. L'immersion de moules au site d'Octeville près du Havre, était prévue pour février 1993, ceci afin que les animaux puissent être en contact suffisamment longtemps avec les boues rejetées à cet endroit, et être analysés en mai. Malgré plusieurs tentatives d'immersion par les plongeurs du Port Autonome du Havre, de février à mai, il s'est avéré impossible de maintenir un lot de moules sur ce site, du fait des conditions hydrologiques défavorables. Cette partie du programme fut donc abandonnée à regret et remplacée par une immersion d'une journée au site d'Antifer, où les concentrations de polluants dans le sédiment, sont proches de celles du point de rejet (Chauvin et al. 1985).

La deuxième partie du stage nécessitait la présence au laboratoire de boues de dragage durant le mois de mai. Or celles-ci n'arrivèrent que le 28/05 pour les premières, le 28/06 pour d'autres, donc trop tard pour être étudiées. Seul le premier lot fut donc utilisé. Un seul site fut suivi: le Havre.

Le but de cette étude est de montrer la faisabilité de tests, dans le cas d'un suivi de toxicité de boues de dragage, venant de divers estuaires. Ce rapport présente le bilan de mesures faites *in situ* au terminal pétrolier d'Antifer, et de tests physiologiques en laboratoire, après perturbation par du sédiment provenant également de ce secteur de la baie de Seine.

2 - CHOIX DU MATERIEL VIVANT

La moule (*Mytilus edulis*) est largement utilisée comme bioindicateur pour plusieurs raisons :

- Sa durée de vie d'une dizaine d'années permet des suivis à longs termes
- Sa distribution large permet de la trouver sur toutes les côtes.
- Sa sédentarité permet sa récolte toute l'année.
- Sa résistance aux manipulations facilite son emploi dans divers travaux.
- Son utilisation alimentaire et son aquaculture ont favorisé le développement de sa connaissance.
- Son régime alimentaire filtreur nécessite une certaine qualité de l'eau environnante.

- Son aptitude à la bioconcentration dans certains tissus est importante puisque celle-ci atteint jusqu'à 100 000 fois celle de certains produits du milieu, d'où son utilisation en analyse chimique.
- etc

On utilise donc cette espèce dans divers travaux de laboratoire comme indicateur de pollution. Ces travaux utilisent l'analyse chimique (mesures des contaminants dans les chairs, mesures enzymatiques EROD, AChE...) ou les tests physiologiques métaboliques et comportementaux (taux respiratoire, bilans énergétiques, vitesses de croissance, mouvements valvaires...). Ces diverses mesures donnent lieu à la réalisation d'indices, qui sont largement utilisés, soit seuls, soit plus généralement en association, pour une plus grande fiabilité. De très nombreux exemples existent dans la littérature, quant à l'utilisation de la moule comme bioindicateur, citons seulement Bayne et *al.* (1985).

Nous utiliserons ici les mesures physiologiques appliquées à la moule marine (*Mytilus edulis*) qui est l'espèce la plus commune sur nos côtes. Elle est présente, à l'état naturel, dans les deux sites suivis.

Les animaux sont installés au laboratoire Ifremer sur le site d'Argenton, près de Brest, depuis le mois de janvier 1993, répartis dans des plateaux horizontaux d'un mètre carré, à raison de 200 individus par plateaux, pour leur assurer un renouvellement d'eau suffisant, et cette eau y est de bonne qualité. Leur acclimatation au moment des expériences est donc parfaite.

3 - MESURES PHYSIOLOGIQUES

Parmi les diverses mesures physiologiques faites sur la moule et utilisées en écotoxicologie, citons les plus courantes qui ont été développées par des laboratoires anglo-saxons:

- Le taux respiratoire qui permet de noter la condition physique de l'animal en mesurant sa consommation d'oxygène sous diverses conditions de milieu. C'est un paramètre simple et fiable qui nécessite néanmoins une bonne connaissance des réactions normales de l'animal.

- Le "Scope For Growth" dont l'utilisation est recommandée par le C.I.E.M. (cf. Compte rendu du Working Group on Biological Effects d'avril 1993) qui associe divers paramètres physiologiques (assimilation, respiration, excrétion) pour la détermination d'une évolution générale positive ou négative entre deux périodes de mesures (Widdows et *al.* 1984).

- Le bilan énergétique, qui est l'application à un instant donné des résultats des paramètres précédents, transcrits en termes énergétiques.

- L'indice O/N qui ne prend qu'une partie des mesures précédentes (respiration et excrétion), souvent utilisé pour sa simplicité de mise en oeuvre.

- L'analyse des mouvements valvaires de mollusques bivalves est également une méthode douce qui permet d'étudier une modification du comportement en présence d'un stress de l'environnement (Kramer et *al.* 1989).

L'intérêt de la plupart de ces mesures physiologiques réside dans le fait qu'elles ne nécessitent pas systématiquement le sacrifice des animaux utilisés, ce qui permet de les placer d'abord dans un milieu témoin, puis dans des conditions défavorables, et d'en noter la différence de comportement. Cette mesure relative permet ainsi de suivre réellement l'évolution physiologique d'un individu pendant sa perturbation métabolique. Nous utiliserons ici deux de ces analyses physiologiques: le rapport O/N, et l'enregistrement des mouvements valvaires.

3.1. Rapport O/N

Le rapport O/N est le rapport, en équivalent atomique, de la quantité d'oxygène consommée, sur la quantité d'azote ammoniacal excrétée (Bayné et *al.* 1985):

$$O/N = \frac{X \text{ ml O}_2 \times 1,428}{16} / \frac{Y \text{ mg N-NH}_3}{14}$$

Ce rapport témoigne donc de la balance énergétique entre la respiration qui représente ici une absorption d'énergie, et l'excrétion d'azote ammoniacal, qui en représente une perte. Plus la santé de l'animal est bonne, plus le taux respiratoire est élevé et le rapport O/N élevé, mais plus la santé est faible, plus l'animal excrète d'azote, allant jusqu'à la lyse de ses propres tissus en dernière extrémité, et plus le rapport est faible.

Les valeurs de ce rapport renseignent donc sur l'état de santé de l'échantillon: 7 est la valeur minimum théorique, tandis que des valeurs de 7 à 30 témoignent de conditions de stress alimentaire, dues à une pollution, puis à un environnement de moins en moins mauvais. 40 semble être une valeur moyenne. Au delà de cette valeur, les conditions de santé sont d'autant meilleures que les valeurs sont élevées.

Pour établir ce rapport O/N, l'oxymétrie et la mesure de l'excrétion d'azote ammoniacal sont donc réalisées, selon les protocoles définis (Blanchard 1989).

3.1.1. Oxymétrie

La mesure de l'oxygène dissous est réalisée par sonde polarographique (fig.1). L'enregistrement graphique permet de suivre l'évolution de la concentration de l'oxygène en continu, au cours du temps. Le temps de mesure est fixé arbitrairement à une heure. En effet cette mesure doit être brève, pour éviter une hypoxie, une prolifération bactérienne et l'accumulation d'excrétats qui engendreraient des perturbations importantes lors des analyses ultérieures, telles celle du dosage de l'ammoniaque.

Pour les calculs du taux respiratoire (R), seules les valeurs maxima seront retenues.

Calcul de R:

Soit :

C_m : la consommation d'oxygène de la moule

C_v : la consommation propre de la sonde

C : $C_m - C_v$

V : le volume de la chambre de mesure

P_s : le poids sec de l'animal

$t_1 - t_0 = T$: le temps de mesure

$$R = \frac{C \times V}{T \times P_s}$$

3.1.2. Mesure de l'azote ammoniacal

L'excrétion azotée des moules est constituée de plusieurs composés, notamment d'acides aminés, d'urée et d'ammoniaque. L'ammoniaque, sous la forme ammonium ($\text{NH}_4^+ = \text{NH}_3 + \text{H}^+$) est le composant majoritaire (70%) dans l'excrétion de la moule (Bayne et al. 1985). Il est donc d'usage courant de doser l'azote ammoniacal ($\text{NH}_3\text{-N}$) sans tenir compte des autres composés minoritaires.

L'azote ammoniacal est dosé colorimétriquement selon la méthode de Solorzano: 100 ml d'eau sont prélevés dans le récipient où à eu lieu l'oxymétrie après le temps de mesure défini (ici une heure). On y ajoute immédiatement 3 ml de réactif R1 (solution de phénol-nitroprussiate), et 3 ml de réactif R2 (solution alcaline d'hypochlorite). Les flacons sont stockés au frais et à l'obscurité, jusqu'à l'analyse qui se fait au spectrophotomètre à une longueur d'onde de 630 nm.

Calcul de l'excrétion ammoniacale U :

C : concentration en microatomegramme (μatg) par litre

($1 \mu\text{atg.l}^{-1} = 14 \mu\text{g.l}^{-1} \text{NH}_3\text{-N}$)

V : volume d'eau en litre

T : durée de la mesure en heure

P_s : Poids sec de l'animal

$$U = \frac{C \times V \times 14}{T \times P_s} \mu\text{atg NH}_3\text{-N h}^{-1} \text{g}^{-1}$$

3.2. Mesure des mouvements valvaires

Le principe de cette mesure est simple: lorsque le milieu est sain (eau propre) les moules ont un métabolisme normal, pour lequel la filtration d'eau doit être constante (alimentation et respiration). Elles restent donc entrouvertes 90 à 95% de leur temps. Au contraire, les moules placées dans une eau de mauvaise qualité évitent de prélever cette eau, en fermant leurs valves, ou du moins, en augmentant leur fréquence de fermeture. Cette

observation ancienne a amené les techniciens à développer un système d'enregistrement de ces mouvements valvaires (Galstoff 1964).

Pour cette étude, nous avons utilisé un appareil appelé moulo-mètre, fabriqué par Delta Consult, nous permettant d'enregistrer automatiquement les mouvements valvaires au cours du temps (fig. 2).

Huit moules peuvent être installées simultanément sur cet appareil. Leur écartement valvaire est mesuré en permanence grâce à des capteurs qui leur sont appliqués. L'information est transmise à un récepteur, amplifiée, et stockée en mémoire soit, dans l'appareil et restituée à posteriori sous forme d'un signal unique de fermeture, soit les valeurs sont affichées en permanence sur un terminal, ce qui nécessite alors une connexion électrique.

4 - EXPERIMENTATIONS

Les expériences citées précédemment sont réalisées au laboratoire et sur le terrain selon le protocole ci-dessous:

Mesures *in situ*:

| Site | Immersion du moulo-mètre | Mesure du rapport O/N |
|----------|--------------------------|-----------------------|
| ARGENTON | + | + |
| ANTIFER | + | + |

Mesures au laboratoire

| | | |
|-------------------|---|---|
| sédiment du Havre | + | + |
| témoin | + | + |

4.1. Expérimentation en laboratoire

Elle consiste à étudier la réponse physiologique des moules vis à vis des sédiments de dragage du site de rejet du Havre. Ceux-ci sont stockés en chambre froide et utilisés rapidement. Il s'agit de mettre en présence ces sédiments (ou, du moins l'eau surnageante après agitation et décantation) et les moules.

Les quantités de sédiment nécessaires sont déposées dans des récipients contenant l'eau de référence. En l'occurrence, celle-ci est de l'eau de la rade de Brest filtrée à 10 μm . L'ensemble est agité et homogénéisé. Après redéposition du sédiment durant 30 minutes, l'eau surnageante est prélevée pour les bioessais.

Deux concentrations de sédiment seront utilisées: 50 et 100 g.l^{-1} .

Pour l'immersion du mouloètre, celui ci est placé dans un bac de 40 litres pendant quatre heures. Le milieu est oxygéné par bullage. Entre chaque essais, l'eau est renouvelée en circuit ouvert, pendant une nuit, ce qui permet aux animaux de se régénérer.

4.2. Expérimentation in situ

La mesure du rapport O/N, et l'immersion du mouloètre sont effectuées les 26, 27 et 28 mai. D'abord au laboratoire Ifremer d'Argenton près de Brest, qui sera le site témoin, puis au terminal pétrolier d'Antifer, avec les mêmes animaux.

Trois séries de mesure du rapport O/N seront effectuées à Argenton, et le mouloètre y sera immergé durant une nuit. Trois séries de mesure du rapport O/N seront réalisées à Antifer, et le mouloètre également immergé durant une nuit. L'absence de connexion électrique sur le terminal pétrolier (pour raison de sécurité) lors de cette dernière mesure ne donnant, qu'un signal élémentaire à posteriori, une nouvelle immersion de trois heures fut ensuite réalisée, avec cette fois-ci une mesure en continu.

5 - RESULTATS

5.1. Physiologie

5.1.1. Expérimentation in situ

Les résultats de mesures physiologiques figurent dans le tableau 1. On constate que la moyenne des résultats d'excrétion est quasiment identique dans les deux sites. L'écart à cette moyenne est de 0,0543 pour Argenton et de 0,0642 pour Antifer, montrant des valeurs plus dispersées dans ce deuxième site, dues aux plus grandes variations individuelles

Les résultats de respiration montrent par contre une consommation moyenne d'oxygène supérieure à Argenton : 0,2416 mg d'O₂, contre 0,2192 mg à Antifer. Les écarts sont respectivement 0,0992 et 0,1184, donc là encore, supérieurs à Antifer.

*Le résultat des rapport O/N est donc : de 82,08 (\pm 26,01) à Argenton,
et de 72,81 (\pm 31,29) à Antifer.*

Ce résultat montre une modification des paramètres physiologiques du lot de moules après leur immersion sur le site d'Antifer. La baisse du rapport est le signe d'une dégradation de l'environnement des animaux entre les deux sites. Si les valeurs obtenues à Argenton sont toutes supérieures à 54, montrant un bon état général des animaux sur ce site, on observe à Antifer des valeurs inférieures à 45,86 dont l'une de 29,33 qui indique un réel stress. La plus grande dispersion des valeurs sur ce deuxième site indique également une réaction inégale des individus face à ce nouveau milieu.

5.1.2. Expérimentation au laboratoire

Dans le tableau 2 figurent les résultats du rapport O/N, obtenus sur les animaux après leur mise en contact avec du sédiment venant du Havre.

Si l'on compare tout d'abord ces résultats avec ceux obtenus à Argenton (tableau 1), qui nous servent de référence, on peut noter une nette différence dans la consommation d'oxygène quelque soit la concentration de sédiment préalable. On met ainsi en évidence une modification du métabolisme chez ces animaux soumis à une turbidité anormale pendant cette heure de mesure.

Si l'on analyse les résultats de respiration après concentration de 50 g. l⁻¹ de sédiment, on observe une consommation moyenne de 0,1709 mg l⁻¹, avec des valeurs très dispersées ($\pm 0,0754$), tandis qu'après mise en contact avec 100 g.l⁻¹ de sédiment, 24 heures plus tard, cette consommation est de 0,1258 en moyenne, avec des écarts quasiment nuls, (0,020), comme si ces mêmes animaux s'acclimataient à cette turbidité.

Les résultats d'excrétion ammoniacale figurent dans le tableau 2 sous forme d'une valeur minima. En effet toutes les valeurs des échantillons mesurés sont largement supérieur à 50 $\mu\text{atg l}^{-1}$ qui est la valeur maxima de concentration analysable par le spectrophotomètre. Le sédiment devant contenir de grandes quantités de matière organique en décomposition sous forme de particules fines remises en suspension, cet azote organique particulaire interfère avec la mesure de l'excrétion azotée. Il faut souligner que des essais de dilution n'ont pas apporté de solutions valables.

Le rapport O/N obtenu lors de cette analyse est donc une valeur maximale. On observe malgré tout que la moyenne des résultats est supérieure avec 50 g.l⁻¹ ($47,87 \pm 21,13$), qu'avec une concentration de 100 g.l⁻¹ ($35,22 \pm 5,70$).

5.2. Résultats d'analyse des mouvements valvaires

5.2.1. Immersion in situ

L'appareil est donc immergé d'abord à Argenton, site témoin, puis réimmergé aussitôt à Antifer, avec le même lot d'individus, et dans les mêmes conditions.

A Argenton, les mouvements sont réguliers : l'animal reste ouvert la plupart du temps, autour d'une valeur moyenne d'environ 6000 unités. Cela pour tous les individus.

A Antifer, les variations individuelles sont beaucoup plus importantes, autour d'une valeur moyenne qui est pourtant la même que précédemment.

Deux interprétations sont possibles : d'une part le changement de milieu n'affecte pas les différents individus de la même manière, certains le marquent, d'autres non d'où une possibilité de résistance différente selon les individus à un stress extérieur; d'autre part, la qualité de l'eau entre les deux sites ne serait pas différente, et les variations observées par cette méthode seraient imputables à des variations de type hydrologique.

5.2.2. Au laboratoire

L'appareil est immergé dans un bac où circule l'eau d'abord pure puis chargée de particules en suspension à deux concentrations différentes 50 et 100 g.l⁻¹, valeurs volontairement élevées. Plusieurs mesures ont été réalisées, mais peu seulement ont donné des résultats acceptables, soit du fait de difficultés techniques, (décollage, irrégularité de

l'homogénéisation...) soit du fait que cette réponse comportementale montre de telles variabilités individuelles que les résultats sont ininterprétables. Nous n'avons retenu ici que les résultats d'une seule série, qui donne des réponses continues et intéressantes pour 4 individus. Les autres individus n'ont pas été pris en compte du fait qu'ils étaient décollés de leur support dès la première partie de l'analyse.

Dans l'eau pure ces individus montrent durant 12 heures, un comportement stable et une ouverture constante entre 5000 et 5500 unités pour 3 moules, et supérieure pour la 4^{ème}. L'enregistrement se poursuit au delà de 8h52, jusqu'à 11h35.

A 11h35, l'appareil est immergé dans une eau turbide en présence de sédiment à 50-g.l⁻¹. Les moules s'ouvrent toutes mais montrent ensuite des comportements différents : la 4 s'ouvre de façon normale, la 5 et la 6 se ferment progressivement, ce qui est un témoignage de stress, de façon nette. La 8 montre une suite de mouvements d'ouverture/fermeture anarchiques. On peut dire là que trois individus sur quatre indiquent une modification du milieu.

A 14h35 la concentration est portée à 100 g.l⁻¹, les individus 5 et 6 là encore réagissent nettement par une fermeture brutale, très profonde pour la 6. L'individu 8 ne marque qu'une petite fermeture momentanée, comme l'individu 4, sans beaucoup de signification. Deux individus sur quatre répondent par une fermeture à un stress net dû au milieu.

L'évolution ultérieure du comportement valvaire est une suite de mouvements irréguliers, pour la 5 et la 6, moins marqués chez la 8. A 17h25 tous les animaux répondent à une perturbation inconnue, perturbation très marquée chez la 4. On observe, contrairement à ce que l'on pourrait attendre, une ouverture progressive des valves chez ces animaux mis en eau très chargée. Deux hypothèses à cela: d'une part il y a décantation progressive de particules en suspension, et les animaux retrouvent des conditions normales ; plus vraisemblablement il y a perte du tonus musculaire chez ces animaux 5, 6 et 8 et le muscle adducteur des valves ne remplit plus sa fonction, d'où une ouverture progressive, et des amplitudes moindre. Ce comportement est caractéristique de la présence d'une substance irritante dans le milieu, et correspond au type "C" des observations de Galstoff (1964) sans pour autant que l'on connaisse la cause de cette irritabilité à la turbidité, ou à une substance toxique présente dans l'eau. Le relâchement musculaire plaide pourtant en faveur de la deuxième hypothèse.

Une expérimentation de plus longue durée permettrait de voir l'évolution ultérieure de ce comportement valvaire. Il va vraisemblablement vers un "baillement" total, du moins pour les trois derniers individus, c'est à dire une ouverture maximale due au relâchement du muscle adducteur.

Deux individus sur les quatre durant cette expérience ont marqué un comportement valvaire anormal, en présence de boues de dragage, et ce comportement est celui d'un individu soumis à une "substance irritante". L'indication que donne ainsi le moulo-mètre dans ce cas précis est une baisse de qualité du milieu environnant par rapport au témoin. La cause de ce changement n'est pas connue, ce peut être la seule turbidité, ce peut être également le contenu sédimentaire.

Le niveau de concentration sédimentaire donne des résultats physiologiques différents : tout d'abord une fermeture lente et progressive, face à la perturbation qui s'installe, puis face au doublement de cette concentration, une réaction inverse due au relâchement musculaire.

CONCLUSION

Deux types de tests physiologiques ont été mis en oeuvre dans ce travail, pour servir de bioindices.

Ces deux tests sont employés couramment par certains laboratoires en écotoxicologie.

6.1. Mouvement valvaire

Lors de ces travaux, on observe que, autant dans le milieu, qu'en laboratoire, le moulomètre n'a pas donné pleinement satisfaction. Dans le milieu, nous avons pu remarquer une faible différence intersite, et que seule une plus grande variabilité individuelle pouvait être soulignée. Au laboratoire, les résultats obtenus sur la série présentée ici, montrent un impact, sur seulement la moitié des échantillons. Dans d'autres essais les enregistrements montrent une telle variabilité individuelle qu'ils peuvent difficilement être interprétés.

D'autres travaux, plus longs et complémentaires de ceux-ci, apporteraient sans doute des indications intéressantes puisque des auteurs hollandais, (Borcherding 1992, Kramer et al. 1989, Jenner et al. 1989) ont pu montrer tout l'intérêt de cet indice dans des mesures de toxicité par chloration notamment, *in situ* ou en laboratoire.

Malgré son intérêt, il est donc difficile sur la base de ces seuls résultats de proposer cet indice pour le suivi des toxicités sur les boues de dragage.

6.2. Rapport O/N

Ce rapport donne ici des valeurs différentes en condition neutre et en milieu supposé toxique.

In situ, la différence de réponse entre les sites d'Argenton et d'Antifer est notable (10 points de différence), et certaines valeurs dans ce dernier site montrent une dégradation du métabolisme. Cet exemple, sur 9 échantillons, paraît suffisamment significatif pour être retenu. La multiplication des mesures devrait confirmer cette différence.

Au laboratoire, l'expérimentation en présence d'un milieu très turbide est prometteuse. On remarque en effet que si les valeurs de respiration sont différentes entre les témoins et les lots de concentrations différentes, le rapport O/N ne peut être interprété pour un problème d'excrétion. La solution envisagée à la suite de ce travail, et au vu de ces résultats, était de mesurer l'excrétion non pas dans l'eau du milieu, mais dans de l'eau pure sitôt après l'heure de contact avec le milieu turbide. Cette solution simple permettrait de mesurer une excrétion azotée, peut-être en dehors du contexte, mais dans des conditions parfaites d'analyse. Il faut souligner ici, que les concentrations volontairement élevées avec lesquelles nous avons opéré, n'ont rien à voir avec celles du milieu, et que des travaux à concentrations plus faibles, ne seraient pas aussi perturbantes pour l'analyse de l'azote ammoniacal. A condition de respecter certaines précautions, la mesure du rapport O/N, nous paraît être un indice intéressant dans le cas du suivi de la qualité du milieu, que ce soit *in situ*, ou en

laboratoire. Les travaux anglais de l'école de Plymouth (Bayne et *al.* 1985, Widdows et *al.* 1984) ont pu montrer la faisabilité de cet indice, depuis souvent utilisé. L'appareillage utilisé est commun dans les laboratoires. Sa mise en oeuvre nécessite néanmoins une bonne connaissance des animaux étudiés.

BIBLIOGRAPHIE

Bayne B.L., Brown D.A., Burns K., Dixon D.R., Ivanovici A., Livingstone D.R., Lowe D.M., Moore M.N., Stebbing A.R.D., & J. Widdows, 1985 - The effects of stress and pollution on marine animals. Praeger Special Studies. Praeger Scientific N.Y.

Blanchard M., 1989 - Analyse fonctionnelle et méthodologique pour l'étude bioénergétique de mollusques. Rapport interne Ifremer. Dero.el / 89.18: 1-100.

Borcherding J., 1992 - Another early warning system for the detection of toxic discharges in the aquatic environment based on valve movements of the freshwater mussel *Dreissena polymorpha*. Limnologie aktuell vol.4 : 127-146.

Chauvin P., Freger G., & P. Guiyader, 1985 - Synthèse des connaissances sur les effets du dépôt de dragage d'Octeville. Acte de colloques Ifremer n°4.

Galstoff P.S., 1964 - The american oyster *Crassostrea virginica*. Fishery Bulletin, vol.64.

Gentil E., 1993 - Utilisation de la moule comme bioindicateur pour l'étude de la toxicité de sédiments. Rapport IUT Brest : 1-20 + annexes

Jenner H.A., Noppert F., et T.Sikking, 1989 - A new system for the detection of valve-movement response of bivalves. Kema scientific & technical reports 7(2): 91-98.

Kramer K.J.M., Jenner H.A. & D.de Zwart, 1989 - The valve movement response of mussels: a tool in biological monitoring. Hydrobiologia: 188/189: 433-443.

Widdows J., Donkin P., Salked N., Cleary J.J., Lowe D.M., Evans S.V., & P.E. Thomson, 1984 - Relative importance of environmental factors in determining physiological differences between two populations of mussels (*Mytilus edulis*). Marine Ecology Progress Series 17: 33-47.

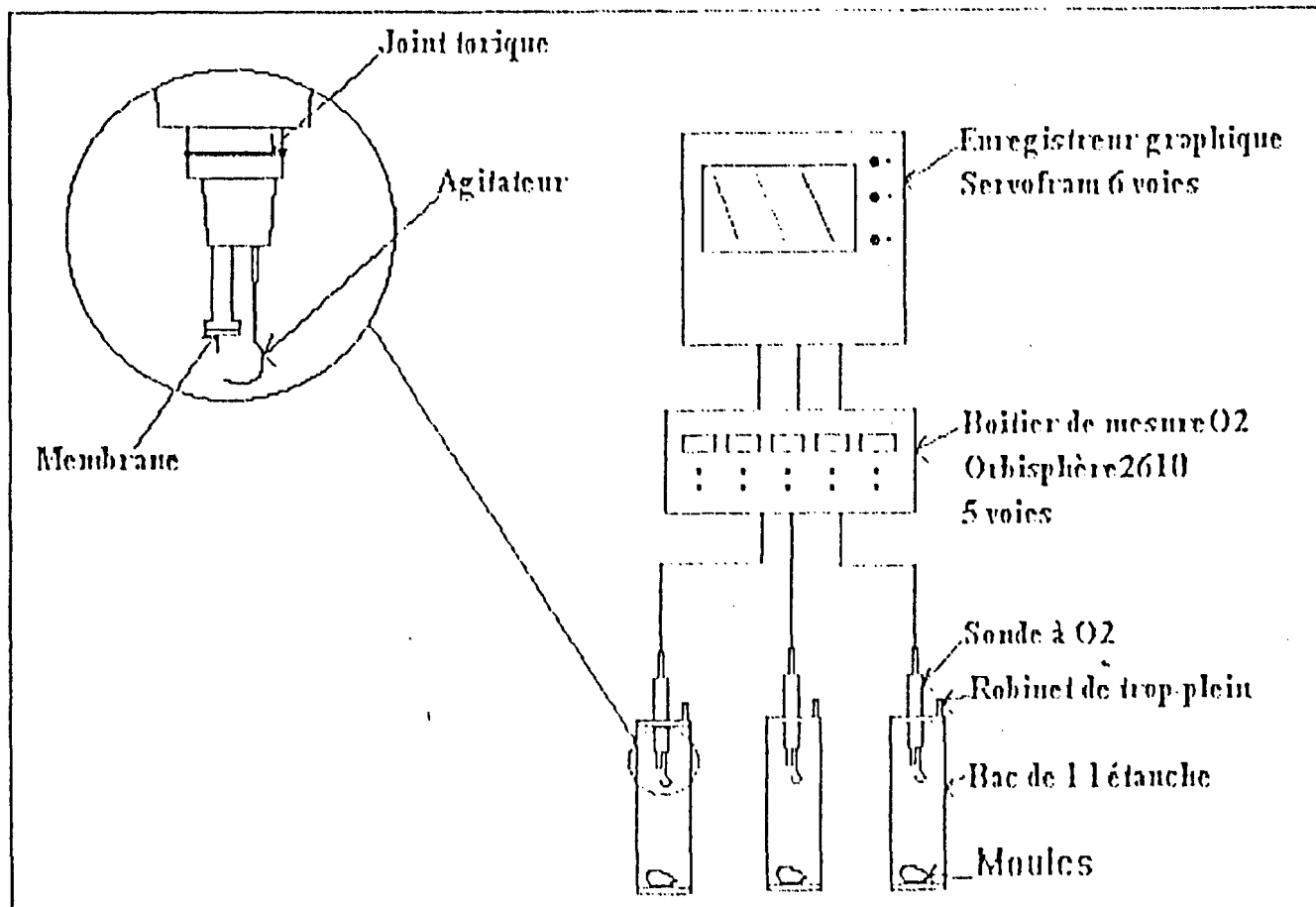


Fig 1 Dispositif expérimental pour la mesure de la respiration

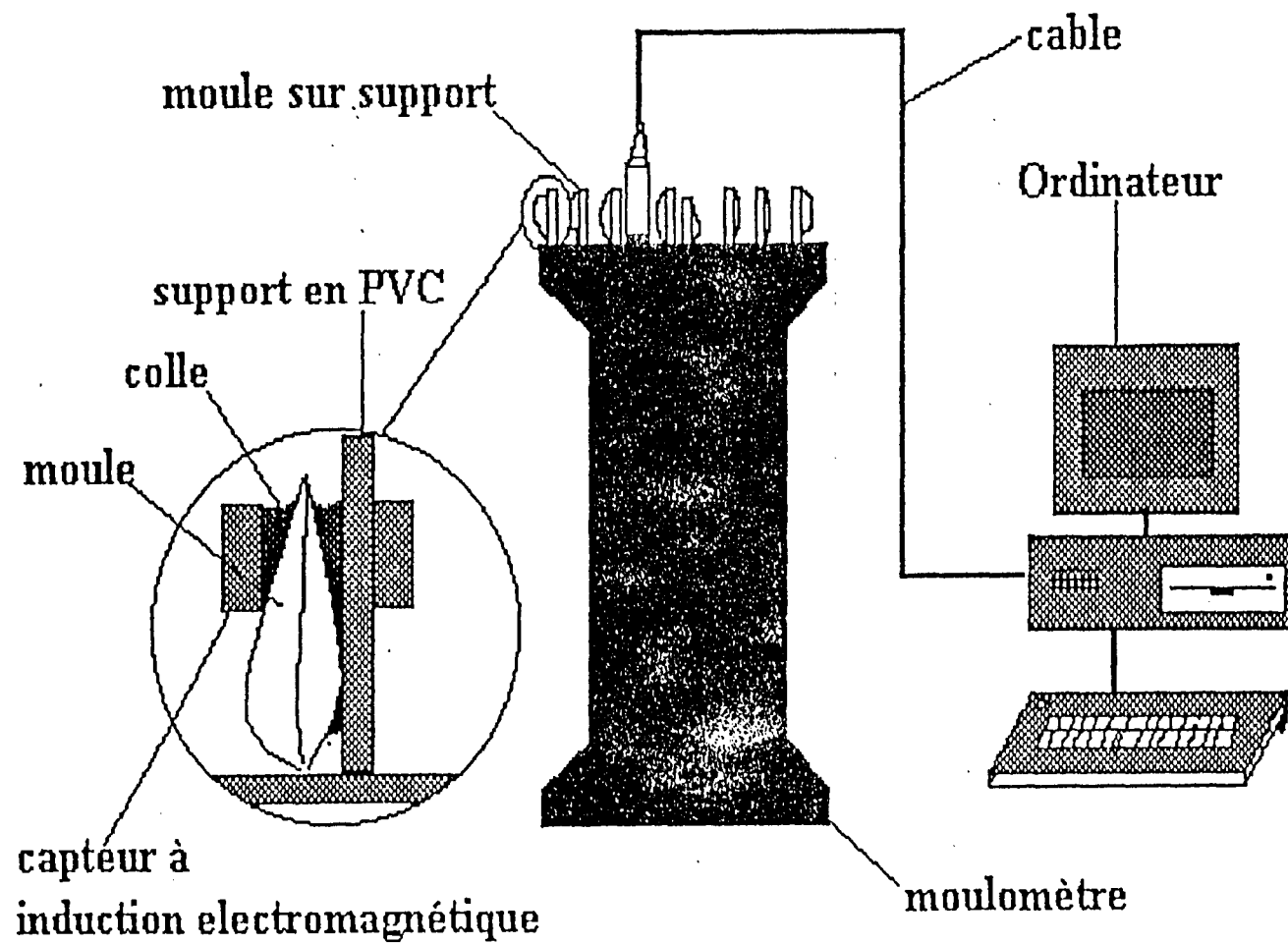


fig2 Schéma du moulomètre

| Site | Respiration (mg d'oxygène/16) | Concentration d'azote ammoniacal (µatg/l/14) | Rapport O/N |
|----------|----------------------------------|---|-------------|
| Argenton | 0.0284 | 0.1936 | 128.6 |
| | 0.0170 | 0.2021 | 73.6 |
| | 0.0159 | 0.1764 | 78.86 |
| | 0.0091 | 0.1166 | 68.35 |
| | 0.0170 | 0.1324 | 112.43 |
| | 0.0148 | 0.2366 | 54.73 |
| | 0.0148 | 0.1293 | 100.21 |
| | 0.0057 | 0.0736 | 67.85 |
| | 0.0136 | 0.2207 | 54.14 |
| Moyenne | 0.0151 | 0.1646 | 82.08 |
| Antifer | 0.0182 | 0.1193 | 133.5 |
| | 0.0182 | 0.1893 | 84.25 |
| | 0.0091 | 0.0814 | 97.89 |
| | 0.0091 | 0.1528 | 52.17 |
| | 0.0102 | 0.1957 | 45.86 |
| | 0.0171 | 0.2178 | 68.95 |
| | 0.0080 | 0.1200 | 58.82 |
| | 0.0046 | 0.1385 | 29.33 |
| | 0.0284 | 0.2943 | 84.52 |
| Moyenne | 0.0137 | 0.1677 | 72.81 |

Tableau 1: Résultat des mesures du rapport O/N réalisées in situ.

| Concentration sédimentaire (g/l) | Consommation d'oxygène | | Excrétion ammoniacale | | Rapport O/N (maxima) |
|-------------------------------------|------------------------|--------|-----------------------|-------------------|-------------------------|
| | ppm | ppm/16 | (μ atg/l) | (μ atg/l/14) | |
| 50 | 0.2534 | 0.0158 | >50 | > 3.57 | 70.98 |
| | 0.1705 | 0.0107 | >50 | >3.57 | 47.75 |
| | 0.1250 | 0.0078 | >50 | >3.57 | 35.00 |
| | 0.0716 | 0.045 | >50 | >3.57 | 20.05 |
| | X | X | >50 | >3.57 | - |
| | 0.2341 | 0.0146 | >50 | >3.57 | 65.57 |
| Moyenne | 0.1709 | 0.0107 | >50 | >3.57 | 47.87 |
| 100 | 0.1023 | 0.0064 | >50 | >3.57 | 28.65 |
| | 0.1364 | 0.0085 | >50 | >3.57 | 38.20 |
| | 0.1386 | 0.0087 | >50 | >3.57 | 38.82 |
| Moyenne | 0.1258 | 0.0079 | >50 | >3.57 | 35.22 |

Tableau 2: Résultats des mesures du rapport O/N en présence de sédiment