
Programme National d'Ecotoxicologie

Application au domaine marin

Synthèse des travaux

Contribution à la mise au point de méthodes d'évaluation des sédiments, contaminés par les hydrocarbures aromatiques polycycliques, en fonction de la teneur en matière organique des sédiments.

(1^{er} Juillet 1998 - 1^{er} Juillet 2001).



PRÉAMBULE	1
1. INTRODUCTION	2
2. MATÉRIELS ET MÉTHODES	4
2.1. <i>Analyses chimiques</i>	4
2.2. <i>Choix des HAP's</i>	4
2.3. <i>Sédiments</i>	5
2.3.1. Choix d'un sédiment de référence.....	5
2.3.2. Les sédiments naturels	5
2.3.3. Le sédiment artificiel	7
2.3.4. Maturation des sédiments (Ifremer-LPEM)	9
2.3.5. Préparation des sédiments.....	9
2.4. <i>Dopage des sédiments</i>	9
2.5. <i>Méthodes et variables biologiques de mesure de la toxicité</i>	10
2.5.1. Le test "développement embryo-larvaire" de l'huître creuse (Ifremer).....	11
2.5.2. Le test copépode harpacticoïde <i>Tigriopus brevicornis</i> (IO - LPEM)	11
2.6. <i>Résumé des expérimentations présentées en eau de mer</i>	12
3. RÉSULTATS.....	13
3.1. <i>Aspects méthodologiques</i>	13
3.1.1. Rendement de dopage : flux de désorption.....	13
3.1.2. Recherche d'une méthode d'extraction de l'eau interstitielle.....	14
3.1.3. Evaluation de l'innocuité des matières organiques (Ifremer)	16
3.1.4. Evaluation de la toxicité potentielle des matrices artificielles.....	17
3.1.5. Evaluation de l'innocuité des solvants des HAP's	17
3.1.6. Evaluation de l'effet de la maturation des sédiments enrichis en MO avant dopage en HAP's17	
3.2. <i>Toxicité</i>	18
3.2.1. Toxicité des HAP's en phase aqueuse	18
3.2.2. Demande biochimique en oxygène (DBO) des sédiments référence en présence de HAP (LPEM) :	21
3.2.3. Toxicité potentielle des sédiments naturels.....	21
3.2.4. Toxicité des HAP's dans les sédiments naturels et artificiel	22
3.2.5. Toxicité des HAP's introduits dans les sédiments en présence de concentrations variables de matière organique (tétramin)	25
4. DISCUSSION ET CONCLUSION	30
4.1. <i>Aspects méthodologiques</i>	30
4.1.1. Les sédiments référence.....	30
4.1.2. La méthode de dopage	30
4.1.3. Les rendements des dopages (annexe 5.1)	31
4.1.4. La prématuration des sédiments.....	32
4.1.5. L'extraction de l'eau interstitielle	32
4.2. <i>Toxicité des HAP's en phase aqueuse</i>	32
4.3. <i>Toxicité des sédiments dopés par des mélanges de HAP's</i>	32
4.4. <i>Influence de la matière organique sur la toxicité des HAP's</i>	32
4.4.1. Effet sur les copépodes	32
4.4.2. Effets sur les embryons d'huître.....	33
4.5. <i>Comparaison de la sensibilité des deux espèces test</i>	33
4.5.1. En phase aqueuse.....	33
4.5.2. Lors des tests sur sédiments	34
4.6. <i>Conclusions et perspectives</i>	34
4.6.1. Aspects méthodologiques	34
4.6.2. Toxicité.....	35
4.6.3. Perspectives	36
BIBLIOGRAPHIE	39

ANNEXES45

Annexe 1 : Analyses chimiques et granulométriques des sédiments naturels.....46

Annexes 2.1 à 2.3 : Caractéristiques physico-chimiques et écotoxicologiques des trois HAP's sélectionnés dans le projet.51

Annexe 3.1 : Description du dopage des sédiments en un mélange des 3 HAP's56

Annexe 3.2 : Dopage du sable des Blancs Sablons en phénanthrène et tétramin ; expérience commune à l'Institut Océanographique et Ifremer en 200159

Annexe 3.3 : Illustrations du dopage des sédiments naturels et artificiels63

Annexe 3.4 : Technique de dopage des sédiments64

Annexe 4.1 : Protocole expérimental du bio essais "développement embryo-larvaire de bivalve"67

Annexe 4.2 : Illustration des anomalies de développement embryo-larvaire de l'huître creuse (*Crassostrea gigas*).68

Annexe 4.3. Protocole expérimental du bio-essais « létalité » du copépode harpacticoïde *Tigriopus brevicornis*69

Annexe 4.4 Méthodes d'analyse des effets conjugués des substances toxiques sur les organismes tests71

Annexe 5. : Rendement de dopage des sédiments artificiels et naturels73

Annexe 6.1 : Evaluation de l'innocuité des matrices artificielles.....77

Annexe 6.2 : Evaluation de l'innocuité des matières organiques79

Annexe 6.3 : Evaluation de l'innocuité des solvants80

Annexe 6.4 : Toxicité des HAP's.en phase aqueuse81

Annexe 6.5 : Réponse du test copépode soumis à différents facteurs méthodologiques82

Annexe 6.6 : Toxicité des HAP's pour le copépode dans les compartiments sédiments et eau de mer.....84

Annexe 6.7 : Biodisponibilité des HAP's considérés individuellement ou en mélange en fonction de la concentration en matière organique.....86

Annexe 6.8 : Matière organique et sédiment.....87

Cartes

<i>Carte 1 :</i>	situation géographique des sédiments naturels testés.....	6
------------------	---	---

Tableaux :

<i>Tableau 1 :</i>	Nature physico-chimique des sédiments	6
<i>Tableau 2 :</i>	Facteurs d'influence de l'estimation de la qualité des sédiments naturels	7
<i>Tableau 3 :</i>	Composition du sédiment artificiel utilisé.....	8
<i>Tableau 4 :</i>	Caractéristiques des essais d'écotoxicologie	12
<i>Tableau 5 :</i>	Toxicité comparée des trois hydrocarbures vis-à-vis des deux espèces test marines	19
<i>Tableau 6 :</i>	CE50 nominales et concentrations de chaque HAP pour la valeur de la CE50.....	20
<i>Tableau 7 :</i>	Concentrations des trois HAP's dans le mélange et dans les sédiments testés 1, 4 et 8 jours après dopage	23
<i>Tableau 8 :</i>	Concentrations des HAP's en µg/kg dans les sédiments pour obtenir les CL50 en eau de mer pour le copépode <i>T. brevicornis</i> exposé au sédiment.....	25
<i>Tableau 9 :</i>	Effet des mélanges de HAP, en présence de matière organique (Tetramin en % par rapport au sédiment) à des concentrations variables, sur le taux de mortalité du copépode <i>Tigriopus brevicornis</i>	27

Figures :

<i>Figure 1 :</i>	Evolution de la toxicité moyenne (n = 5) de l'eau interstitielle évaluée par le test développement embryonnaire de l'huître creuse exprimé en pourcentage Brut de larves Anormales (PBA) en fonction de la vitesse (force centrifuge relative) et de la durée d'extraction	16
<i>Figure 2 :</i>	Toxicité potentielle des sédiments naturels.....	21
<i>Figure 3 :</i>	Evolution de la toxicité des sédiments naturels et artificiel, 1 à 8 jours après leur dopage et leur incubation à 21 °C à l'abri de la lumière.....	24
<i>Figure 4 :</i>	Biodisponibilité des HAP en présence de matière organique (Tetramin)à différentes concentrations	26
<i>Figures 5 :</i>	5a Toxicité du sédiment BS dopé en phénanthrène puis tétramin ; 5b Toxicité du sédiment BS simultanément dopé en phénanthrène et tétramin.....	29

Préambule

Les travaux du programme 1998-2001 ont été réalisés pour les expérimentations sur les organismes d'eau douce dans 4 laboratoires : les laboratoires d'écotoxicologie du Cemagref et de l'Ineris, le laboratoire TEPE de l'université de Chambéry, et l'EBSE (Université de Metz) et pour ce qui concerne les travaux sur les organismes marins dans deux laboratoires à l'Ifremer (Brest) et au LPEM de l'Institut d'Océanographie (Paris) Le laboratoire d'analyse chimique de l'université de Lille (LCAM) a contribué aux travaux en réalisant la plus grande partie des analyses de HAPs dans les différents compartiments étudiés (eau, sédiment et organismes).

Des réunions régulières (2 par an) ont été tenues. Des rapports intermédiaires annuels (99 et 00) ont été remis à l'Ineris (un rapport de synthèse et un rapport par laboratoire).

Le présent rapport résume les recherches effectuées et présente les principaux résultats et conclusions obtenues à l'issue des recherches. Le détail expérimental est disponible dans les rapports intermédiaires détaillés.

	Toxicité HAPs en sédiment artificiel	Toxicité HAPs en sédiment naturel	Evolution microbienne	Analyse chimique HAP, COD, COT	Toxicité HAPs et composition du sédiment
Cemagref, Lyon 1 Laboratoire d'écotoxicologie 2 Laboratoire Ecodynamique des Sédiments		* mesure en sédiments naturels	* étude d'activités enzymatiques sédiment naturel et artificiel	* eau douce	* comparaison de sédiments naturels
Université de Savoie/ESIGEC Chambéry 2 Laboratoire Transferts et Effets des Polluants dans l'Environnement	* microcosmes pluri spécifiques * tests monospécifiques	* microcosmes pluri spécifiques * tests monospécifiques	* étude d'activité enzymatiques et densités bactériennes en microcosmes	* eau douce	* comparaison de sédiments naturels * comparaison de sédiments naturels et artificiels
Université de Metz 3 EBSE	* impact sur organisme de la colonne d'eau		*		*
Université de Lille 4 Laboratoire de chimie analytique et marine				* eau douce et marine	
Ineris Verneuil en Halatte 5 Unité Risques Ecotoxicologiques	*				*
Institut d'océanographie, Paris 6 Laboratoire de Physiologie des Etres Marins	* test monospécifique	* mesures en sédiment naturel et artificiel	* mesure de DBO		* comparaison de sédiments naturels et artificiels
Ifremer, Brest 7 Polluants Chimiques	* test monospécifique	* mesure en sédiments naturels			* comparaison de sédiments naturels et artificiel

Laboratoires participants et nature de la participation.

1. Introduction

- Les résultats présentés dans cette synthèse reprennent en partie ceux présentés séparément par les deux laboratoires marins : le laboratoire de Physiologie des êtres marins de l'Institut océanographique de Paris et l'antenne brestoise du Département Chimie des polluants de la Direction de l'Environnement Littoral de l'Ifremer, dans les rapports de juillet 99, juillet 2000 et octobre 2002 complétés par des résultats obtenus de juillet 2000 à juillet 2001.

L'objectif principal du programme devait permettre de caractériser les effets de la matière organique sur "l'expression" (la biodisponibilité) de la toxicité de substances modèles ; trois Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques (HAP) : le fluoranthène, le benzo(k)fluoranthène et le phénanthrène. En effet outre que les HAP soient présents dans l'environnement naturel, les concentrations dans les sédiments peuvent être importantes, en particulier dans les boues portuaires (boues de dragage) dont le rejet en haute mer peut avoir une incidence néfaste sur l'écosystème exposé. Le caractère hautement cancérigène de ces contaminants et leur concentration possible dans les chaînes alimentaire jusqu'à l'homme rendent nécessaire des études permettant une évaluation des risques. Beaucoup de HAP n'existent pas sous forme dissoute dans les milieux aquatiques mais associés à des particules (Mac Kay *et al.*, 1992 ; Mix, 1984 et Neff, 1979, 81, 85). -

Les analyses des substances chimiques de l'eau et des sédiments ne suffisent pas, à elles seules, à évaluer l'impact des contaminants sur l'environnement marin ; l'étude des indices biotiques des peuplements benthiques ou meiobenthiques mettent en évidence un effet à plus ou moins long terme d'une évolution de la qualité des sédiments. Les bio-essais qui font appel au vivant permettent de détecter une toxicité potentielle, globale, du milieu en prenant en compte les phénomènes de synergie et d'antagonisme entre les polluants. Effets que les analyses chimiques limitées techniquement (sensibilité des appareils d'analyse, absence de réactifs spécifiques aux substances à détecter...) ne permettent pas toujours de détecter. Les bio-essais se situent donc en amont dans l'évaluation de la pollution marine, donnant ainsi une indication sur l'état de santé du milieu permettant de détecter les sources de contamination et de prédire les risques pour l'environnement.

Les problèmes liés au compartiment "sédiment" ont été négligés jusqu'à la fin des années 1970 (Burton, 1991). Depuis de nombreux travaux se sont développés concernant les rejets de dragage, les dépôts de sédiments et l'impact de leur contamination sur l'environnement ; mettant en évidence le rôle de réservoir de ce compartiment à partir duquel les contaminants peuvent être directement transférés aux organismes benthiques (Cairns *et al.*, 1984 ; Giesy et Hoke, 1991), mais aussi à la colonne d'eau (Dickson *et al.*, 1987), donc aux animaux pélagiques. L'évaluation de la toxicité des sédiments s'est développée récemment en Europe (OCDE, 1993 ; Hill *et al.*, 1993), et si de nombreuses discussions ont eu lieu (Burton, 1992), les tests de toxicité existant concernent en majorité le domaine dulçaquicole.

Les recherches dans le domaine marin sont en plein essor et prennent en compte les caractéristiques physiques et chimiques du milieu : la salinité, le pH, la charge en carbone organique (COT), l'hydrodynamique, la sédimentologie et le temps de résidence de l'eau interstitielle (Power et Chapman, 1992). Dillon (1994) propose un protocole d'essais séquentiels : tests à développer en vue d'une intercalibration voire une normalisation avant de les proposer comme outils à incorporer dans l'évaluation des risques toxiques. Smrcek et Zeeman (1998) et Hill *et al.* (1993) classifient trois types de tests pour évaluer les effets des sédiments : des essais sur sédiments entiers naturels contaminés ou dopés et des essais sur l'eau interstitielle (ou des extraits aqueux). Les tests portant sur les sédiments naturels permettent une mesure directe de la toxicité globale et intègrent l'évaluation de l'effet des substances chimiques présentes dans les sédiments (détectables ou non). Les essais sur sédiments dopés permettent de travailler dans des conditions où les paramètres physico-chimiques sont connus et contrôlés évitant leur modification lors des prélèvements et modes de conservation, mais posant quelques difficultés quant à l'extrapolation des résultats au milieu naturel. Les essais sur l'eau interstitielle ou des extraits aqueux prennent en considération l'effet toxique de la portion soluble des substances chimiques qui, non adsorbée et/ou absorbée sur les particules, est la plus bio-disponible et directement responsable des effets observés sur les organismes benthiques (Di Toro *et al.*, 1991). Ou pouvant être impactée lors de la mise en suspension, dans la colonne d'eau, du sédiment au cours, par exemple d'opérations de dragage, alors que les essais en contact direct prennent en compte l'eau interstitielle ainsi que tous les contaminants hydrophiles et hydrophobes plus ou moins adsorbés et/ou complexés sur les particules (Brouwer *et al.*, 1990).

Ce qui explique l'intérêt d'employer, dans un schéma d'étude des sédiments des espèces de la colonne d'eau, comme les embryon d'huître creuse (*Crassostrea gigas*) qui sont en contact avec les sédiments au cours des premières heures de leur développement, en complément d'un crustacé comme le copépode *Tigriopus brevicornis* meiobenthique qui vit à la fois dans le sédiment, lorsque sa granulométrie le permet, et proche du sédiment en pleine eau ; et la recherche du rôle de la matière organique exprimée en carbone organique total (COT) sur la biodisponibilité des contaminants.

Dans le cadre de ce programme nous avons cherché à :

- Mettre au point des méthodes expérimentales nécessaires aux tests sur des sédiments avant et après enrichissement en matière organique et HAP.
- Utiliser des méthodes applicables aux sédiments d'eau douce et aux sédiments marins.
- Comparer les effets obtenus avec des sédiments naturels et artificiel présentant des teneurs en matière organique (COT) différentes.
- Vérifier l'existence ou non d'une additivité des toxicités des HAP's.

2. Matériels et méthodes

2.1. Analyses chimiques

Les analyses nécessaires, lors des expérimentations de 1999, ont été réalisées par le Laboratoire de Chimie Analytique et Marine de l'Université de Lille 1 (partenaire du projet). Elles ont porté sur l'analyse des trois HAP's dans les milieux testés : eaux, sédiments artificiel et naturels avant et après dopage en HAP, étude de la désorption en particulier, présence dans l'eau surnageante et l'eau interstitielle après dopage.

D'autres analyses sur des sédiments naturels ont été effectuées par le Laboratoire de l'Institut Pasteur de Lille. Elles ont permis de caractériser les sédiments employés lors des différentes expérimentations (Annexe 1-1).

Faiblement solubles dans l'eau douce (en particulier le benzo-k-fluoranthène) si le sédiment contient de grandes quantités de pétrole, les HAP peuvent être présents à l'état de particules polluantes, de films liquides, absorbés sur des particules sédimentaires, absorbés dans la matière organique, dissous dans l'eau interstitielle, à l'état solide ou liquide dans les pores et présents en fines couches huileuses autour des particules sédimentaires. Jusqu'à présent, aucun procédé standardisé n'a été validé permettant de révéler l'état physique de la contamination par les HAP. L'utilisation d'un sédiment naturel nécessitait la recherche de HAP présents éventuellement. Dans l'environnement, les HAP constituent "un bruit de fond" et font l'objet d'analyses mensuelles le long du littoral national par le biais du Réseau National d'Observation qui mesure chaque mois 16 HAP dans l'eau, les sédiments et des organismes, selon les normes de l'EPA.

En 1999 l'analyse du sédiment naturel (utilisé par le LPEM) a montré une présence des HAP testés, à l'état de traces. Les analyses effectuées en 2001 n'ont pas montré une augmentation significative de la concentration des HAP dans le sédiment naturel qui est restée inférieure à quelques $\mu\text{g}/\text{kg}$ de sédiment. 7,5 μg de phénanthrène par kg de sédiment sec, 2,6 μg de fluoranthène par kg de sédiment sec, 1,56 - 1,83 $\mu\text{g}/\text{kg}$ pour le benzo(k)fluoranthène en 1999 (Annexe 1.2.).

2.2. Choix des HAP's

Après étude bibliographique, par l'ensemble des équipes associées au programme, trois HAP's (le phénanthrène, le fluoranthène et le benzo(k)fluoranthène) ont été retenus pour l'étude de toxicité et biodisponibilité dans les sédiments, en raison de leur toxicité, et de leur présence prépondérante dans les sédiments dulçaquicoles comme marins comme indicateurs d'une contamination. Ils appartiennent aux 16 HAP's retenus sur la liste prioritaire de l'EPA et leurs concentrations sont régulièrement mesurées dans le milieu marin, par le RNO (eau, matière vivante et sédiments). Leurs caractéristiques physico-chimiques, toxicologiques et écotoxicologiques sont présentées dans l'Annexe 2.

2.3. Sédiments

2.3.1. Choix d'un sédiment de référence

Afin de contribuer à la compréhension des processus de contrôle des phénomènes de toxicité en relation avec la structure et la composition chimique du sédiment il a été proposé deux approches expérimentales :

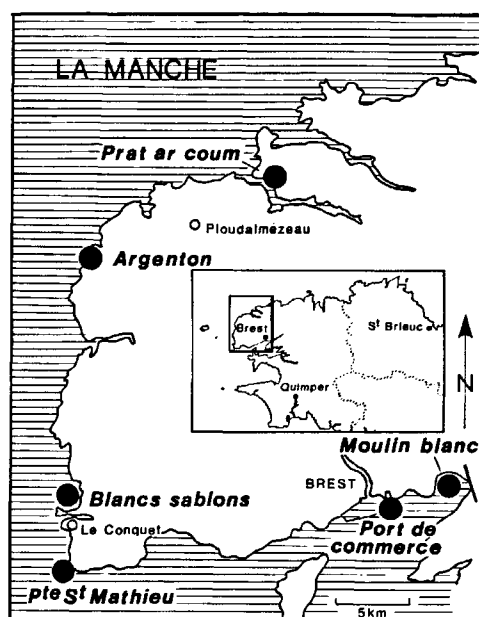
- d'une part, l'utilisation d'un sédiment naturel de référence qui sera utilisé pour toutes les expérimentations en milieu marin. Ce sédiment pouvant être employé comme témoin négatif et comme témoin positif après enrichissement en hydrocarbures ou tout autre contaminant,
- d'autre part, l'emploi d'un sédiment de référence artificiel identique pour le milieu marin et le milieu dulçaquicole permettant de comparer les réponses biologiques des organismes des deux milieux aux contaminants ajoutés à cette matrice dont les composants sont connus et contrôlés.

2.3.2. Les sédiments naturels

Trois sédiments naturels pouvant servir de sédiment référence ont été prélevés :

- un sable fin à faible teneur en matière organique (COT = 0,1 %, Blancs Sablons = BS),
- un sable-vaseux (COT = 1,3 %) prélevé sous les tables ostréicoles de l'Aber Benoît, à proximité d'une zone rurale de densité assez faible, il subit l'influence des activités rurales proches, ostréicoles et de plaisance (Prat ar Coum = PAC)
- un sédiment coquillier prélevé sur un petite plage exposée plein Ouest dans une zone peu habitée (Pointe Saint-Mathieu = PSM).
- un sédiment sablo-vaseux prélevé dans l'anse du Moulin Blanc (MB) lui a servi de sédiment naturel contaminé.

Tous ont été prélevés à basse mer, par des coefficients de marée de 70 à 85 et en surface (deux premiers centimètres).



Carte 1 : localisation géographique des sédiments naturels testés

Le tableau 1 donne les principaux paramètres physico-chimiques des sédiments naturels testés : notons que le sable des Blancs Sablons ne contient pas ou très peu de COT et présente une contamination en HAP proche du niveau du bruit de fond

Sédiment	MB	PAC	BS	PSM
% humidité	72	40	24	21
% COT	5,9	1,3	0,1	0,1
Granulométrie				
% < 10 µm	9,85	21,1	0,37	0
% < 63 µm	34,9	57,5	0,97	0
Métaux mg/kg sec	Cr 47, Pb 73 ; Zn 230, Cu 55	Cr 19, Pb 23 ; Zn 52, Cu 6	Cr 24, Pb 24 ; Zn 30, Cu 2	Cr, Pb ; Zn < 8 Cu < 1
Phénanthrène	0,15	0,016	< 0,005	< 0,005
Fluoranthène	0,25	0,044	< 0,005	< 0,005
Benzo(k)fluoranthène mg/kg sec	0,065	0,017	< 0,005	< 0,005
∑ PCB's µg/kg	59	52	< 10	< 10

Tableau 1 : Nature physico-chimique des sédiments naturels (analyses réalisées à l'Institut Pasteur de Lille)

MB : MOULIN BLANC, PAC : PRAT-AR-COUM, BS : BLANCS SABLONS, PSM :
POINTE SAINT-MATHIEU

La validité de l'évaluation de l'écotoxicité des sédiments naturels, comme de l'eau de mer, est entièrement sous la dépendance de facteurs (tableau 2), déclenchés

inconsciemment par l'expérimentateur, plus ou moins mesurables, liés aux différentes étapes franchies par le milieu sédimentaire à tester, entre son prélèvement dans l'environnement naturel et le test de qualité appliqué au laboratoire. Sans un maximum de précautions avant son utilisation pour des tests d'exposition, celui-ci peut être sensiblement modifié et être différent du sédiment au moment de son prélèvement *in situ*. Le temps est un des facteurs principaux de modification du sédiment.

Extraction	Conditionnement	Transport	Stockage	Traitement	Conditions expériment.
Type de matériel utilisé : (carotte, benne) Représentativité par rapport au site étudié Etat au moment du prélèvement	Boîte, sac en plastique risque de contamination du contenant vers le contenu	secouage : modification de l'homogénéité, de la distribution des contaminants	Effets de : la durée, la température la lumière, la microbiologie	<i>mécanique</i> : modification de la granulométrie rupture des grains <i>chimique</i> : qualité des grains, ajout de contaminants	Température Eclairage Mode : calme, agité

Tableau 2 : Facteurs d'influence de l'estimation de la qualité des sédiments naturels

L'évaluation de la "qualité biologique globale" d'un sédiment naturel (total) en supposant qu'il a gardé ses caractéristiques entre son prélèvement et le test d'exposition est relativement facile à déterminer par des tests biologiques. Encore faut-il avoir présent à l'esprit que la réponse des organismes dépend de la biodisponibilité des contaminants. Il s'agit d'un concept essentiel pour les organismes vivants. En effet entre l'analyse chimique qui déterminera de manière brut les différentes familles de contaminants (les résultats étant dépendants des progrès de l'analyse chimique : invention de nouveaux réactifs, abaissement des seuils de sensibilité des appareils etc.) et les effets biologiques ou toxicité net, des différences importantes peuvent apparaître. Les organismes vivants peuvent être sensibles à des concentrations indétectables par l'analyse chimique. La matière organique peut jouer soit un rôle de détoxifiant en diminuant la toxicité globale soit au contraire accroître cette toxicité.

Bien qu'il n'existe pas de sédiment de référence naturel type, un sédiment de référence, quelque soit sa composition granulométrique et géochimique, doit être un sédiment non toxique pour les organismes de l'écosystème auquel il appartient et ceux utilisés pour les bioessais. Après différents tests de toxicité effectués avec des sédiments d'origines variées (tableau 1 et annexe 1.1) le choix du sédiment de référence s'est porté sur le sable des Blancs Sablons.

2.3.3. Le sédiment artificiel

L'emploi d'un sédiment de référence artificiel, dont les constituants sont parfaitement connus et paramétrés, apparaît comme un modèle utile simple pour

l'étude de la toxicité des contaminants contenus dans le sédiment pour les organismes exposés. Il permet de s'affranchir des contraintes de prélèvement dans le milieu naturel, du transport et de la conservation pour le maintien de ses caractéristiques au moment du prélèvement *in situ*.

Dans le cadre du programme, un sédiment artificiel destiné à être utilisé conjointement en eau douce et en eau de mer a été préparé par l'Ineris. Il correspond à leur sédiment C1. Sa composition s'appuie sur des formulations expérimentées en écotoxicologie terrestre et aquatique : sable, argile et matière organique ; les formulations différant par les proportions de chaque composant et la nature de la matière organique. Après les essais préliminaires sur la toxicité de différentes matières organiques (β puis α cellulose, spiruline et tétramin) à divers concentrations (0 à 10 %), la formulation retenue contient 2 % de COT (Carbone Organique Total) constitué d' α cellulose et de tétramin. (tableau 3).

<i>Composants</i>	<i>Quantité % poids sec</i>
Sable de Loire < 2 mm	65
Argile (kaolin)	30
Carbonate de calcium	0,1
Tétramin (CO = 44,1 %)	0,15
α cellulose (CO = 41,5 %)	4,75
COT	2 (théorique)

Tableau 3 : Composition du sédiment artificiel (C1 de l'Ineris)

Préparé à sec, lorsqu'il est associé à l'eau de mer sa capacité d'absorption va jusqu'à 30 % (6,8 g d'eau de mer dans 23 g de sédiment saturé d'eau). Il est additionné de 0,15 % soit 15.10^{-4} g de Tétramin par kg de sédiment. Ce taux de 0,15 % marquant une limite de concentration au-delà de laquelle les développements bactériens sont prépondérants et nuisent aux tests. Le Tétramin, mélange protéique riche en oligo-éléments, destiné à l'alimentation des poissons en aquariologie, constitue la source de matière organique utilisée pour l'étude de la biodisponibilité des HAP ajoutés au sédiment au cours des différentes expériences.

Le choix de la matière organique associée au sédiment artificiel s'est porté sur du Tétramin, après divers essais négatifs avec différents types de particules organiques (Spiruline atomisée par exemple) Le Tétramin habituellement employé en tant qu'aliment pour les poissons d'ornement. est constitué de chair de poissons et de sous-produits de poissons, céréales, levures extraits de protéines végétales, mollusques et crustacés, huiles et graisses, algues, sucres et contient plus de 40 substances nutritives. Coloré avec des additifs CEE et anti-oxydants CE. Présenté sous forme de paillettes séchées de plusieurs mm, il doit être atomisé. pour les tests. Pour certaines expériences des témoins du sédiment artificiel sans Tétramin ont été utilisés.

2.3.4. Maturation des sédiments (Ifremer-LPEM)

Afin d'améliorer la représentativité et la qualité des sédiments artificiels, plusieurs auteurs ont proposé une étape préliminaire de conditionnement avant leur utilisation dans les essais écotoxicologiques. Le conditionnement consiste à immerger le sédiment artificiel sous colonne d'eau, dans les conditions du test. Cette étape a pour but de stabiliser les caractéristiques physico-chimiques du sédiment, de permettre le développement bactérien et d'initier une dégradation de la matière organique (on parlera de maturation), avant addition du toxique. L'utilisation de sédiments artificiels conditionnés étant souvent recommandée en eau douce (Suedel et Rodgers, 1994 ; Burton, 1996 ; Fleming *et al.*, 1998 ; OCDE, 2001), nous avons fait des essais de maturation avec les sédiments naturels et artificiel en eau de mer en ajoutant différentes quantités de matières organiques (tétramin et/ou cellulose).

2.3.5. Préparation des sédiments

Le sédiment artificiel fourni par l'Ineris est stocké à température ambiante dans leur contenant d'origine, et préparé pour les essais dans les 48 heures qui précèdent les expérimentations.

- Au LPEM

Le sédiment naturel de référence est prélevé in situ par les soins de l'Ifremer Brest au lieu dit les Blancs Sablons. Compte tenu de la présence de matière organique, dans les sédiments naturels de référence, un développement bactérien est toujours possible à la température ambiante. Prélevé humide, le sédiment est expédié à Paris par voie rapide et conservé au réfrigérateur à 4 °C. Pour les tests d'exposition le sédiment est utilisé dans les 3 jours qui suivent le prélèvement.

- A Ifremer

Dès que prélevés, les sédiments naturels sont transportés en glacière au laboratoire, en pot de polyéthylènes de un litre (prélavés et rincés), puis stockés moins de 15 jours au réfrigérateur avant leur emploi. Avant la préparation des milieux, les sédiments sont homogénéisés et tamisés à 2 mm afin d'éliminer les gros débris, la flore et la faune. Ils ont ensuite été testés tels quels, ou après enrichissement en HAP's ou MO (matière organique), puis testés pour des valeurs de 0,1 à 10 g de sédiment humide/l. Le taux d'humidité est déterminé sur trois aliquots (48 heures à 60 °C) afin de calculer les quantités de HAP et MO nécessaires au dopage qui se fait en fonction du poids sec de sédiments.

2.4. Dopage des sédiments

- A Ifremer

La méthode de dopage utilisée pour les sédiments artificiel et naturels en eau de mer, comme en eau douce, est une méthode de "wall coating", permettant d'éviter l'introduction de solvant dans le milieu. Le schéma expérimental est décrit en

annexes 3. L'enrichissement est réalisé dans des bouteilles en pyrex dans lesquelles sont introduites les solutions mères de HAP. Le volume de solution mère nécessaire à l'obtention de la concentration nominale souhaitée (mg/kg de sédiment sec) est introduit sur les parois de la bouteille qui est mise en rotation. Le solvant est alors évaporé sous hotte aspirante. Une fois les solvants évaporés, le HAP (ou mélange de HAP's) déposé sur les parois est repris par le sédiment humide par brassage pendant trois heures à l'aide d'un système d'agitation rotatif type « roller » à la vitesse de 8-10 tours/min. Le sédiment est ensuite laissé au repos quelques heures à température ambiante puis utilisé ou stocké au réfrigérateur (3 jours maximum), ou plusieurs jours à 21 °C pour les effets de la durée du stockage sur la toxicité. Toutes les manipulations sont effectuées à l'abri de la lumière pour éviter la photodégradation des HAP's. (Annexes 3.1., 3.2., 3.3)

- Au LPEM

Pour le dopage, différentes techniques ont été employées en fonction du sédiment de référence, des volumes à traiter et du type de dopage : avec des poudres de HAP mélangées telles quelles en “ dopage à sec ”, ou par “ contact humide ” en employant une solution de HAP en solvant. (Annexe 3.4.).

Dopage à sec (poudre à poudre) : les HAP sont pesés à la balance de précision Metler AE 260 et introduits directement dans le flacon en verre pyrex de 1 litre remplie à moitié par le sédiment artificiel en poudre et mélangés tout d'abord manuellement à l'aide d'une tige en verre pendant quelques dizaines de secondes. Puis l'ensemble est obturé et disposé sur le Mélangeur rotatif identique à celui utilisé par l'Ifremer. La vitesse de rotation est de 40 t/mn maximum avec l'appareil utilisé, et la durée de rotation de 12 heures.

Dopage semi-humide du sédiment sec artificiel par contact avec une solution de HAP en solvant : les solutions aqueuses ne dépassent pas 2 ml par kg de sédiment (un plus grand volume d'acétone entraînant des effets létaux non négligeables pour le copéode). La solution aqueuse est déposée à l'aide d'une pipette sur les parois du flacon et le flacon est disposé sur le mélangeur rotatif “ roller ”. Vitesses de rotation et durée sont identiques au dopage poudre à poudre.

Dopage du sédiment naturel : le sédiment naturel humide est enrichi en HAP en poudre à l'aide d'un robot rotatif du commerce comme homogénéisateur (5000 t/minute) ce qui entraîne un mélange rapide en quelques minutes. Les résultats des séries de tests biologiques comme ceux de l'analyse chimique ont montré une bonne homogénéité du mélange sédiment naturel humide + poudre de HAP .

2.5. Méthodes et variables biologiques de mesure de la toxicité

En écotoxicologie l'utilisation d'organismes tests répond à différents critères. La représentativité de l'organisme dans l'écosystème marin, sa facilité d'emploi et le faible coût des tests sont les critères principaux pris en considération.

Deux organismes tests ont été utilisés : l'un le développement embryolaire de l'huître creuse (*Crassostrea gigas*) pour son importance économique l'autre le copépode *Tigriopus brevicornis* compte tenu de son appartenance à un écosystème marin côtier, dans la zone de balancement des marées, soumis à une pression anthropique forte.

2.5.1. Le test " développement embryo-larvaire "de l'huître creuse (Ifremer)

Les effets toxiques liés à la contamination des sédiments avant et après dopage en HAP ont été mesurés par le taux de réussite du développement embryo-larvaire de l'huître creuse en présence d'eau et/ou sédiment contaminés en HAP's.

Les stades du développement embryonnaire des bivalves marins sont bien connus pour leur très grande sensibilité aux substances (Calabrese *et al.*, 1973 ; Martin *et al.*, 1981 ; Robert *et al.*, 1986 ; Quiniou et Toularastel, 1991 ; His et Seaman, 1993 ; Beiras et His, 1994).

De plus l'emploi des embryons de bivalves est préconisé dans les études de surveillance et de détermination de la qualité de l'eau de mer par Woelke (1972), His et Robert (1986) et Thain (1992). Par la suite, ce type de bioessai, rapide et fiable, a été appliqué à la recherche des effets biologiques des sédiments contaminés (Chapman et Morgan, 1983 ; Swartz, 1989 ; Long *et al.*, 1990 ; Quiniou *et al.*, 1993 ; Naudin *et al.*, 1995 ; His *et al.*, 1997 ; His *et al.*, 1999 ; Quiniou et Alzieu, 1999 ; Géffard, 2001).

2.5.2. Le test copépode harpacticoïde *Tigriopus brevicornis* (IO - LPEM)

Plusieurs travaux relatifs à *Tigriopus brevicornis*, (Müller), copépode Harpacticoïde que l'on trouve fréquemment dans les flaques d'eau littorales de la zone intertidale atlantique et méditerranéenne ont permis de préciser les conditions d'élevage et d'utilisation en écotoxicologie (Bozik B., 1960 ; Falchir *et al.*, 1982 ; Lassus *et al.* 1984 ; Le Dean *et al.*, 1984 ; Lacaze J.C., Paquet F., 1989 ; Pavillon J.F. et J.C. Lacaze, 1990 ; Pavillon *et al.*, 2001 Comme espèce cible il présente l'avantage de cycles biologiques courts (3 à 6 semaines selon les conditions d'élevage), sa durée de vie est d'environ 4 mois. On peut le récolter facilement toute l'année, et sa conservation ou son élevage au laboratoire, est relativement simple. Les populations de *Tigriopus* comprennent des femelles ovigères, dont la taille est en moyenne de 1,2 mm, pouvant porter de 15 à 50 œufs. La période d'incubation varie selon les conditions expérimentales et l'éclosion fournit un nombre de larves naupliennes qui passeront par différents stades de développement, avant d'atteindre l'âge adulte.

Le tableau 4 donne les caractéristiques des essais écotoxicologiques sur l'huître creuse et le copépode *Tigriopus brevicornis* et l'annexe 4 présentent en détail les protocoles des essais.

Organisme	Critère d'effet	Phase d'exposition	Système expérimental
<i>Tigriopus brevicornis</i> Crustacé Copépode Harpacticoïde	Mortalité 96 heures	Sédiment contact Eau interstitielle Eau surnageante HAP en phase aqueuse	Cristallisoirs en verre (20 ml) A la lumière
<i>Crassostrea gigas</i> Mollusque Bivalve Lamellibranche	Taux de réussite du développement embryo-larvaire 48 heures	Sédiment contact Eau interstitielle Eau surnageante HAP en phase aqueuse	Pots stériles, en polystyrène cristal (20 à 30 ml) Sans lumière

Tableau 4 : Caractéristiques des essais d'écotoxicologie

2.6. Résumé des expérimentations présentées en eau de mer

- Rendement des dopages.
- Recherche d'une technique d'extraction de l'eau interstitielle.
- Evaluation de la toxicité des MO, testées seules, avant leur emploi pour enrichissement des sédiments.
- Evaluation de l'innocuité des solvants et de la matrice artificielle.
- Toxicité des HAPS en phase aqueuse, testés seuls ou en mélanges binaires et ternaire.
- Evaluation de la toxicité potentielle des sédiments naturels et de la matrice artificielle avant enrichissement en MO.
- Evaluation de la toxicité des différents sédiments naturels et artificiel après enrichissement en HAP's et MO.
- Comportement du sédiment artificiel (C1) en présence d'eau de mer : conséquences du lavage sur sa qualité, qualité du sédiment artificiel, durées de maturation.

3. Résultats

3.1. Aspects méthodologiques

3.1.1. Rendement de dopage : flux de désorption

Le rendement du dopage s'évalue à la fois par l'analyse statistique des séries expérimentales des bioessais et des répétitions de ces bioessais et par l'analyse des flux chimiques dans les différents milieux : sédiment, eau interstitielle et eau surnageante. La concentration dans les différents compartiments dépendant des constantes de dissolution des HAP, du relargage ou des fixations par les particules des HAP adsorbés ou absorbés et de la bioturbation due aux mouvements des animaux sur ou dans le sédiment.

Les coûts financiers des analyses n'ont pas permis d'effectuer de grandes séries de mesures. Celles-ci ont concernées essentiellement le phénanthrène. Les analyses ont été effectuées par le Laboratoire de Chimie analytique et marine partenaire du programme. Les prélèvements pour analyse ont été effectués sur des durées variables, ne dépassant pas 9 jours limite de maturité évaluée pour le sédiment artificiel (cf rapport IO-LPEM, 1999) soit le double de la durée des tests létaux pour le copépode et 9 fois la durée du test bivalve (annexe 5).

3.1.1.1. Phénanthrène

Sédiment artificiel

- Analyse à l'état brut (sédiment + eau interstitielle) : la diminution de la concentration initiale ($1,95 \text{ mg.kg}^{-1}$) est de 75 % au bout de 48 heures et reste stable au bout de 9 jours. Ce qui implique un flux de phénanthrène vers l'eau surnageante d'environ 8,3 % par jour.
- Analyse après centrifugation (sur le culot après élimination de l'eau surnageante) : 18 % au bout de 9 jours. On peut considérer qu'il s'agit de la quantité de Phénanthrène piégée par les particules sédimentaires. La partie qui a disparue a suivi le chemin eau interstitielle puis eau surnageante.
- Analyse de l'eau interstitielle prélevée après dopage du sédiment : une diminution de 45,5 % est observée au bout de 9 jours. Il s'agit de l'eau brut qui contient des particules. Cette diminution de 5 % par jour souligne l'importance du flux de phénanthrène des particules vers l'eau interstitielle et de l'eau interstitielle vers l'eau surnageante. L'eau surnageante agit comme un "aspirateur".
- Analyse de l'eau surnageante : une concentration de $90,34 \mu\text{g.l}^{-1}$ est observée en 48 heures.

Sédiment naturel des Blancs Sablons :

- Analyse du sédiment brut (sédiment + eau interstitielle HAP naturels) : la diminution est de 55 % au bout de 4 jours et proche de 100 % au bout de 9 jours.
- Analyse de l'eau interstitielle prélevée après dopage du sédiment : au bout de 4 jours la diminution est de 68 % et de 74 % au bout de 9 jours soit une diminution d'environ 8,2 % par jour. Cette diminution est plus importante que dans le milieu artificiel.
- Analyse de l'eau surnageante : un maximum de concentration est obtenu au bout de 2 jours et après diminution à 4 jours de 39 % semble se stabiliser au 9^e jour. Le flux moyen est de 1,5 % par jour.

Les flux de HAP du sédiment dopé (artificiel ou naturel) dans l'eau surnageante n'expliquent pas la diminution concomitante dans le sédiment brut et l'eau interstitielle. La disparition du HAP du milieu test peut avoir plusieurs origines : la libération dans l'atmosphère du fait du caractère volatil du HAP, la fixation sur les particules en suspension dans l'eau surnageante et la dégradation par les bactéries du HAP.

3.1.1.2. Fluoranthène

Sédiment artificiel

- Analyse à l'état brut (sédiment + eau interstitielle) : la diminution de la concentration initiale est de 54 % au bout de 4 jours, soit en moyenne 13,5 % par jour.
- Analyse de l'eau surnageante : une diminution de la concentration de 55 % a été observée sur 4 jours dans une première série et de 40 % dans une deuxième série.

Le comportement des HAP en présence de sédiment artificiel n'est pas le même le flux est plus rapide pour le fluoranthène. Sans doute en relation avec leur coefficient de dissolution respectifs.

3.1.2. Recherche d'une méthode d'extraction de l'eau interstitielle

Une étude préliminaire, a eu pour objet :

- de rechercher une technique d'extraction d'eau interstitielle permettant l'obtention d'un volume maximal d'eau,
- d'étudier l'influence du stockage sur la toxicité des différentes phases des sédiments,
- de comparer la toxicité de ces différentes phases.

L'obtention d'eau interstitielle par divers méthodes pose le problème des quantités d'eau à recueillir pour les analyses chimiques et les bioessais ainsi que de l'altération de cette eau au cours des phases d'extraction (Bufflap et Allen, 1995 ; Lange *et al.*, 1992). Plusieurs méthodes ont été développées *in situ* ou *ex situ*. Parmi les principales, le pressage et la centrifugation ont été les plus étudiés (Ankley et Schubauer-Berigan, 1994). La centrifugation est recommandée et couramment utilisée dans les études de toxicité avec des vitesses de rotation et des durées variables (Ankley et Schubauer-Berigan, 1994 ; Cook et Wells, 1996 ; Hoke *et al.*, 1992). C'est une méthode simple et rapide qui nécessite un équipement moins spécifique que le pressage. La centrifugation permet de recueillir jusqu'à 30 % du volume initial en sédiment dans un temps inférieur à 30 mn (Ankley et Schubauer-Berigan, 1994). Toutefois, elle est souvent suivie d'une filtration pour permettre l'élimination des résidus de matière en suspension. Cette filtration peut engendrer une perte de contaminants potentiellement toxiques par adsorption sur le filtre, elle est donc déconseillée (Ankley et Schubauer-Berigan, 1994 ; Carr et Chapman, 1995).

En raison de ces données, c'est la centrifugation qui a été retenue comme méthode d'extraction de l'eau interstitielle, et les recherches ont été axées sur la détermination d'une vitesse de rotation et d'un temps d'extraction adaptés aux sédiments marins vaseux ou sablo-vaseux en prenant en compte l'aspect quantitatif des volumes recueillis et l'aspect toxicologique de l'eau extraite. Les essais ont été menés sur quatre sédiments ayant une distribution granulométrique différente, pour trois durées de rotation (10, 20 et 30 mn) et quatre vitesses : 5 000, 10 000, 15 000 et 20 000 g.

Les résultats obtenus ont montré que si, de façon générale, la quantité d'eau interstitielle augmente avec la vitesse et la durée de centrifugation, les volumes diffèrent significativement entre les sédiments et sont corrélés au taux de pélites. Une analyse de régression multiple effectuée pour les trois variables (vitesse, durée et taux de pélites) a permis de montrer que la vitesse de rotation et le taux de pélites sont deux variables explicatives de la variation des volumes d'eau recueillis par centrifugation (Parenthoën, 1997 ; Quiniou *et al.*, 1999).

L'étude a aussi porté sur l'influence de la vitesse et de la durée de la centrifugation sur la toxicité de l'eau interstitielle. Les résultats ont mis en évidence que la toxicité la plus élevée est observée pour une durée d'extraction de 10 mn, indépendamment de la vitesse de centrifugation (figure 1).

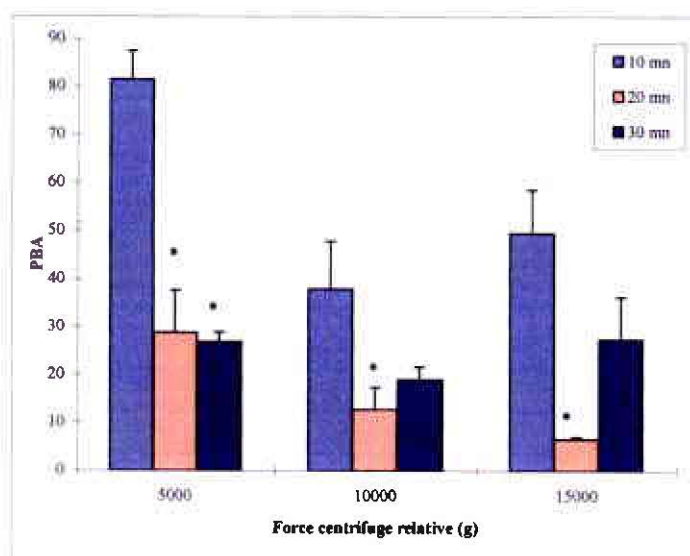


Figure 1 : Evolution de la toxicité moyenne (n = 5) de l'eau interstitielle évaluée par le test développement embryonnaire de l'huître creuse exprimé en pourcentage Brut de larves Anormales (PBA) en fonction de la vitesse (force centrifuge relative) et de la durée d'extraction (* résultats significativement différents par rapport à 10 mn pour $p = 0,05$ - test de Student).

Ces résultats montrent que la toxicité de l'eau interstitielle est dépendante des modalités de centrifugation. Carignan *et al.* (1985) ont montré que cette différence est due à la présence dans l'eau interstitielle d'une plus grande quantité de cuivre et zinc sous forme ionique lors d'une extraction à 5 000 g qu'à 10 000 g ; Ankley et Schubauer (1994) ont eux aussi montré que les concentrations en cuivre, plomb et zinc étaient supérieures à 2 500 g qu'à 10 000 g. C'est pourquoi, le choix d'une extraction de l'eau interstitielle à 5 000 g pendant 10 mn a été retenue pour l'obtention d'un volume optimum avec une toxicité maximale. (Publication 1)

3.1.3. Evaluation de l'innocuité des matières organiques (Ifremer)

Les différentes matières organiques (MO) testées seules sont : la cellulose fibrillaire, le tétrammin et la spiruline qui ont été testées aux concentrations initialement prévues pour l'enrichissement des sédiments : 0 à 10 % de COT (les quantités de MO étant calculées en fonction de leur teneur en COT mesurées par les laboratoires de l'Ineris et le CEMAGREF (Cellulose = 40,3 % ; Tétrammin = 44,1 % ; Spiruline = 43,1 %).

Les résultats montrent que la cellulose, même présente à hauteur de 80 % du COT, est la seule compatible quelque soit le taux de COT pris en considération. En effet, même la teneur la plus faible testée pour le tétrammin (20 % des 1 % de COT) réduit le taux de réussite du développement embryonnaire de plus de 15 % par rapport au témoins, résultats obtenus lors de la première année du projet (Quiniou *et al.*, 1999),

reportés dans l'annexe 5.2. Les résultats obtenus ont permis de sélectionner le tétramin et la cellulose et de faire le choix de la quantité de matière organique maximale ajoutée aux sédiments testés : soit 5 % de MO dont 0,15 % de tétramin et 4,85 % d' α cellulose, correspondant à 2 % de COT (annexe 6.1.). Le tétramin entraîne en moyenne 10 % de développement anormal par rapport au témoin, ce qui peut être acceptable pour la réalisation des tests (rapport Pavillon *et al.*, 1999).

3.1.4. Evaluation de la toxicité potentielle des matrices artificielles

Dès la première année du projet d'étude, une matrice artificielle a été proposée comme sédiment de référence commun aux milieux dulçaquicole et marin. Une première étape a consisté à vérifier que cette matrice, mise au point pour l'eau douce, pouvait être employée pour le milieu marin sans engendrer d'effet toxique sur les espèces test marines.

Une première matrice M1, ne contenant pas de matière organique, puis le sédiment C1 (contenant l' α cellulose et du tétramin) de l'Ineris, ont été testés en contact direct sur le développement embryonnaire de bivalve.

Les résultats (Quiniou *et al.*, 2002.) montrent, que pour le test bivalve, la matrice artificielle M1 peut "éventuellement" être employée comme sédiment de référence, jusqu'à de la concentration de 5 g. de sédiment sec/L.

Les expériences menées au LPEM ont montré que certaines difficultés pouvaient apparaître dans l'emploi de ce sédiment en eau de mer. En particulier lorsqu'on procède à un test d'exposition des copépodes (*Tigriopus brevicornis*) au sédiment après brassage de ce dernier : la sédimentation des particules est extrêmement lente et au bout de 24 heures le milieu est encore trouble, certaines particules demeurant en suspension (annexe 6.6 : figures 3 et 4).

3.1.5. Evaluation de l'innocuité des solvants des HAP's

La toxicité potentielle des solvants seuls et en mélanges a été évaluée afin d'être assuré que les effets observés soient uniquement liés aux concentrations de HAP et non à leur solvants. Les résultats (annexes 6.3. et 6.6.) montrent qu'aux concentrations employées, ni le méthanol ni l'acétone n'entraîne de toxicité significative vis-à-vis des deux organismes tests.

3.1.6. Evaluation de l'effet de la maturation des sédiments enrichis en MO avant dopage en HAP's

En eau douce, après enrichissement en MO, le sédiment artificiel est mûri avant dopage en HAP's . La durée et les conditions de cette maturation ont été étudiées et suivies par les laboratoires dulçaquicoles afin d'arriver à un équilibre en dureté de l'eau, pH, oxygène et nitrites nitrates dans l'eau interstitielle et l'eau surnageante.

En milieu marin, deux essais de maturation ont été menés :

- enrichissement de la matrice artificielle et du sable des Blancs Sablons, par 10 % de COT (20 ou 80 % de tétramin et 20 ou 80 % de cellulose), et conservation une semaine sous forme humide (environ 30 % d'eau) à une température de 21 ± 2 °C,
- mise en eau de la matrice artificielle (alpha) enrichie par 5 % de MO (dont 0,17 % de tétramin) et du sable des Blancs Sablons enrichis de la même façon. La mise sous eau est faite selon les recommandation du groupe : 3 cm de sédiment plus 7 cm d'eau surnageante aérée par bullage.

Les résultats obtenus montrent que l'ajout de MO engendre un développement bactérien qui devient toxique vis-à-vis du test "développement embryon-larvaire de bivalve", ce qui nous a conduit à éliminer cette phase de pré-maturation des sédiments avant dopage en HAP'S (Quiniou *et al.*, 2000).

3.2. Toxicité

Les résultats présentés ici correspondent aux bio essais dont les critères de qualités sont remplis.

3.2.1. Toxicité des HAP's en phase aqueuse

- Pour les tests sur l'huître creuse (Ifremer), la mesure de la toxicité des trois HAP's en phase aqueuse a fait l'objet de plusieurs bioessais pour lesquels les hydrocarbures ont été testés seuls et en mélange : 2 par 2 en concentrations équivalentes (50 %) ou en mélange des 3 (33 % chaque ou Phénanthrène 25,44 % + Fluoranthène 52,63 % + Benzo(k) fluoranthène 21,93 %). Les CE 50 ont été calculées par Probit ou graphiquement lorsque les effets sont faibles. Les concentrations nominales ont été corrigées à partir des analyses chimiques faites sur le mélange contenant 25,44 % de phénanthrène, 21,93 % de benzo-k-fluoranthène et 52,63 % de fluoranthène (Quiniou *et al.*, 2002) ; ces valeurs permettent de calculer les pourcentages de pertes de chaque HAP du mélange analysé, et de recalculer les concentrations "effectives" pour les valeurs de CE50 obtenues dans les milieux testés.
- Pour les tests sur *Tigriopus brevicornis* (IO – LPEM), la mesure de la toxicité des trois HAP's en phase aqueuse a fait l'objet de plusieurs bioessais pour lesquels les hydrocarbures ont été testés individuellement. La détermination mathématique des CL50 à 48 heures a été calculée par la méthode de Bliss (1939), Pavillon *et al.* (1999, 2000).

3.2.1.1. Toxicité des trois HAP's testés seuls :

- Lorsqu'ils ont été testés à saturation en eau de mer de référence (annexe 6.4.), aucune toxicité n'a été observée pour *C. gigas* : la concentration d'hydrocarbure étant vraisemblablement inférieur au seuil d'effet toxique.

- Lorsqu'ils ont été testés à différentes concentrations allant au-delà de la saturation (particules), les HAP's se ont révélés toxiques pour le copépode.
- Les résultats des HAP's testés en solvants sont donnés tableau 5 et dans les annexes 6.4 et 6.6.

HAP	Phénanthrène	Benzo(k) fluoranthène	Fluoranthène
½ vie	2,5 à 2625 j	> 100 j	21 h à 200 h en eau
Solubilité en eau douce	1 002	1,5	206
CL50 Mysid* et <i>A. salina</i> *			40
CL50 <i>Neanthes arenaceodentata</i> *	600		
CE 50 <i>C. gigas</i> (Géffard, 2001)	590		
CE50 <i>P. lividus</i> (Géffard, 2001)	450		
CE50 <i>P. phosphoreum</i> *	72,6		
<i>Daphnia magna</i> (Verrhiest <i>et al.</i> , 2001)	854 – 731	> 1	> 180
CL50 - 48 h nominale			
<i>T. brevicornis</i>	62,3	27,6	54,8
UT	1,6	3,6	1,8
CE50 – 24 h nominales			
<i>C. gigas</i>	766,5	2765	66,2
CE50 – 24 h " calculée "			
<i>C. gigas</i>	301,2	127,2	34,8
UT	0,3	0,8	2,9

Tableau 5 : Toxicité comparée des trois hydrocarbures vis-à-vis des deux espèces test marines (CE et CL50 exprimées en µg/L ; UT = (1/CE50)*100 ; * cf. annexes 2)

Notons que pour le benzo(k)fluoranthène, les effets toxiques observés sont supérieurs à la valeur d'hydrosolubilité : 27,6 µg/L pour *T. brevicornis* et 127 µg/L pour *C. gigas* (valeur extrapolée : aucun effet observé à la concentration maximale de 1 mg/L); l'emploi du solvant entraînant une biodisponibilité plus grande de cet hydrocarbure très peu hydrosoluble (1,5 µg/L) ; aucune donnée bibliographique n'a été trouvée en dehors des résultats obtenus sur *D. magna* par nos partenaires (CE50 > 1 µg/L ; Verrhiest *et al.*, 2001) . Alors que les effets observés pour le copépode et l'huître (54,8 et 34,8 µg/L) pour le fluoranthène sont à rapprocher des valeurs trouvées dans la bibliographie et nos partenaires (annexes 2). La toxicité du Phénanthrène pour *C. gigas* est similaire à celle de du polychète *N. arenaceodentata* et très proche des CE50 de Géffard (2001), alors qu'il est beaucoup plus toxique (10 fois en concentration nominale) vis-à-vis du copépode *T. brevicornis* (62,3 µg/L).

La comparaison des UT (Unités Toxiques) montre bien que le développement embryonnaire de *C. gigas* est beaucoup plus sensible que le copépode vis-à-vis du fluoranthène (2,9 contre 1,8).

3.2.1.2. Toxicité des hydrocarbures testés en mélanges

Le calcul des concentrations, à partir du dosage réalisé sur un mélange ternaire permet d'évaluer les taux de perte pour chaque HAP : ils sont très variables allant jusqu'à 95,4 % pour le benzo(k)fluoranthène, perte peut être expliquée par sa faible solubilité et une adsorption par les parois des pots en polystyrène cristal ainsi que par une photodégradation (annexes 2).

HAP	% de chacun	CE50 nominales	concentrations nominales	% pertes	CE50 calculées	UT pour les concentrations aux CE50	ΣUT calculées
P seul	100	766,5	766,5		301,2	0,3	
Bk seul	100	> 1 000	2765		127,2	0,8	
F seul	100	66,2	66,2		34,8	2,9	
P	25,44		93,77	60,7	36,9		
+ Bk	21,93	368,6	80,83	95,4	3,7	0,7	1,3
+ F	52,63		193,99	47,4	102,1		
P	50	> 1000	> 500		> 196,5	0,5	0,6
+ Bk	50		> 500		> 23		
F	50	810	405		213	0,4	1,9
+ Bk	50		405		18,6		
F	50	685	342,5		180,2	0,3	1,6
+ P	50		342,5		134,6		
P	33,33		293,33		115,3		
+ Bk	33,33	880	293,33		13,5	0,4	1,3
+ F	33,33		293,33		154,3		

Tableau 6 : CE50 nominales et concentrations de chaque HAP pour la valeur de la CE50, exprimées en valeurs " nominales " et " effectives " en µg/L (P : phénanthrène, Bk : benzo(k)fluoranthène, F : fluoranthène).
 $UT = (1/CE50) * 100$; ex : $\Sigma UT_{P+F} = (UT_P + UT_F)/2$;

Les résultats (tableau 6) montrent qu'aux CE50 des mélanges F+B et F+P, c'est la toxicité du fluoranthène qui domine : il est présent en concentrations cinq à six fois supérieures à sa CE50 nominale (66,2 µg/L). Le benzo(k)fluoranthène et le phénanthrène jouent donc un rôle antagoniste.

Pour le mélange ternaire, la CE50 (880 µg/L) est peu différente de celle du mélange F+B. Là encore c'est la toxicité du fluoranthène qui domine tout en étant masquée en partie par les deux autres HAP. Pour le mélange P+Bk, les concentrations sont très inférieures à celles induisant la CE50 individuelle des trois HAP.

Dans les deux mélanges binaires contenant du fluoranthène, les concentrations sont largement supérieures à sa CE50 individuelle (34,8 µg/L). Mais les deux autres HAP's jouent un rôle. Le mélange F+P contient moins de fluoranthène que le mélange F+Bk, mais il est plus toxique, avec une concentration en phénanthrène

(134,6 µg/L) à peine plus de deux fois inférieure à sa CE50 individuelle (301,2 µg/L)

Dans le mélange F+Bk, la concentration en benzo(k)fluoranthène (18,6 µg/L) est près de sept fois inférieure à sa CE50 individuelle (127,2 µg/L), il est donc présent en faible quantité. Mais cette concentration suffit pour jouer un fort antagonisme.

La CE50 de la combinaison ternaire P+Bk+F est de 880 µg/L, alors que les concentrations calculées en fluoranthène et phénanthrène sont très proches de celles du mélange F+P dont la CE50 nominale est de 685 µg/L. Ici encore nous pouvons conclure que le benzo(k)fluoranthène à 13,5 µg/joue un rôle antagoniste. Ce qui est confirmé par la comparaison des valeurs des UT.

3.2.2. Demande biochimique en oxygène (DBO) des sédiments référence en présence de HAP (LPEM) :

Les expérimentations de la seconde année (cf. rapport 2000), montrent (annexe 6.7, figure 6) que :

- la présence des HAP's n'est pas toxique pour les bactéries
- mais qu'il existe des différences importantes dans le comportement des bactéries dans les deux sédiments (Blancs Sablons et sédiment artificiel), qui diffèrent physiquement et chimiquement, d'où la difficulté de comparer les résultats obtenus.

3.2.3. Toxicité potentielle des sédiments naturels

Afin de sélectionner un ou plusieurs sédiments référence naturels ; quatre types de sédiments ont testés : un sable propre celui des "Blancs Sablons" (BS), un sable vaseux de l'Aber Benoît "Prat ar Coum" (PAC), deux vases sableuses "Argenton" (ARG) et "Moulin Blanc" (MB), plus un sable coquillier de la Pointe Saint-Mathieu (PSM).

La figure 2 et l'annexe 6.5. montrent que les sédiments BS et PSM sont susceptibles d'être employés comme sédiments naturels référence pour l'huître et le copépe ; leur très faible toxicité est d'ailleurs corrélée aux très faibles niveaux de contaminants détectés (tableau 1). C'est donc le sédiment BS qui a été retenu pour le milieu marin comme sédiment référence naturel.

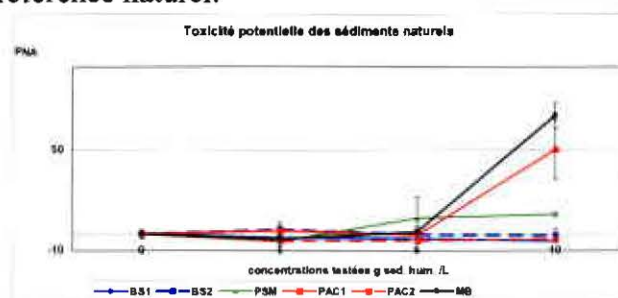


Figure 2 : Toxicité potentielle des sédiments naturels vis-à-vis de *C. gigas* (BS : Blancs Sablons, PSM : Pointe Saint-Mathieu, PAC : Prat ar Coum, MB : Moulin Blanc.)

Notons que les toxicités observées pour les sédiments de Prat ar Coum 1 (PAC1) et du Moulin Blanc (MB) sont corrélées à la présence d'une contamination en PCB's (52 et 59 mg/kg), métaux et qu'au Moulin Blanc les trois HAP's sont présents (tableau 1). De plus ces deux sédiments présentent des taux de carbone organique total de 1,3 % pour PAC1 et 5,9 % pour MB. Cependant, selon la période de prélèvement (printemps pour PAC 1 et été pour PAC 2), le même sédiment peut ne pas présenter de toxicité plus forte que celle des sédiments des Blancs Sablons.

3.2.4. Toxicité des HAP's dans les sédiments naturels et artificiel

Les sédiments, d'une manière générale, ont longtemps été considérés comme des pièges à contaminants et des techniques dits de recouvrement (superposition d'un sédiment contaminé à un sédiment pollué) sont encore utilisées pour limiter leur toxicité (boues de dragage en particulier). Malheureusement les sédiments sont fréquemment remis en suspension et déplacés sous l'effet de l'hydrologie (courants, houle, marées) ou de véritables avalanches lorsque des points d'équilibre physiques sur les pentes sont dépassés. On ne peut non plus négliger le rôle des organismes dans ces déplacements (bioturbation). En mode statique, au laboratoire on pouvait penser que les HAP présents à de fortes concentrations demeuraient "piégés" dans le sédiment testé. En fait l'analyse chimique de l'eau surnageante et des sédiments a montré que la contamination gagnait rapidement l'eau de mer en 48 heures dans les conditions expérimentales décrites.

3.2.4.1. Dopage en un mélange des trois HAP's

Trois des sédiments naturels ont été dopés (annexe 3.1.) avec un même mélange de trois HAP's et leur toxicité évaluée, chez *C. gigas*, à J₀ puis à J4 et J8 jours. Ont été testés l'eau surnageante, le sédiment en contact direct et l'eau interstitielle quand le volume extrait du sédiment était suffisant. Le dopage s'est fait à raison de 58 mg de Phénanthrène plus 120 mg de Fluoranthène plus 50 mg de Benzo(k)fluoranthène par Kilogramme de sédiment sec. Le tableau 7 et l'annexe 5.5 donnent les concentrations des trois hydrocarbures avant dopage et 1, 4 et 8 jours après dopage, dans les sédiments et les eaux surnageantes, ainsi que leur toxicité.

Pour chaque durée de dopage, les sédiments ont été testés à 1, 5 et 10 g de sédiment humide par litre d'eau de mer référence.

HAP µg/g	Durée en jours	C1	BS	PSM	PAC
% humidité		0	21	25	40
	0	< 0,01	< 0,01	< 0,01	0,09
Phénanthrène	1	0,37	1,32	0,47	6,92
58	4	0,75	1,03	0,38	4,88
	8	0,26	1,01	0,62	11,59
	0	< 0,01	< 0,01	< 0,01	0,12
Fluoranthène	1	2,41	5,21	1,95	16,65
120	4	7,07	4,73	2,40	15,66
	8	2,2	3,69	3,82	40,07
	0	< 0,01	< 0,01	< 0,01	0,11
Benzo(k)fluoranthène	1	1,41	15,37	4,69	9,91
50	4	3,63	8,02	10,06	8,17
	8	1,76	14,03	16,34	19,22

Tableau 7 : Concentrations des trois HAP's dans le mélange et dans les sédiments testés 1, 4 et 8 jours après dopage .

C1 : sed. Artificiel, BS : Blancs Sablons, PSM ; Pointe St Mathieu, PAC : Prat ar Coum.

Les effets toxiques des sédiments dopés (figure 3) montrent que :

- la matrice artificielle ne présente qu'une faible toxicité (maximum < 20 % d'anomalie) qui croît légèrement avec les concentrations testées. Ce qui correspond aux très faibles concentrations de HAP's (tableau 7 et annexe 6.5.)
- Le sédiment des Blancs Sablons ne présente aucun effet toxique jusqu'au quatrième jour d'incubation (à 21 °C). Seul le test à 10 g/L à J₈ provoque un fort effet toxique (57 % de larves anormales), alors que seul le benzo(k)fluoranthène, le moins toxique des trois HAP's, est principalement fixé au sédiment testé.
- Le sédiment coquillier de la Pte St Mathieu, lui montre une légère toxicité dès 5 g/L à J₃. Comme pour les Blancs Sablons, seul le benzo(k)fluoranthène est fixé au sable coquillier. Notons cependant que les concentrations de fluoranthène mesurées sont plus importantes dans ce sédiment et celui des Blancs Sablons que dans la matrice.
- Le sédiment de Prat ar Coum, 1,3 % de COT, a fixé les trois hydrocarbures en concentrations variées (tableau 7), mais ne présente aucune toxicité (figure 3).

Tout se passe comme si la matière organique du sédiment naturel de Prat ar Coum avait adsorbé les hydrocarbures réduisant leur biodisponibilité, alors que des

concentrations bien inférieures dans les autres sédiments (tableau 7) seraient totalement biodisponibles et aptes à entraîner un effet toxique plus élevé.

Par ailleurs, les échanges se font entre les sédiments et les eaux surnageantes dont les teneurs en HAP's sont très importantes particulièrement un jour après le dopage. De plus, on voit les concentrations diminuer dans l'eau surnageante de PAC au huitième jours lorsqu'elles augmentent dans le sédiments (annexe 6.4.).

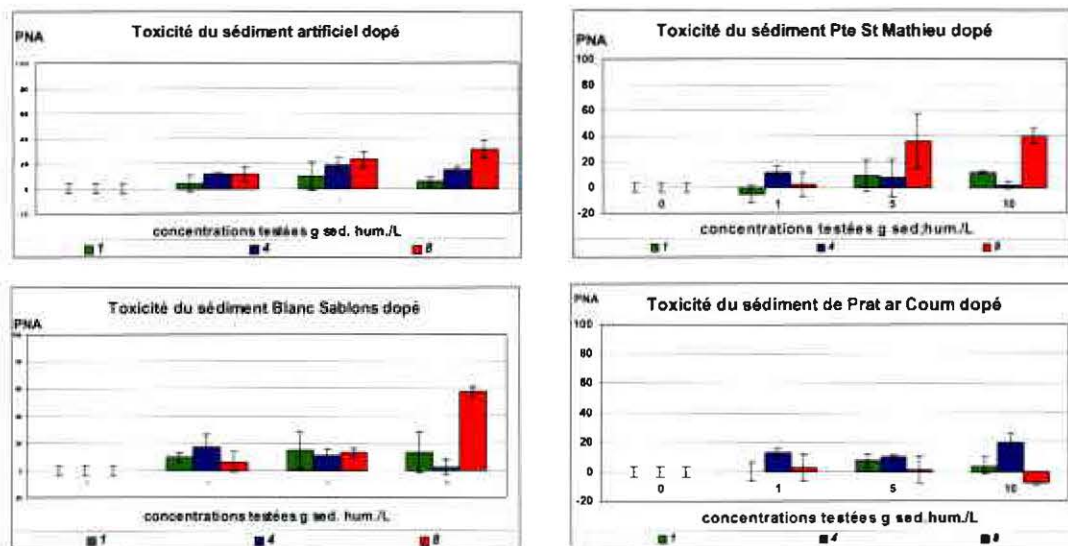


Figure 3 : Evolution de la toxicité des sédiments naturels et artificiel, 1 à 8 jours après leur dopage et leur incubation à 21 °C à l'abri de la lumière.

3.2.4.2. Toxicité de chacun des trois HAP's dans les sédiments de référence, artificiel C1 et naturel Blancs Sablons

Les résultats obtenus, pour le copépode *T. brevicornis*, dans les deux sédiments artificiel et naturel sont résumés dans l'annexe 6.6 :

Fluoranthène : les différences entre les deux sédiments artificiel et naturel ne sont pas significatives. Il faut une concentration de fluoranthène dans le sédiment (artificiel ou naturel) égale à dix fois la concentration de HAP dans l'eau de mer, pour obtenir une mortalité des copépodes équivalente à la $CL50_{96\text{heures}}$. Soit environ 548 $\mu\text{g}/\text{kg}$ de sédiment.

Benzo-k-fluoranthène : des différences significatives apparaissent entre les deux sédiments pour les concentrations élevées, supérieures à 5 fois la valeur correspondant à la $CL50_{96\text{heures}}$ pour le copépode dans l'eau de mer sans sédiment. L'effet correspondant à la $CL50_{96\text{h}}$ dans l'eau de mer naturelle est obtenu pour une concentration de Benzo-k-fluoranthène égale à 25 fois cette valeur soit environ 690 $\mu\text{g}/\text{kg}$. Dans le milieu artificiel quelque soit la concentration le taux de mortalité demeure inférieur à 10 %.

Phénanthrène : comme pour le benzo-k-fluoranthène des différences significatives apparaissent entre les deux sédiments pour les fortes concentrations. La concentration de phénanthrène dans les sédiments ayant un effet correspondant à la CL50_{96h}, n'a pas été observée dans la gamme de concentrations testées. Elle est supérieure à 25 fois la valeur de CL50_{96h} soit 1557 µg/kg

HAP	Eau de mer	Sed. art.	Sed.nat
Fluoranthène	54,8	548	548
Benzo(k)fluoranthène.	27,6	> 690	690
Phénanthrène	62,3	> 1557	1557

Tableau 8 : Concentrations des HAP's en µg/kg dans les sédiments pour obtenir les CL50 en eau de mer pour le copépode *T. brevicornis* exposé au sédiment

Les résultats obtenus ont montré une biodisponibilité faible des HAP, dans les sédiments, pour le copépode, par rapport à la pleine eau. Des différences de sensibilité existent cependant entre sédiment naturel et sédiment artificiel, ce qui était prévisible. Les différences de nature des sédiments de référence ont une forte répercussion sur la biodisponibilité des HAP pour l'organisme test.

3.2.5. Toxicité des HAP's introduits dans les sédiments en présence de concentrations variables de matière organique (tétramin)

La matière organique inerte, qu'elle soit particulaire ou dissoute, présente en suspension dans le milieu (eau de mer, particules sédimentaires) interagit avec les contaminants. Que ce soit des métaux ou des molécules organiques xénobiotiques ou dérivées de produits naturels, les contaminants peuvent être absorbés ou adsorbés sur les particules, ou former des complexes organo-métalliques, par exemple, ou encore des macromolécules (substances jaunes : "gelbstoff") qui peuvent entraîner des modifications importantes de la qualité des milieux : augmentation de la toxicité ou au contraire détoxification pour les organismes vivants.

Dans la nature les effets des contaminants observés lors des expositions sont globaux. D'un point de vue expérimental, pour pouvoir relier des effets observés *in situ* à des effets *in vivo* il est nécessaire d'étudier les comportements des mélanges en présence de matière organique dont les caractéristiques sont bien définies. L'analyse des effets conjugués des substances est donc un problème fondamental en écotoxicologie.

Les théories, sur l'action des mélanges ont été référencées par Forget (1998) dans sa thèse. On trouvera en annexe un bref résumé de ces théories. Les effets observés sont dits :

- "additifs" lorsque les effets du mélange sont l'addition des effets individuels,

- “synergiques” lorsque les effets du mélange sont supérieurs à la simple addition des effets de chacune des substances impliquées,
- “antagonistes” lorsque les effets du mélange sont inférieurs à l’addition de chacun des composés pris séparément.

3.2.5.1. Variation du taux de mortalité du copépode *Tigriopus brevicornis*, exposé aux différents HAP's, testés individuellement ou en mélanges binaire et ternaire et en présence de MO en quantité variable.

Les résultats sont opposables à des témoins contenant des HAP mais ne contenant pas de complément de MO ajoutée (0 Tetramin) et à des témoins naturels ne contenant pas de HAP ajouté mais du sédiment aux concentrations de 0 % ; 0,15 ; 0,015 et 0,0015 % de tétramin.

Les concentrations testées étaient : fluoranthène : 5,48 mg/kg, benzo(k) fluoranthène : 2,76 mg/kg, phénanthrène 24,92 mg/kg. Soit des quantités de Tetramin pour 15 g de sédiment de 22,5 mg, 2,250 mg et 0,225 mg.

La figure 4 et le tableau 9 présentent les résultats obtenus :

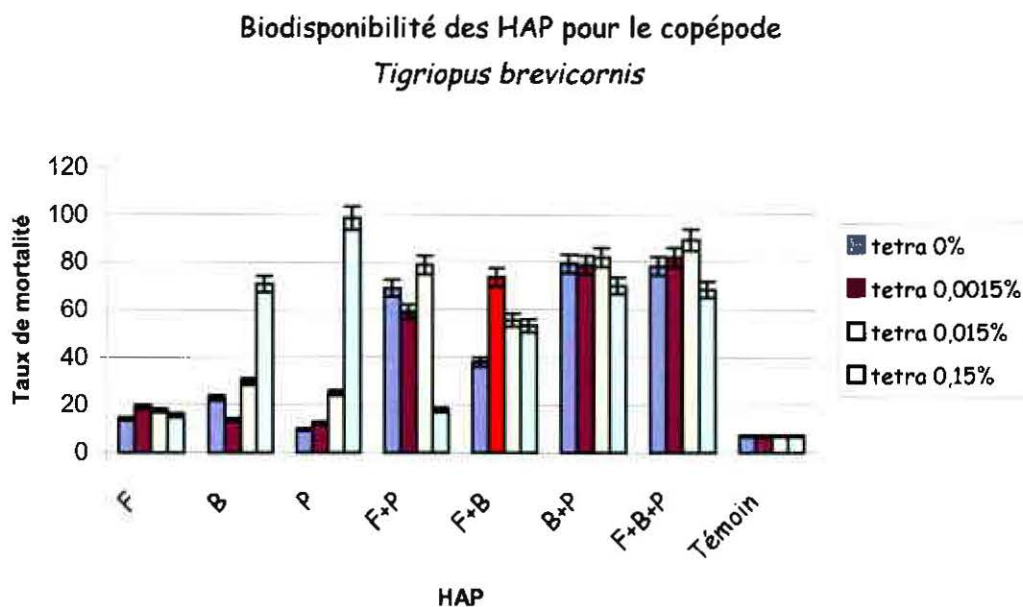


Figure 4 : Biodisponibilité des HAP en présence de matière organique (Tetramin) à différentes concentrations

HAP	0 % tétramín	0,0015 % tétramín	0,015 % tétramín	0,15 % tétramín
Fluoranthène	18	20	19	18
Benzo(k)F.	22	17	30	71
Phénanthrène	10	16	23	99
F+B (F+B)	39 additif (40)	75 synergique (37)	58 synergique (49)	56 antagoniste (89)
F+P (F+P)	70 synergique (28)	60 synergique (36)	80 synergique (42)	19 antagoniste (117)
B+P (B+P)	80 synergique (32)	80 synergique (36)	82 synergique (42)	70 antagoniste (170)
F+B+P (F+B+P)	80 synergique (50)	82 synergique (53)	90 synergique (72)	69 antagoniste (188)
0	7			

Tableau 9 : Effet des mélanges de HAP, en présence de matière organique (Tetramin en % par rapport au sédiment) à des concentrations variables, sur le taux de mortalité du copépode *Tigriopus brevicornis*. Les valeurs entre parenthèses correspondent à l'addition des taux individuels des effets d'exposition. Les effets additif, antagoniste, synergique sont donnés par comparaison avec les taux de mortalité des mélanges binaires et ternaire.

Les effets synergiques (supérieurs à l'addition des effets individuels) l'emportent d'une manière générale en l'absence ou en présence de Tetramin pour les concentrations de 0,0015 et 0,015 %. A 0,15 % des effets antagonistes (inférieurs à l'addition des effets individuels) s'observent. Soit la matière organique a atteint un seuil de concentration lui permettant de neutraliser une partie de la toxicité des 3 HAP, soit il s'agit d'un effet bactérien : développement important des bactéries sur le substrat organique et attaque des HAP.

Lors d'essais du sédiment artificiel on a pu observer que pour le milieu artificiel un taux de 0,15 % de tétramín était un maximum pour empêcher une explosion bactérienne dans l'eau et une eutrophisation rapide.

HAP	0 % tétramin	0,0015 % tétramin	0,015 % tétramin	0,15 % tétramin
Fluoranthène	18	20	19	18
Benzo(k)F.	22	17	30	71
Phénanthrène	10	16	23	99
F+B (F+B)	39 additif (40)	75 synergique (37)	58 synergique (49)	56 antagoniste (89)
F+P (F+P)	70 synergique (28)	60 synergique (36)	80 synergique (42)	19 antagoniste (117)
B+P (B+P)	80 synergique (32)	80 synergique (36)	82 synergique (42)	70 antagoniste (170)
F+B+P (F+B+P)	80 synergique (50)	82 synergique (53)	90 synergique (72)	69 antagoniste (188)
0	7			

Tableau 9 : Effet des mélanges de HAP, en présence de matière organique (Tétramin en % par rapport au sédiment) à des concentrations variables, sur le taux de mortalité du copépode *Tigriopus brevicornis*. Les valeurs entre parenthèses correspondent à l'addition des taux individuels des effets d'exposition. Les effets additif, antagoniste, synergique sont donnés par comparaison avec les taux de mortalité des mélanges binaires et ternaire.

Les effets synergiques (supérieurs à l'addition des effets individuels) l'emportent d'une manière générale en l'absence ou en présence de Tétramin pour les concentrations de 0,0015 et 0,015 %. A 0,15 % des effets antagonistes (inférieurs à l'addition des effets individuels) s'observent. Soit la matière organique a atteint un seuil de concentration lui permettant de neutraliser une partie de la toxicité des 3 HAP, soit il s'agit d'un effet bactérien : développement important des bactéries sur le substrat organique et attaque des HAP.

Lors d'essais du sédiment artificiel on a pu observer que pour le milieu artificiel un taux de 0,15 % de tétramin était un maximum pour empêcher une explosion bactérienne dans l'eau et une eutrophisation rapide.

3.2.5.2. Effet de l'enrichissement en MO (tétramin) sur la toxicité du sédiment naturel (BS) dopé en phénanthrène – comparaison des effets d'exposition sur les deux espèces test marines

Le rôle de la matière organique sur la biodisponibilité du phénanthrène a été recherché en dopant le sédiment des Blancs Sablons avec 60 mg/kg de sédiment sec et en faisant varier le COT par ajout de Tétramin à raison de 0,15 ; 0,015 et 0,0015 % comme décrit dans l'annexe 3.2.

- **effets sur *T. brevicornis***

A la concentration testée (60mg./kg en poids sec), le phénanthrène est toxique de manière aiguë : aucun survivant n'est observé parmi les copépodes au bout de 96 heures. L'addition de matière organique (tétramin) à 0,15 % a une influence faible (diminue la toxicité) sur la qualité du sédiment brut non dopé au phénanthrène pour le copépode.

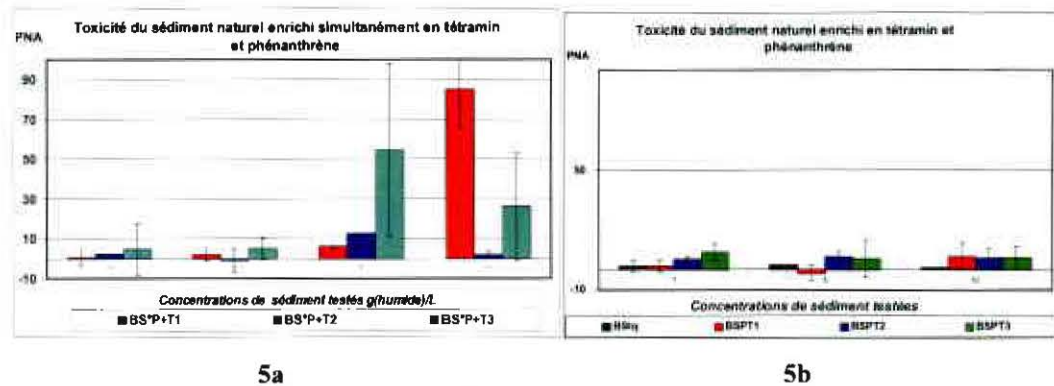
Cette influence a été confirmée par les mesures de DBO pour le tétramin à 0,15 % dans 200 g de sédiment dopé au phénanthrène qui indiquent un développement bactérien important alors qu'il est nul dans les sédiments témoins sans tétramin (annexe 6.8.).

- **effets sur *C. gigas***

Deux expériences ont été réalisées :

- le sédiment a été dopé avec le phénanthrène puis le tétramin ajouté, comme pour les tests sur *T. brevicornis* (figure 5a)
- le sédiment a été dopé simultanément avec le phénanthrène et le tétramin et testé dans les mêmes conditions que le précédent (figure 5b)
- pour vérification, le sédiment BS a aussi été roulé sans être dopé.

Les résultats ne montrent pas une modification de la biodisponibilité du phénanthrène en fonction de la quantité de tétramin ajouté au sédiment. Après dopage, le sédiment est resté 12 heures au repos avant siphonnage de l'eau surnageante et il est plus que probable que le phénanthrène dont la solubilité est assez élevée (1 à 1,6 mg/L dans l'eau douce) soit passé en phase aqueuse et que les quantités effectivement fixées au sédiment soient très faibles ; la toxicité a toutes les chances d'être liée au tétramin lui même lorsqu'il a été ajouté après le siphonnage de l'eau surnageante, alors que lorsqu'il est ajouté au moment du roulage aucun effet significatif n'est observé quelque soit la quantité de tétramin ajouté (figure 5b). Un dopage sans eau et une concentration plus élevée de phénanthrène auraient sans doute permis de mieux voir le rôle de la matière organique dans la biodisponibilité de l'hydrocarbure.



Figures 5 : 5a Toxicité du sédiment BS dopé en phénanthrène puis tétramin ;
 5b Toxicité du sédiment BS simultanément dopé en phénanthrène et tétramin (T1 = 0,15 % ; T2 = 0,015 % ; T3 = 0,0015 % de tétramin g/g de sédiment sec).

La comparaison des effets sur les deux organismes tests est difficile car le rapport d'exposition entre les deux méthodes est de 1 à 50. En effet si l'on expose les copépodes à 15 g de sédiment contaminé, ces derniers sont exposés, en mode calme, en présence de 20 ml d'eau de mer ; alors que pour le développement embryolaire des huîtres, les 15 g de sédiment sont dilués dans un litre d'eau de mer : soit une concentration en sédiment 50 fois plus faible. Ce qui peut expliquer la différence des effets observés : toxicité forte pour le copépode et difficulté de trouver l'élément responsable des effets pour l'huître.

4. Discussion et conclusion

4.1. Aspects méthodologiques

4.1.1. Les sédiments référence

- Les études d'écotoxicologie ou de toxicité des sédiments ne peuvent se développer que par comparaison avec des sédiments de référence naturels ou artificiels dont les paramètres physico-chimiques sont connus et/ou bien maîtrisés. Compte tenu du nombre de variables (paramètres) dans le milieu naturel et de la diversité des sédiments il est impossible de faire le choix d'un standard à caractère universel. Les sédiments de référence naturels utilisés ne peuvent donc être que des sédiments de circonstance. Le sédiment des Blancs Sablons retenu correspond à un sable à faible teneur en COT mais ne peut être représentatif des faciès calcaire ni vaseux. ; il a cependant le très gros avantage d'être compatible avec les deux espèces test.
- Quant à l'emploi d'un sédiment artificiel, aux constituants connus et paramétrés, s'il apparaît comme un modèle utile simple pour l'étude de la toxicité des contaminants et permet de s'affranchir des contraintes de prélèvement dans le milieu naturel, du transport et de la conservation pour le maintien de ses caractéristiques au moment du prélèvement *in situ*. Certaines difficultés sont apparues dans l'emploi de ce sédiment en eau de mer. En particulier les particules fines qui, demeurant en suspension, donnaient un milieu encore trouble au bout de 24 heures. De plus, l'ajout de tétramin, comme matière organique a posé la question de sa toxicité intrinsèque, en particulier vis-à-vis du développement embryonnaire de l'huître.
- L'emploi d'une matrice artificielle du type testé, n'est pas utilisable pour le bio essai employé car provoquant des effets toxiques non négligeables avant tout apport de contaminant.

4.1.2. La méthode de dopage

L'un des critères les plus importants, régissant l'emploi d'un contaminant chimique dans la préparation d'un sédiment dopé, c'est que les propriétés chimiques de ce produit permettent un mélange homogène avec le substrat. Il existe peu de données sur l'utilisation des contaminants organiques dans les essais de toxicité sur sédiment dopé ; pour les HAP, on peut citer le cas du fluoranthène. Dittsworth *et al.* (1990) ont signalé que le fait de mélanger le fluoranthène dans un bocal de sédiment entraînait un coefficient de variation de 11,5 % pour l'ensemble des points d'échantillonnage dans le bocal et que l'emplacement de ces points n'avait pas d'effet significatif. L'homogénéité des mélanges sédiment - HAP (pyrène, phénanthrène, benzo-pyrène) par la méthode de mise en suspension donnant des

coefficients de variation allant de 4,7 % à 9,3 % (Landrum *et al.*, 1991 ; Landrum, 1994).

Doper un sédiment avec un contaminant revient donc à mélanger ce contaminant de façon aussi homogène que possible avec le sédiment. La technique de dopage est certainement la phase la plus délicate de la préparation du sédiment pour les tests d'écotoxicité, car elle touche à la fois l'homogénéité du sédiment dopé et la conservation de son intégrité physique.

Le choix d'un appareil ou de la méthode technique de dopage dépend :

- des caractéristiques physico-chimiques du sédiment et de son état (humide ou sec) de la granulométrie et de sa résistance mécanique (un sable calcaire sera plus fragile qu'un sable siliceux). Ainsi une méthode adaptée à un sédiment peut se révéler totalement inadaptée pour un autre.
- du volume traité : s'il s'agit de plusieurs dizaines de kilogrammes on passera carrément d'un appareil mélangeur de laboratoire à la toupie d'une bétonneuse pour petit chantier.

Aucune des méthodes proposées n'est satisfaisante. Des systèmes de type industriel pour le mélange des poudres pourraient être adaptés, mais ils sont utilisés en général pour de grands volumes de poudres. Or, pour nos expériences, seules de petites quantités de sédiment étaient nécessaires, moins de 100 g pour chaque test.

On a donc préféré utiliser le sédiment à l'état humide et un robot rotatif du commerce comme homogénéisateur. Ce robot qui peut atteindre une vitesse de 5000t/minute entraîne un mélange rapide en quelques minutes. Les résultats des séries de tests biologiques comme ceux de l'analyse chimique ont montré une bonne homogénéité du mélange sédiment naturel humide + poudre de HAP .

4.1.3. Les rendements des dopages (annexe 5.1)

Les coûts financiers des analyses n'ont pas permis d'effectuer de grandes séries de mesures. Celles-ci ont concernées essentiellement le phénanthrène et le fluoranthène.

Les flux de HAP du sédiment dopé (artificiel ou naturel) dans l'eau surnageante n'expliquent pas la diminution concomitante dans le sédiment brut et l'eau interstitielle. La disparition du HAP du milieu test peut avoir plusieurs origines : la libération dans l'atmosphère du fait du caractère volatil du HAP, la fixation sur les particules en suspension dans l'eau surnageante et la dégradation par les bactéries du HAP.

Le comportement des deux HAP en présence de sédiment artificiel n'est pas le même le flux est plus rapide pour le fluoranthène. Sans doute en relation avec leur coefficient de dissolution respectifs.

4.1.4. La prématuration des sédiments

Les résultats obtenus montrent qu'après ajout de MO, la pré-maturation des sédiments naturels ou artificiels sous forme humide ou sous eau voit se développer un film bactérien incompatible avec l'emploi des sédiments comme référence : cette phase de pré-maturation à 21 C, avant dopage en HAP's a donc été éliminée pour les essais en milieu marin (Quiniou *et al.*, 2000).

4.1.5. L'extraction de l'eau interstitielle

L'étude préliminaire au projet a permis de montrer que la toxicité de l'eau interstitielle est dépendante des modalités de centrifugation. Carignan *et al.* (1985) ont montré que cette différence est due à la présence dans l'eau interstitielle d'une plus grande quantité de cuivre et zinc sous forme ionique lors d'une extraction à 5 000 g qu'à 10 000 g ; Ankley et Schubauer (1994) ont eux aussi montré que les concentrations en cuivre, plomb et zinc étaient supérieures à 2 500 g qu'à 10 000 g. C'est pourquoi, le choix d'une extraction de l'eau interstitielle à 5 000 g pendant 10 mn a été retenue durée et vitesse optimales pour récolter un volume d'eau interstitielle suffisant pour les tests et n'ayant pas perdu ses composés par une centrifugation à plus haute vitesse. (Publication 1 en fin de rédaction).

4.2. Toxicité des HAP's en phase aqueuse

Les effets des HAP's en phase aqueuse ont permis de déterminer des CE50 pour chaque hydrocarbure testé individuellement, cependant seules des analyses chimiques sur chaque milieu testé permettraient d'avoir des valeurs précises. Les HAP's testés en mélanges binaires et ternaires montrent que c'est bien le fluoranthène le plus toxique, mais qu'en présence de benzo(k)fluoranthène sa toxicité est diminuée, ce dernier jouant un rôle d'antagonisme vis-à-vis du fluoranthène. (Publication 2, en cours de rédaction).

4.3. Toxicité des sédiments dopés par des mélanges de HAP's

Les effets synergiques l'emportent d'une manière générale en l'absence ou en présence de Tetramin pour les concentrations de 0,0015 et 0,015 %. A 0,15 % des effets antagonistes s'observent. Soit la matière organique a atteint un seuil de concentration lui permettant de neutraliser une partie de la toxicité des trois HAP's, soit il s'agit d'un effet bactérien : développement important des bactéries sur le substrat organique et attaque des HAP.

4.4. Influence de la matière organique sur la toxicité des HAP's

4.4.1. Effet sur les copépodes

Les résultats obtenus ont montré une biodisponibilité faible des HAP, dans les sédiments, pour le copépode, par rapport à la pleine eau. Des différences de

sensibilité existent cependant entre sédiment naturel et sédiment artificiel. Les différences de nature des sédiments de référence ont une forte répercussion sur la biodisponibilité des HAP pour l'organisme test.

A la concentration testée (60 mg /kg en poids sec), le phénanthrène est toxique de manière aiguë : aucun survivant n'est observé parmi les copépodes au bout de 96 heures. L'addition de matière organique (tétramin) à 0,15 % a une influence faible (diminue la toxicité) sur la qualité du sédiment brut non dopé au phénanthrène pour le copépode.

4.4.2. Effets sur les embryons d'huître

Pour les bivalves, quand les sédiments naturels et artificiel sont dopés par un mélange ternaire de HAP's, tout se passe comme si la matière organique (COT 1,3 %) du sédiment naturel de Prat ar Coum avait adsorbé les hydrocarbures réduisant leur biodisponibilité, alors que des concentrations bien inférieures dans les autres sédiments seraient totalement biodisponibles et aptes à entraîner un effet toxique plus élevé. La MO du sédiment artificiel ayant elle beaucoup moins fixé les HAP's malgré sa teneur en COT (2 %). Ce n'est donc pas la MO elle même qui provoque la toxicité, comme indiqué par Géffard (2001), mais vraisemblablement le développement bactérien qui après huit jours d'incubation est plus important ou n'a plus aucun support de MO dans les sédiments naturels pauvres en COT et peut agir directement sur les embryons d'huîtres. Les concentrations en HAP's étant quant à elles très faibles par rapport aux concentrations entraînant les CE50 en phase aqueuse.

Par ailleurs, les échanges continuent à se faire entre les sédiments et les eaux surnageantes dont les teneurs en HAP's sont très importantes. Particulièrement le premier jour après le dopage. Et l'on voit très bien, pour le sédiment naturel PAC (COT = 1,3 %), les concentrations diminuer dans l'eau surnageante et augmenter dans le sédiment.

Pour les deux espèces tests, cette influence des bactéries sur la toxicité a été confirmée par les mesures de DBO pour le tétramin à 0,15 % dans 200 g de sédiment dopé au phénanthrène qui indiquent un développement bactérien important alors qu'il est nul dans les sédiments témoins sans tétramin

4.5. Comparaison de la sensibilité des deux espèces test

Le rôle de la matière organique sur la biodisponibilité du phénanthrène n'a pas pu être démontré en raison du transfert de l'hydrocarbure dans la phase aqueuse lors du dopage en eau et rouleur, c'est le tétramin lui même qui semble le principal responsable de la toxicité observée lorsqu'il est ajouté à posteriori. (Publication 4 à rédiger).

4.5.1. En phase aqueuse

Les deux espèces testées présentent des sensibilités différentes vis-à-vis des trois HAP's :

- la réponse du copépode se fait pour des concentrations 4 à 5 fois plus faibles que le bivalve en présence de Phénanthrène (62,3 contre 301,2 µg/L) et Benzo(k)fluoranthène (27,6 contre 127,2 µg/L).
- alors que le bivalve est plus sensible en présence de fluoranthène (34,8 contre 54,6 µg/L)
- Mais un certain nombre de facteurs peut être responsable de cette différence:
- l'effet observé pour le copépode est une létalité alors que pour le bivalve c'est un taux de développement anormale qui est le point final.
- la durée d'exposition est de 24h pour le bivalve et 96 heures pour le copépode
- enfin, les essais se déroulent à l'obscurité pour l'huître et partiellement pour le copépode (selon un cycle de 12h/12h)., L'effet observé pouvant dans ce cas être augmenté par la photoactivation des hydrocarbures.

4.5.2. Lors des tests sur sédiments

La comparaison des effets sur les deux organismes tests est difficile car le rapport d'exposition entre les deux méthodes est de 1 à 50. En effet les copépodes sont placés dans 20 ml d'eau de mer et exposés à 15 g de sédiment contaminé, en mode calme. ; alors que pour le développement embryo-larvaire des huîtres, les 15 g de sédiment sont dilués dans un litre d'eau de mer : soit une concentration en sédiment de 50 fois moins. Ce qui peut expliquer la différence des effets observés. Par ailleurs il est également possible que le copépode qui se nourrit de particules ingère des particules de HAP présentes dans le sédiment.

4.6. Conclusions et perspectives

4.6.1. Aspects méthodologiques

- D'une manière générale, il a été possible de sélectionner un voire deux sédiments de référence naturels (BS et PSM). Cependant les divers essais ont montré une nouvelle fois que se posait les problèmes de transport et stockage de ces derniers. En effet, le prélèvement puis la durée et mode de stockage peuvent modifier la toxicité potentielle des sédiments avant même de les avoir enrichis ou dopés (Quiniou *et al.*, 1997 ; Géffard, 2001).
- La contrainte d'utilisation d'un sédiment de référence artificiel commun aux milieu marin et d'eau douce sans tenir compte de son comportement dans chaque milieu a posé de nombreux problèmes expérimentaux. Car si la composition du sédiment répond aux critères des essais en eau douce, il ne convient que très peu au milieu marin ; en particulier en utilisant du tétramin comme MO ajoutée qui entraîne un développement bactérien incompatible avec les tests.

- Le projet a permis de proposer une technique d'extraction d'eau interstitielle, rapide et fournissant une quantité optimale d'eau aux propriétés toxiques reflétant bien la composition du milieu.
- Le dopage des sédiments selon une technique uniforme pour tous les laboratoires a posé un problème d'équipement après une phase de recherches parfois divergentes selon les équipes : dopage à sec, sous eau, au "mixer" ou roller, avec ou sans solvant. Cependant, les mesures de rendement ont montré que les résultats étaient assez homogènes .
- La prématuration des sédiments, préconisée pour les sédiments d'eau douce, n'est absolument pas une étape à retenir pour le milieu marin. Surtout si cette phase se fait en présence de MO susceptible de favoriser un développement bactérien qui peut interférer sur la toxicité potentielle des sédiments eux mêmes.

4.6.2. Toxicité

- Les essais sur copépode et bivalve ont permis d'établir les valeurs des CE50 pour les trois HAP's pris en considération dans le projet. Ainsi que les effets de leurs mélanges binaires et ternaires : notons que quelque soit le type de mélange, le fluoranthène qui est le plus toxique voit son effet diminuer en présence d'un des deux autres hydrocarbures.
- Lorsque les trois HAP's sont ajoutés aux sédiments de référence, naturel et artificiel, il n'y a pas de grande différence dans les toxicités observées. La biodisponibilité des hydrocarbures est faible par rapport aux effets en pleine eau. Le phénanthrène étant celui qui est proportionnellement le moins disponible dans les sédiments.
- La comparaison inter-espèce du rôle de la MO dans la modification de la toxicité des HAP's n'a pas pu être bien déterminé en raison de l'effet toxique important des bactéries sur les organismes test en particulier. Cependant les tests de mortalité du copépode en présence de HAP considérés individuellement ou en mélange et exposés à des concentrations variables de Tetramin ont montré jusqu'à un certain taux de matière organique, 0,015 % des effets synergiques. Au delà des effets antagonistes apparaissent.
- La présence des bactéries est vérifiée par les analyses de DBO beaucoup plus forte lorsque la quantité de MO ajoutée augmente. Lors des essais de dopage des sédiments naturels, il a été difficile de distinguer les effets des HAP's de celui de la MO, en particulier pour la comparaison des effets de la MO en présence de phénanthrène. Cependant, la présence de MO dans le sédiment naturel de Prat Ar Coum, montre que cette matière organique piège les HAP's qui doivent réduire l'activité bactérienne qui, après 4 à 8 jours d'incubation, entraîne un effet toxique dans les sédiments pauvres en COT qui n'ont pas fixé les hydrocarbures.
- La comparaison des deux espèces test montrent que leur sensibilité peut être due, non seulement à la sensibilité propre de chacune des espèces, associée à leur

mode de vie et à leur stade de développement, mais encore aux conditions expérimentales des essais. En effet, les essais diffèrent par leur durée, les températures d'exposition et l'intensité lumineuse au cours des essais ; mais encore par le type de test létalité pour le copépode (ou anomalie du développement larvaire pour l'huître. Il peut exister une photoactivation du phénanthrène et du benzo(k)fluoranthène dans le cas du copépode, alors que le test bivalve se fait en absence de lumière. De plus, lors des expositions aux sédiments, les copépodes peuvent modifier leur exposition aux HAP's en ingérant la MO qui a piégé les contaminants tandis que les bivalves montrent les effets des sédiments lors du contact prolongé des embryons immobiles pendant les premières heures du développement (Géffard, 2001). Enfin, en raison de modalités expérimentales différentes, les quantités de HAP's auxquels sont exposés les organismes varient de 1 à 50 pour les deux espèces en fonction du rapport volume de sédiment " contaminé " /: volume d'eau des essais.

- D'une manière générale, les possibilités d'analyse chimique ont été très faibles. D'où une majorité d'effets observés en concentrations nominales, ne permettant pas toujours de relier les effets observés à des concentrations effectives. Or, nous avons pu constater qu'en fonction de leurs caractéristiques physico-chimiques, les trois HAP's avaient des réactions différentes et des coefficients de perte très différents ; ce qui gêne beaucoup les interprétations des résultats.

4.6.3. Perspectives

- Si les résultats obtenus montrent la complexité de l'interprétation du rôle de la MO sur la biodisponibilité et les interactions des HAP's en mélanges, les mesures de DBO montrent bien que le développement bactérien, lui est modifié par la présence de la MO et qu'il sera d'autant plus intense quand la durée du stockage des sédiments va augmenter. Il serait très intéressant de réaliser de nouvelles séries expérimentales, où l'on ferait varier l'éclairage, la température, les concentrations de MO et de HAP's en suivant la DBO en plus des effets toxiques, afin de mieux cerner le rôle de chaque paramètre.
- Les résultats obtenus sur les deux espèces test, permet de préconiser leur emploi pour évaluer la toxicité potentielle de sédiments contaminés, dans des objectifs différents : les embryons de bivalves permettent d'évaluer la toxicité des sédiments par contact, alors que les copépodes permettent d'avoir une information non seulement de la toxicité par contact mais encore d'un possible empoisonnement secondaire par ingestion de la MO.

Valorisation des travaux

Thèse

Le Garo C. 2001. Evaluation de la toxicité des sédiments marins : rôle de la matière organique dans la biodisponibilité et la toxicité des sédiments contaminés en hydrocarbures aromatiques polycycliques. Thèse de doctorat en pharmacie, Université de Rennes 1, faculté de pharmacie. 101 p.

Rapports de DEA, DESS et Maîtrise

Dlignon A. 2000. Recherche méthodologique en écotoxicologie marine : influence de la matière organique dans les sédiments marins, sur la réponse de *Tigriopus brevicornis* (copépode, harpacticoïde) à une pollution aux HAP. Maîtrise de Biologie et des Ecosystèmes. USTL. 40 pages.

Duhamel C., 2001. Evaluation de la toxicité de trois hydrocarbures en milieu marin à l'aide du bio-essai bivalve (*Crassostrea gigas*). HAP en solutions et sédiments dopés. Maîtrise de biologie des populations et des écosystèmes, mention environnement, 24 pages.

Le Donge C., 2000. Contribution à la mise au point de méthodes d'évaluation de la toxicité de sédiments à l'aide du bio-essai bivalve (*Crassostrea gigas*). Licence IUP Génie de l'Environnement – Université Sci. F.A. – Metz, 10 pages + annexes.

Le Garo C., 1999. Contribution à la mise au point de méthodes d'évaluation des sédiments contaminés par les hydrocarbures aromatiques polycycliques, en fonction de la teneur en matière organique des sédiments dans le cadre du projet PNETOX. Université de Rennes 1, 6^e année de Pharmacie, 22 pages + annexes

Millet M. 2001. Etude de la toxicité des sédiments marins pollués par les HAP sur le copépode Harpacticoïde : *Tigriopus brevicornis*. Influence de la matière organique. Application au sédiment du Croisic pollué par le fuel de l'Erika. 20 pages

Morel V., 1999. Contribution à la mise au point d'une méthode d'évaluation de la toxicité de sédiments contaminés par des HAP's à l'aide de bio-essais sur le développement embryonnaire de l'huître creuse (*Crassostrea gigas*). DESS de "Biotoxicologie environnementale et industrielle" Univ. Lille II, septembre 1999, 29 p.

Paranthoën K. 1997. Recherches méthodologiques pour l'évaluation de l'écotoxicité des sédiments marins de la rade de Brest. DEA "National d'écotoxicologie" - Univ. R.Descartes UFR Necker, Paris V, juillet 1997, 25 p.

Poster

Garric J., Bodineau L., Clément B., Férard J.F., Lamy M.H., Masfaraud J.F., Montuelle B., Pavillon J.F, Quiniou F., Thybaud E. (1999). Toxicity assessment of freshwater and marine natural or formulated sediments. Application to Polycyclic Aromatic Hydrocarbons. "PNETOX – sediment" program. 17th International Symposium on Polycyclic, Aromatic Compounds, Bordeaux, 25-29 Octobre 1999.

Note et publications en cours de rédaction

- Publication 1 : Proposition d'une méthode d'extraction de l'eau interstitielle des sédiments marins. Quiniou F. et Pavillon J.F. (note technique).
- Publication 2 : Effets létaux et sublétaux de trois HAP's testés seuls ou en mélange sur le copépode *T. brevicornis* et le développement embryonnaire de l'huître creuse. - Pavillon J.F. et Quiniou F.
- Publication 3 : Variabilité de la réponse du développement embryonnaire de l'huître creuse (*C. gigas*) exposée à trois sédiments naturels différents avant et après leur dopage avec trois HAP's. Quiniou F. et Pavillon J.F.
- Publication 4 : Etude comparée des effets d'un sédiment naturel de référence, dopé en phénanthrène et en matière organique, vis-à-vis du développement embryonnaire de l'huître creuse (*C. gigas*) et la survie du copépode *T. brevicornis* ; Quiniou F. et Pavillon J.F.

Bibliographie

- Andersen, P.D., Weber L.J. 1975. The toxicity to aquatic pollutants of mixture of heavy metals. International Proceedings, Heavy Metals in the Environment, Toronto, Ontario, Canada, October, 27-31 : 933-954
- Ashford, J.R., 1958. Quantal responses to mixtures of poisons under conditions of simple similar action. The analysis of uncontrolled data. *Biometrika*, 45 : 74-88.
- ASTM, 1994. Standard guide for conducting static acute toxicity tests starting with embryos of four species of saltwater bivalve molluscs. *Annual book of standards, American Society for Testing and Materials, Philadelphia*, vol 11.05, 223-240.
- Beiras R., His E. 1994. Effects of dissolved mercury on embryogenesis, survival, growth and metamorphosis of *Crassostrea gigas* oyster larvae. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 113, 95-103.
- Bliss, C.I. 1939. The toxicity of poisons applied jointly. *Ann. Appl. Biol.*, 26 : 585-615.
- Brodenius, S.J. 1990. Modelling the joint toxicity of xenobiotics to aquatic organisms : Basic concepts and approaches. In MA Mayes, Baron GM, eds. Aquatic Toxicology and Risk Assessment. 14 STP 1124. American Society for testing and Materials, Philadelphia, PA, USA : 107-127.
- Brodenius, S.J., Kahl M.D., Høglund M.D, 1995. Use of joint toxic response to define the primary mode of toxic action for diverse industrial organics chemicals. *Environ. Toxicol. Chem.*, 9: 1591-1605.
- Bozic B. 1960. Le genre *Tigriopus* (Norman), copépode harpacticoïde et ses formes européennes. Recherches morphologiques et expérimentales. *Arch. Zool. Exp. Gen.*, 98 : 167-269.
- Brouwer H., T. Murphy and Mc.Ardle L.A. 1990. A sediment-contact bioassay with *Photobacterium phosphoreum*. *Environmental Toxicology and Chemistry*, Vol 9., 1353-1358.
- Bufflap S.E. and Allen H.E. 1995. Sediment pore water collection methods for trace metal analysis : a review. *Water resaerch*, 29 (1), 165-177.
- Burton G.A. 1991. Assessing the toxicity of Freshwater sediments. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 10, 1585-1627.
- Burton G.A. Jr. 1992. Sediment Toxicity Assessment. Lewis publishers, Ed G. A. Burton, Jr., 457 p.
- Burton, A.G., Hickey, C.W., DeWitt, T.H., Roper, D.S., Morrisey, D.J., Nipper, M.G. 1996. In situ toxicity testing : Testing out the environmental stressors. *Setac News*. September : 20-22.
- 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.
- Cairns M.A., Nebeker A.V., Gakstatter J.H. and Griffis W.L. 1984. Toxicity of copper-spiked sediments to freshwater invertebrates. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 3, 435-445.

- Calabrese A. and Davis H.C. 1966. The pH tolerance of embryos and larvae of *Mercenaria mercenaria* and *Crassostrea virginica*. *Biol. Bull. mar ; biol. lab.*, Woods Hole 131., 427-436.
- Calabrese A., Collier R.S., Nelson D. A. and Miller J. E. 1973. The toxicity of heavy metals to embryos of the American oyster *Crassostrea virginica*. *Mar. Biol.*, 18, 162-166.
- Carr R.S. and Chapman D.C. 1995. Comparison of solid-phase and pore-water approaches for assessing the quality of marine and estuarine sediments. *Chemistry and ecology*, 7, 19-30.
- Chapman P.M. 1990. The sediment triad approach to determining pollution- induced degradation. *The Science of the Total Environment*, 11p.
- Chapman P.M. and Morgan J.D. 1983. Sediment bioassays with oysters larvae. *Bull. environ. Contam. Toxicol.*, 31, 438-444.
- Cook N.H., and Wells P.G. 1996. Toxicity of Halifax Harbour sediments : an evaluation of the Microtox solidphase test. *Water Qual. Res. J. Canada*, 31 (4), 673-708.
- Davis H.C., 1958. Survival and growth of clam and oyster larvae at different salinities. *Biol. Bull. mar. biol.lab.*, Woods Hole, 14, 296-307.
- Deneer J.W., Sinnige T.L., Seinen W., Hermens J.L.M. 1987. Quantitative structure activity relationships for the toxicity and bioconcentration factor of nitrobenzene derivatives towards the guppy *Poecilia reticulata*. *Aquat. Toxicol.* 10 : 115-129.
- De March, B.G.E. 1987. Simple similar action and independant joint action : two similar models for the joint effects of toxicants applied as mixtures. *Aquat. Toxicol.*, 9 : 291-304.
- Dickson K.L., Maki A.W. and Brungs W.A. (eds) 1987. Fate and effects of sediment-bound Chemicals in Aquatic Systems. Pergamon Press, new York, 449 p.
- Dillon T.M. 1994. A paradigm for developing sediment toxicity bioassays for the regulatory evaluation of dredged material, Miscellaneous paper D-94-4, U.S. Army Engineer waterways experiment Station, Vicksburg, MS., 28 p.
- Di Toro D.M., Zarba C.S., and Hansen D.J. 1991. Technical basis for establishing sediment quality criteria for nonionnic organic chemicals by using equilibrium partitioning. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 10, 1541-1583.
- Dittsworth, G.R., D.W. Schults, J.K.P. Jones, 1990. Preparation of Benthic Substrates for Sediment Toxicity Testing. *Environ. Toxicol.Chem.*, 9 : 1523-1529.
- Falchier M., Lassus P., Bardouil M., Le Dean L. Truquet P., Bocquene G. 1981. Sensibilité thermique d'un copépode harpacticoïde *Tigriopus brevicornis* (Müller). *Rev.Trav.Inst. Pêches Marit.*, 45(2) : 141-153.
- Finney, D.J. 1942. The analysis of toxicity tests on mixtures of poisons. *Ann. Appl. Biol.*, 29 : 82-94
- Fleming, R.J., D. Holmes and S.J. Nixon. 1998. Toxicity of permethrin to *Chironomus riparius* in artificial and natural sediments. *Environmental Toxicology and Chemistry* 17(7) : 1332-1337.

- Forget J., 1998. Impact neurotoxique de contaminants (pesticides et métaux) sur un crustacé marin *Tigriopus brevicornis* (Müller). Caractérisation de la cholinestérase et application à la surveillance des effets des polluants sur l'environnement marin. Thèse de doctorat es sciences. Université Pierre et Marie Curie. 181 p.
- Geffard O. 2001, Toxicité potentielle des sédiments marins et estuariens contaminés : évaluation chimique et biologique, biodisponibilité des contaminants sédimentaires. Thèse Univ- Bordeaux 1, spécialité écotoxicologie. 351 p.
- Geisy J.P. and Hoke R.A. 1991. Bioassessment of the toxicity of freshwater sediment. *Verhandlungen Internationale vereinigung Limnologie*, 24, 2313-2321.
- Hill, I.R., Matthiessen, P. and Heimbach, F. (eds) 1993. Guidance document on Sediment Toxicity Tests and Bioassays for freshwater and Marine Environments, From SETAC-Europe Workshop On sediment Toxicity Assessment, 8-10 nov. 1993 Renesse (NL), ed 105 p.
- His E. and Seaman M. 1993. Effects of twelve pesticides on larvae of oysters (*Crassostrea gigas*) and on two species of unicellular marine algae (*Isochrysis galbana* and *Chaetoceros calcitrans*). CIEM CM.1993/ E/24.
- His E. et Robert R. 1986. Utilisation des élevages larvaires de *Crassostrea gigas* en écotoxicologie marine. *Haliotis*. 15, 301-308.
- His E., Budzinski H., Geffard O. et Beiras R. 1997. Action d'un sédiment pollué par les hydrocarbures sur la métamorphose de l'huître japonaise, *Crassostrea gigas* (Thunberg). *C.R. Acad. Sci. Paris, sciences de la vie*, 320, 797-803.
- Hoke R.A., Geisy J.P. and Kreis JR.R.G. 1992. Sediment pore water toxicity identification in the Lower Fox River and Green Bay, Wisconsin, using the Microtox assay. *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, 23, 343-354.
- Knemann, H. 1981. Fish toxicity tests with mixtures of more than two chemicals : a proposal for a quantitative approach and experimental results. *Toxicology*, 19 : 229-238
- Lacaze J.C. et Paquet F., 1989. Tests d'évaluation du degré de pollution des sédiments marins : effets de la production de larves sur la consommation d'algues chez le copépode *Tigriopus brevicornis* . *Rev.Sci.Eau.*, 2(1) : 1-12.
- Landrum, P.F., 1989. Bioavailability and toxicokinetics of polycyclic aromatic hydrocarbons sorbed to sediments for the amphipod *Pontoporeia hoyi*. *Environ. Sci. Technol.*, 23 : 588-595.
- Landrum, P.F., Fontaine, T.D., Faust, W.R., Eadie, B.J., and Land G.A. 1992 a. Modeling the accumulation of polycyclic aromatic hydrocarbons by the amphipod *Diporeia* (spp). *Chemical Dynamics in Fresh Water Ecosystems*, edited by F.A.P. Gobas and J.A. McCorquodale, . Boca Raton, FL : Lewis, 111-128.
- Landrum, P.F., Gossiaux, D.C., Fisher, S.W., and Bruner K.A., 1991. The role of zebra mussels in contaminant cycling in the Great Lakes. *J. Shellfish. Res.*, 10 : 252-253.
- Landrum, P.F., Dupuis, W.S., Kukkonen J., 1994. Toxicokinetics and toxicity of sediment-associated pyrene and phenanthrene in *Diporeia* spp. : examination of equilibrium-partitioning theory and residue-based effects for assessing hazard. *Environ Toxicol Chem*, 13 : 1769-1780.

- Lange G.J., Cranston R.E., Hydes D.H., and Boust D. 1992. Extraction of pore water from marine sediments : a review of possible artifacts with pertinent examples from the North Atlantic. *Marine geology*, 109, 53-76.
- Lassus P., Le Baut C., Le Dean L., Bardouil M., Truquet P., Bocquene G., 1984. The use harpacticoid copepods for testing the effects of chemicals on larval production. *In* : Ecotoxicological testing for the marine environment. Persoone, G., Jaspers, E., Claus, C., Brede.
- Le Dean L. et Devineau J. 1987. In search of standardisation : a comparison of toxicity bioassays on two marine crustaceans *Palaemon serratus* and *Tigriopus brevicornis*. *Revue des Travaux de l'Institut des Pêches Maritimes*, 49 : 187-198.
- Loewe S., Muischnek H. 1926. Über Kombination wirkungen. 1) Mitleidung : Hilfsmittel der Fragerstellung. *Naumym-Schmiedebergs Arch. Exp. Pathol. Pharmacol*, 114 : 313-326.n : 131-142.
- McCarthy, L.S., Osburn G.W., Smith A.D., Dixon D.G. 1992. Toxicokinetic modeling of mixtures of organics chemicals. *Environ. Toxicol. Chem.*, 11 : 1037-1047.
- Mackay D., Shiu, W.Y. ; and Ma, K.C., L.S. 1992. Illustrated Handbook of Physical Chemical Properties and Environmental Fate for Organic Chemicals. Vol I, Monoaromatic hydrocarbons, Chlorobenzenes and PCBs. Chelsea, MI : Lewis. Martin M., Osbor K.E., Billig P. and Glickstein N. 1981. Toxicity of ten metals to *Crassostrea gigas* and *Mytilus edulis* embryos and Cancer magister larvae. *Mar. Pollut. Bull.*, 12(9), 305-308.
- Mix M.C., 1986. Cancerous diseases in aquatic animals and their association with environmental pollutants : a critical review of the literature. *Mar. Environ. Res.*, 20 : 1-141.
- Naudin S., Pardos M. et Quiniou F., 1995. Toxicité des sédiments du bassin versant du Stang Alar déterminée par une batterie de bio-essais. *Ingénieries - EAT - Spécial rade de Brest*, 67-74.
- Neff J.M., 1979. Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in the Aquatic Environment : sources, fates and biological effects. Applied Science, Essex, England, 262 p.
- Neff J.M., Anderson J.W. 1981. Responses of Marine Animals to Petroleum and Specific Petroleum Hydrocarbons. Applied Science, London.
- Neff J.M., 1985. Polycyclic aromatic hydrocarbons. *In* : Fundamentals of Aquatic Toxicology – Eds G.M. Rans and S.R., Petrocelli, Hemisphere, New York., 416-54.
- OCDE., 1993. Report of the oecd Workshop on effects Assessment of Chemicals in Sediments. Environment Monograph n° 60, Organization for Economic Cooperation and Development, Paris, 56 p.
- Parenthoën K., 1997. Recherches méthodologiques pour l'évaluation de l'écotoxicité des sédiments marins de la rade de Brest. Rapport de DEA, 25 p + 23 figures et 7 tableaux.
- Pavillon J.F., R. Menasria, Lacaze J.C., 1991. Contrôle de la pollution des sédiments marins au moyen de tests biologiques, méthodes comparées. Congrès international sur l'écotoxicologie des sédiments – 5-7 juin 1991. La Rochelle (poster).
- Pavillon, J.F., 1981. Importance écologique du substrat organique dissous pour les larves d'invertébrés marins. *Océanis*, 7 (1) : 79-86.

- Pavillon J.F., Menasria M.R., Mellaouah N., 1991. Effets biologiques de la complexation de l'argent par la matière organique dissoute. Etude de la variation du taux de mortalité du copépode benthique *Tigriopus brevicornis* élevé dans un milieu de culture de l'algue planctonique *Tetraselmis cordiformis* : *Océanis*, 18 (2) : 247-256.
- Pavillon J.F., Menesria, R., Forget J., Barka S., Chauvin V. 1999. Utilisation des copépodes en écotoxicologie marine : l'exemple de *Tigriopus brevicornis* (Müller) – *Océanis* vol. 25 n°4, p. 609-650.
- Pavillon J.F., Menasria R., 1998. Contribution à l'étude de l'évaluation de l'écotoxicité de sédiments marins et dulçaquicole - Approches méthodologiques. Rapport contrat Ifremer. 30 p.
- Pavillon J.F., Menasria R., 1999. Contribution à la mise au point de méthodes d'évaluation de l'écotoxicité des sédiments marins, par des Hydrocarbures aromatiques polycycliques, en fonction de la teneur en matière organique des sédiments. Etat des travaux 1. PNETOX . 31 p.
- Pavillon J.F., R. Menasria. 2000. Contribution à la mise au point de méthodes d'évaluation de l'écotoxicité des sédiments marins, par des Hydrocarbures aromatiques polycycliques, en fonction de la teneur en matière organique des sédiments. Etat des travaux 2 PNETOX. 33 p.
- Plackett, R.L., Hewlett P.S. 1948. Statistical aspects of the independent joint action of poisons, particular insecticides. I. The toxicity of a mixture of poisons. *Ann. Appl. Biol.* 35 : 347-358.
- Power E.A. and Chapman P.M. 1992. Assessing Sediment Quality. In : Burton G.A.Jr. (ed) *Sediment Toxicity Assessment*, 1-18.
- Quiniou F. et Alzieu C., 1999. L'analyse des risques chimiques appliquée aux dragages, in : *Dragages et environnement marin* Coord. C. Alzieu, Ed. Ifremer, 127-147.
- Quiniou F., Caisey X., 2002. Evaluation de la toxicité de sédiments marins et d'eau douce – Influence de leur composition sur la toxicité de contaminants organiques - (juillet 1998 – juillet 2001) – Application au domaine marin, Bilan des trois années de projet. *R.INT.DEL/PC 02-08.*, 50 p.
- Quiniou F., Caisey X. et Parenthoën; K., Ségalen M., Morel V., Le Donge C., Duhamel C. et Dheilily N. Evaluation de l'écotoxicité de sédiments marins et d'eau douce – Influence de leur composition sur la toxicité de contaminants organiques – (Juillet 1998 – Juillet 2001). Application au domaine marin, Bilan des trois années de projet. *R.INT.DEL/PC/Brest 02-08*, 50 p.
- Quiniou F., Caisey X., Ségalen M. et Morel V., 2000. Contribution à la mise au point de méthodes d'évaluation des sédiments, contaminés en hydrocarbures aromatiques polycycliques, en fonction de la teneur en matière organique des sédiments (juillet 1998 – juillet 2001) – Application au domaine marine, Bilan des travaux de la seconde année. *R.INT.DEL/PC/Brest 00-12.*, 14 p.
- Quiniou F., Delesmont R. et Delesmont E., 1999a. Application du test du développement embryonnaire de bivalve à la surveillance du milieu marin. 25 ans du RNO, Nantes octobre 1999. (Poster).

- Quiniou F., Goragner H., Paranthoën K., Le Garo C. et Ségalen M. 1999. PNETOX - Contribution à la mise au point de méthodes d'évaluation des sédiments, contaminés en hydrocarbures aromatiques polycycliques, en fonction de la teneur en matière organique des sédiments (juillet 1998 – juillet 1999) – Application au domaine marine, Bilan des travaux de la première année. *R.INT.DEL/PC/Brest 99-12.*, 32 p.
- Quiniou. F., Goragner. H. and Ségalen. M. 1997. Marine sediment toxicity assessment using bivalve embryo bioassay : effect of the storage on the toxicity. Colloque SECOTOX (Poster).
- Quiniou F., Judas A., Breton A et Chanteloze C., 2000. tableaux synthétiques des caractéristiques physico-chimiques et toxicologiques de : 16 HAP's, 5 pesticides, de l'arsenic, des PCD's et des PCB's. *R.INT. DEL/PC/Brest/00-18.* 44 p.
- Quiniou F., Le Squer-André. and Damée N. 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. Sess. Q. : 11 p.
- Quiniou F. et Toularastel, F. 1991. Mesure de l'effet biologique de la qualité d'un milieu par le bio-essai embryon de bivalve marin. CIEM. CM. 1991/ E : 26. Ref. K. : 8p.
- Robert R., His E. et Maurer D. 1986. Toxicité d'un desherbant, l'atrazine-simazine, sur les jeunes stades larvaires de *Crassostrea gigas* et deux algues fourrages, *Isochrysis aff. galbana* et *Chaetoceros calcitrans.*, *Haliotis*, 15 : 319-325.
- Smrchek J.C. and Zeeman M.G., 1998. Assessing risk to ecological systems from chemicals. *In* : Handbook of Environmental Risk Assessment and Management. Calow P. (ed.), 3, 24-90.
- Suedel, B.C., E. Deaver and J.H.J. Rodgers. 1996. Formulated sediment as a reference and dilution sediment in definitive toxicity tests. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 30 : 47-52.
- Swartz R.R. 1989. Marine sediment toxicity tests. *In* : Contaminated sediments-assessment and remediation. Committee on contaminated marine sediments, Marine Board, Commission on engineering and technical systems, National Research Council. National Academy Press, Washington, DC : 115-129.
- Thain J. 1992. Use of the Oyster *Crassostrea gigas* embryo bioassay on water and sediment elutriate samples from the German Bight., *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 91 : 211-213.
- Verrhiest G., Clément B., Blake G. 2001. Single and combined effects of sediment-associated PAHs on three species of freshwater macroinvertebrates. *Ecotoxicology*, 10 (6).

ANNEXES

Annexes 1
Analyses chimiques et granulométriques des sédiments
naturels

**Annexe 1-1 (Ifremer)
Sédiments naturels testés à Ifremer**

	Moulin Blanc	Prat ar Coum	Blancs Sablons	Pointe St Mathieu
Métaux (mg/kg)				
Aluminium (% sec)	3,4	3,2	4	0,8
Arsenic	10	6,5	2,1	1,0
Cadmium	0,48	0,16	< 0,1	< 0,1
Chrome total	47	19	24	3
Cuivre	55	6	2	< 1
Mercuré	0,22	< 0,05	< 0,05	< 0,05
Nickel	25	13	12	6
Plomb	73	23	24	1
Zinc	230	52	30	8
HAP's (mg/kg)				
Fluoranthène	0,25	0,044	< 0,005	< 0,005
Fluorène	0,078	0,006	< 0,005	< 0,005
Benzo(a)anthracène	0,13	0,02	0,005	< 0,005
Benzo(ah)anthracène	< 0,005	< 0,005	< 0,005	< 0,005
Benzo(b)fluoranthène	0,12	0,029	< 0,005	< 0,005
Benzo(k)fluoranthène	0,065	0,017	< 0,005	< 0,005
Benzo(a)pyrène	0,14	0,038	< 0,005	< 0,005
Benzo(ghi)perylène	0,074	0,013	< 0,005	< 0,005
Indeno(1,2,3-cd)pyrène	0,052	0,02	< 0,005	< 0,005
Acenaphthylène	< 0,05	< 0,05	< 0,005	< 0,005
Acenaphthène	0,017	< 0,005	< 0,05	< 0,05
Anthracène	0,026	0,007	< 0,005	< 0,005
Chrysène	0,11	0,019	< 0,005	< 0,005
Naphtalène	< 0,05	< 0,05	< 0,05	< 0,05
Phénanthrène	0,15	0,016	< 0,005	< 0,005
Pyrène	0,27	0,043	< 0,005	< 0,005
PCB's (µg/kg)				
CB 028	< 10	< 10	< 10	< 10
CB 052	< 10	< 10	< 10	< 10
CB 101	< 10	< 10	< 10	< 10
CB 118	< 10	< 10	< 10	< 10
CB 138	20	< 10	< 10	< 10
CB 153	25	< 10	< 10	< 10
CB 180	14	< 10	< 10	< 10
Somme CB	59	< 10	< 10	< 10
COT (% sec)	5,9	1,3	0,1	0,1
Granulométrie laser (vol)				
Moyenne µm	308,9	95,48	352,5	687,8
Médiane µm	239,9	45,24	293,1	720,2
Mode µm	716,7	139,2	219,4	859,9
% ≤ 900 µm	100	100	100	100,2
% ≤ 600 µm	78,3	98,5	86,7	6,3
% ≤ 63 µm	34,9	57,5	0,97	0
% ≤ 10 µm	9,85	21,1	0,37	0

Annexe 1-2 (IO – LPEM)

Caractéristiques du sédiment naturel de référence utilisé par le LPEM

(Rapport 1999-2001)

Lieu de prélèvement : Blancs Sablons

Les analyses effectuées par le laboratoire de Chimie analytique et Marine de l'Université de Lille 1 et ont révélé la faible teneur du sédiment en HAP. Cette faible teneur ne l'est peut-être pas pour l'organisme test. On voit que d'une analyse à l'autre les concentrations ont peu variées : quelques ng/g de sédiment sec.

HAP	Echantillon 1	Echantillon 2	Echantillon 1
Laboratoire d'analyse	Univ. Lille	Univ. Lille	Institut Pasteur
Naphtalène	n.d	n.d	< 5
2-Méthylnaphtalène	n.d	n.d	< 5
1-Méthylnaphtalène	n.d	n.d	< 5
2,6-Diméthylnaphtalène	n.d	n.d	< 5
Acénaphtylène	n.d	n.d	< 5
Acénaphthalène	n.d	n.d	< 5
2,3,5-Triméthylnaphtalène	n.d	n.d	< 5
Fluorène	n.d	n.d	< 5
Phénanthrène	7.5	7.7	< 5
Anthracène	n.d	n.d	< 5
1-Méthylphénanthrène	0.12	n.d	< 5
Fluoranthène	2.60	2.32	< 5
Pyrène	0.49	0.38	< 5
Benzo(a)anthracène	0.01	n.d	< 5
Chrysène	0.12	0.04	< 5
Benzo(b)fluoranthène	n.d	n.d	< 5
Benzo(k)fluoranthène	1.54	1.83	< 5
Benzo(e)pyrène	n.d	n.d	< 5
Benzo(a)pyrène	0.08	n.d	< 5
Pérylène	0.04	0.03	< 5
Indéno(1,2,3-cd)pyrène	0.01	n.d	< 5
Dibenzo(a,h)anthracène	0.02	n.d	< 5
Benzo(ghi)pérylène	0.03	n.d	< 5
Total (ng.g ⁻¹ poids sec)	12.56	12.38	< 5

Concentration en HAP du sédiment naturel de référence. Concentrations en ng.g⁻¹ de poids sec (1998). Une quantité moyenne de 12.49 µg / kg de sédiment sec est une quantité qui peut être considérée comme faible.

Les étapes entre le lieu de prélèvement du sédiment naturel et le laboratoire

Prélèvements : Le prélèvement est effectués *in situ*, sur la plage des Blancs Sablons, dans une zone peu habitée où la pression anthropique s'exerce principalement l'été en raison de l'afflux touristique. Prélevé en surface, le sédiment est conditionné en boîte ou en sac plastique. Il s'agit d'un sédiment sablo-vaseux selon la norme AFNOR.

Transport : Pour le L.P.E.M. situé à Paris, un transport rapide par Chronopost a été effectué. Les quantités ne dépassent pas en général 2-5 kg. Un délai de 36 heures s'est écoulé entre le moment du prélèvement et l'arrivée au laboratoire parisien.

ANNEXES 2

Paramètres physico-chimiques, toxicologiques et écotoxicologiques des HAP's sélectionnés

(in Quiniou *et al.*, 2000)¹

¹ Quiniou F., Judas A., Breton A et Chanteloze C., 2000. tableaux synthétiques des caractéristiques physico-chimiques et toxicologiques de : 16 HAP's, 5 pesticides, de l'arsenic, des PCD's et des PCB's. R.INT. DEL/PC/Brest/00-18. 44 p.

Annexe 2-1 (Ifremer)

Phénanthrène

Nom	Phénanthrène	Références
Paramètres physicochimiques		
Solubilité dans l'eau (25 °C)	1.6 mg/L 1 mg/L	Winspurs Bouchez <i>et al.</i>
Log Kow	4.57 4.52	Hazardous substances data bank De Maagd, 1998 Winspurs
Log Kp	2.73	
Koc	22 908	Hazardous substances data bank
Demi-vie dans l'environnement	en biodégradation : 437.5 - 2 625 j dans le sol : 2.5 - 25 j en laboratoire : 0.5 26 semaines	Hazardous substances data bank Hazardous substances data bank Bouchez <i>et al.</i>
Demi-vie dans les organismes marins	moule : 1.9 truite arc en ciel : 7 crevette : 0.9	
Présence dans l'environnement	rivières/eaux de surface : < 10 µg/L sédiments : < 19 000 ng/L eaux souterraines : < 0.78 mg/L	Hazardous substances data bank Hazardous substances data bank Hazardous substances data bank
Pouvoirs mutagènes et cancérogènes		
Cancérogénicité	données manquantes ou insuffisantes	Agency for Research on Cancer, 1986
Génotoxicité à court terme	preuves de cancérogénicité limitées	Agency for Research on Cancer, 1986
Mutagénicité	oui	Agency for Research on Cancer, 1986
Paramètres écotoxicologiques		
LD 50 Souris	700 mg/kg	Winspurs
Valeur d'effet la plus basse (ppb, poids sec)	240	Long <i>et al.</i> , 1995
Valeur d'effet moyenne (ppb, poids sec)	1 500	Long <i>et al.</i> , 1995
Toxicologie		
Facteur de bioaccumulation	70 ± 30	Ma <i>et al.</i> , 1999
BSAF <i>Potamocorbula amurensis</i>	0.169 - 2.79	Maruya <i>et al.</i> , 1997
BSAF <i>Tapes japonica</i>	0.05 - 2.66	Maruya <i>et al.</i> , 1997
BSAF Polychaetes	0.149 - 0.652	Maruya <i>et al.</i> , 1997
BCF	260 - 2 700	Chemical evaluation search and retrieval system
LC 50 Daphnie	0.1 mg/L	Winspurs
LC 50 <i>Neanthes arenaceodentata</i>	0.6 mg/L	Winspurs
LC 50 <i>Salmo gairdneri</i>	3.2 mg/L	Winspurs
LC 50 Ragworm	0.6 ppm	Hazardous substances data bank
LC 50 Schizopera knabeni	473 µg/g de sédiment sec	Hazardous substances data bank
LC 50 Photobact phosphoreum	0.0726 ppm	Hazardous substances data bank
EL 50 <i>Petromyzon marinus</i>	5 mg/L	Winspurs
EL 50 <i>Lepomis sp</i>	1 - 2 mg/L	Winspurs
EL 50 <i>Rhithropha harrisii</i>	0.075 - 0.3 mg/L	Winspurs
EC 50 <i>Artemia salina</i>	0.52 mg/kg	European Centre for Ecotoxicology and toxicology of Chemical, 1993
EC Mutatox/Microtox	0.48 µg/mL	Johnson et Long, 1998

Les valeurs de solubilité comme les constantes Kow Kp et autres paramètres sont déterminés en eau douce et sont inconnus pour l'eau de mer

Annexe 2 1 suite (Ifremer)

Fluoranthène

Nom	Fluoranthène	Références
Paramètres physicochimiques		
Solubilité dans l'eau (25 °C)	0.26-0.27 mg/L	Handbook of environmental data on organic chemicals
log Kow	5.22	De Maagd, 1998
log Kp	3.42	
Koc	66 000	Hazardous substances data bank
Demi-vie dans l'environnement	en eau claire : 21 h en eau trouble : 200 h en biodégradation : 143 - 182 j dans le sol : 5 mois - 2 ans en laboratoire : 17 961 semaines	Hazardous substances data bank Hazardous substances data bank Hazardous substances data bank Hazardous substances data bank Bouchez <i>et al.</i>
Demi-vie dans les organismes marins	moule : 2 - 29.8 truite arc en ciel : 6 huître : 5.9 - 11.1	
Présence dans l'environnement	rivières, eaux de surface : 0.1 - 928 ng/L particules en suspension : 2 - 20 mg/kg sédiments : 0 - 1 200 ppm 0.5 - 5.2 ppb	Hazardous substances data bank Handbook of environmental data on organic chemicals Hazardous substances data bank Handbook of environmental data on organic chemicals
Pouvoirs mutagènes et cancérogènes		
Cancérogénicité	non cancérogène	Agency for Research on Cancer, 1986
Génotoxicité à court terme	preuves de cancérogénicité limitées	Agency for Research on Cancer, 1986
Mutagénicité	oui	Agency for Research on Cancer, 1986
Paramètres écotoxicologiques		
LD 50 Rat	2 000 mg/kg	Winspurs
LD 50 Lapin	3 200 mg/kg	Winspurs
LD 50 Souris	100 mg/kg	Winspurs
RfD (Dose de Référence orale)	subchronique : 3 mg/kg /j chronique : 0.04 mg/kg /j	Risk Assesment Information System, 1993 Risk Assesment Information System, 1993
Valeur d'effet la plus basse (ppb,poids sec)	600	Long <i>et al.</i> , 1995
Valeur d'effet moyenne (ppb, poids sec)	5100	Long <i>et al.</i> , 1995
Toxicologie		
Facteur de bioaccumulation	350 ± 137	Ma <i>et al.</i> , 1999
BSAF	<i>Potamocorbula amurensis</i> : 0.112 - 2.2 <i>Tapes japonica</i> : 0.082 - 1.78	Maruya <i>et al.</i> , 1997

BCF	380 - 12 302 695 - 10 000	Hazardous substances data bank Handbook of environmental data on organic chemicals
LC50 Daphnie	31.9 à 102.6 µg/L	Winspirs
LC 50 Mysid shrimp	40 µg/L	Hazardous substances data bank
LC 50 Bluegill	3.98 µg/L	Hazardous substances data bank
LC 50 Polychaete	500 mg/L	Hazardous substances data bank
LC 50 <i>Cyprinodon variegatus</i>	560 µg/L	Hazardous substances data bank
LC 50 <i>Artemia salina</i>	0.04 mg/L	The ecotoxicity of chemicals. Aresini
EC 50 <i>Selenastrum capricornum</i>	54.4 µg/L	Hazardous substances data bank
EC 50 <i>Mytilus edulis</i>	626 mg/kg	The ecotoxicity of chemicals. Aresini
EC Mutatox/Microtox	0.83 µg/mL	Johnson et Long, 1998

ANNEXE 2-1 suite (Ifremer)

Benzo(k)fluoranthène

		Références
Nom	benzo[k]fluoranthène	
Paramètres physicochimiques		
Solubilité dans l'eau (25 °C)	0.00076 ppm	Hazardous substances data bank
Log Kow	6 6.11 6.84	De Maagd, 1998 EPA.gov. Winspurs
Log Kp	4.88	
Koc	3 311 311 1 000 000	Hazardous substances data bank
Demi-vie dans l'environnement	en eaux de surface : > 100 j en biodégradation : 139 j - 11 ans dans le sol : 2 ans	EPA.gov. Varanasi, 1989 Hazardous substances data bank
Demi-vie dans les organismes marins	moule : 11.9	
Présence dans l'environnement	rivières, eaux de surface : 0.8 - 400 ng/L eaux souterraines : 0.5 - 10 ng/L sédiments : 560 ppb	Hazardous substances data bank Hazardous substances data bank Hazardous substances data bank
Pouvoirs mutagènes et cancérrogènes		
Cancérogénicité	preuves de cancérogénicité suffisantes	Agency for Research on Cancer, 1986
Génotoxicité à court terme	données manquantes ou insuffisantes	Agency for Research on Cancer, 1986
Mutagénicité	oui	Agency for Research on Cancer, 1986
Toxicologie		
Facteur de bioaccumulation	2 110 ± 845	Ma <i>et al.</i> , 1999
BSAF <i>Potamocorbula amurensis</i>	0.088 - 1.15	Maruya <i>et al.</i> , 1997
BSAF <i>Tapes japonica</i>	0.046 - 0.353	Maruya <i>et al.</i> , 1997
BSAF Polychaetes	0.088 - 0.421	Maruya <i>et al.</i> , 1997
BCF	93 325 144	Hazardous substances data bank Winspurs

ANNEXES 3

Dopage des sédiments

ANNEXE 3.1 (Ifremer)

Description du dopage des sédiments par un mélange des trois HAP's

Constituants/Méthode	Caractéristiques à préciser pour chaque laboratoire	Caractéristiques pour Ifremer
Préparation des sédiments		
	Type Conditionnement Conservation	Sédiment naturel ou artificiel Frais et stocké au réfrigérateur pour le sédiment naturel et à température ambiante pour le sédiment artificiel
Conditionnement des HAPs		
	Fournisseur HAP, Conditionnement Conservation	<i>Phénanthrène, Fluoranthène, Benzo(k)Fluoranthène chez Supelco</i> <i>Certificats d'analyse fournis, pureté > 97 %</i> Conservation à environ 4 °C, à l'abri de la lumière (conditionnement d'origine) pendant une durée pouvant aller de quelques semaines à plusieurs mois mais dans tous les cas respect de la DLC (environ 3 ans).
Préparation		
Préparation de la vaisselle	Type Nettoyage	Tubes en verre stériles La vaisselle (utilisée pour la contamination, et les prélèvements pour analyse) est lavée à l'acide chlorhydrique 5 % à chaud puis rincée à l'eau déminéralisée et stérilisée 4 heures à 200 °C
Dopage par coating Phénanthrène	Préparation d'une solution mère Solvant : nature, référence Conservation	Prélèvement du Phénanthrène en poudre sous hotte et pesée (système double pesée) Dissolution à température ambiante et à l'abri de la lumière dans du méthanol de qualité CLHP (pureté > 99,8 %) de chez SDS, à raison de 1 mg/mL de solvant. Agitation magnétique ou environ 5 minutes à l'abri de la lumière Utilisation immédiate de la sol. mère et dosage éventuel de celle-ci
Dopage par coating Fluoranthène	Préparation d'une solution mère Solvant : nature, référence Conservation	Prélèvement du Fluoranthène en poudre sous hotte et pesée (système double pesée) Dissolution à température ambiante et à l'abri de la lumière dans du méthanol de qualité CLHP (pureté > 99,8 %) de chez SDS, à raison de 1 mg/mL de solvant. Agitation magnétique environ 15 minutes à l'abri de la lumière utilisation immédiate de la sol. mère et dosage éventuel de celle-ci

Dopage par coating Benzo(k)fluoranthène	Préparation d'une solution mère Solvant : nature, référence Conservation	Prélèvement du Benzo(k)Fluoranthène en poudre sous hotte et pesée (système double pesée) Dissolution à température ambiante et à l'abri de la lumière dans de l'acétone de qualité CLHP (pureté > 99,5 %) de chez SDS, à raison de 1 mg/mL de solvant. Agitation magnétique environ 5 minutes à l'abri de la lumière utilisation immédiate de la sol. mère et dosage éventuel de celle-ci
Contamination		
Contamination du sédiment par coating	introduction de la solution mère temps et conditions de mélange (aération, lumière, vitesse de roulement...) temps et conditions de repos	Détermination du poids sec des sédiments Pour chaque concentration : introduction du volume de solution(s) mère(s) nécessaire(s) pour atteindre les concentrations théoriques prédéterminées (en poids sec) dans des bouteilles en verre " Pyrex " de 1 litre . (Fluoranthène = 120 mg/kg ; Phénanthrène = 58 mg/kg ; benzo(k)fluoranthène = 50 mg/kg de sédiment sec) Mélange sur rouleuse à environ 10 tours/minute jusqu'à cristallisation complète de la solution mère sur les parois des flacons, sous hotte Temps maximum de roulage : 2 heures (fonction des volumes introduits) Dans chaque flacon, introduction de la quantité de sédiment nécessaire pour atteindre les concentrations théoriques prédéterminées et roulage 3 heures à température ambiante, à l'obscurité, dans les bouteilles en verre fermées. Contenu de la bouteille : part de sédiment plus part égale d'eau de mer référence pour le roulage

Utilisation du sédiment		
	conditions d'utilisation du sédiment contaminé Expérimentation sur les trois phases : eau surnageant, sédiment total et eau interstitielle	Transfert immédiat du contenu des bouteilles dans des béchers stériles de 2 litres décantation 30 à 60 mn Siphonnage de " l'eau surnageante" des bouteilles (eau de roulage) Récupération d'une partie du sédiment humide pour les tests en sédiment contact Récupération d'une autre partie du sédiment pour récupération de l'eau interstitielle par centrifugation 10 mn à 5000 g (Quiniou <i>et al.</i> , 1999a) ² Répartition des trois phases à tester dans les pots en polystyrène puis introduction des œufs fécondés 10 à 15 mn après la fécondation. Les sédiments sont testés à raison de 1, 5 et 10 g de sédiment humide par litre, les phases aqueuses sont testées pures et/ou diluées en fonction des volumes disponibles
	conditions d'utilisation du sédiment contaminé Expérimentation après maturation des sédiments dopés pendant 1 à 14 jours	Transfert immédiat du contenu des bouteilles dans des bechers stériles de 2 litres Stockage des bechers 1 à 14 jours en armoire thermostatée ($T = 21 \pm 1 \text{ } ^\circ\text{C}$) à l'abri de la lumière. Puis récupération des trois phases à tester comme précédemment Réalisation des essais comme précédemment.

² Quiniou F., Goraguer H., Paranthoën K., Le Garo C. et Ségalen M.. 1999a. PNETOX - Contribution à la mise au point de méthodes d'évaluation des sédiments, contaminés en hydrocarbures aromatiques polycycliques, en fonction de la teneur en matière organique des sédiments (juillet 1998 – juillet 1999) – Application au domaine marin, Bilan des travaux de la première année. R.INT.DEL/PC/Brest 99-12., 32 p.



Annexe 3.2 (Ifremer et IO – LPEM)
Dopage du sable des Blancs Sablons en phénanthrène et tétramin ;
expérience commune à l'Institut Océanographique et Ifremer

Constituants/Méthode	Caractéristiques à préciser pour chaque laboratoire	Caractéristiques pour Ifremer et Lpem
<i>Préparation des sédiments</i>		
	Type Conditionnement Conservation	Sédiment naturel des Blancs Sablons Frais et Transporté en glacière jusqu'au laboratoire puis stocké au réfrigérateur
<i>Conditionnement du Phénanthrène</i>		
	Fournisseur Conditionnement Conservation	<i>Phénanthrène de chez Supelco</i> <i>certificats d'analyse fournis, pureté > 97 %</i> - Conservation à environ 4 °C, à l'abri de la lumière (conditionnement d'origine) pendant une durée pouvant aller de quelques semaines à plusieurs mois mais dans tous les cas respect de la DLC (environ 3 ans).
<i>Préparation</i>		
Préparation de la vaisselle	Type Nettoyage	- Tubes en verre stériles - La vaisselle, utilisée pour la contamination, est lavée à l'acide chlorhydrique 5 % à chaud puis rincée à l'eau déminéralisée et stérilisée 4 heures à 200 °C
Dopage par coating Phénanthrène	Préparation d'une solution mère Solvant : nature, référence Conservation	- Prélèvement du Phénanthrène en poudre sous hotte et pesée (système double pesée) - Dissolution à température ambiante et à l'abri de la lumière dans du méthanol de qualité CLHP (pureté > 99,8 %) de chez SDS, à raison de 1 mg/mL de solvant. - Agitation magnétique environ 5 minutes à l'abri de la lumière - Utilisation immédiate de la solution mère

Contamination		
Contamination du sédiment en phénanthrène par coating	<ul style="list-style-type: none"> - introduction de la solution mère - temps et conditions de mélange (aération, lumière, vitesse de roulement...) - temps et conditions de repos 	<ul style="list-style-type: none"> - Détermination du poids sec du sédiment - Pour la concentration choisie de 60 mg/kg de sédiment sec : introduction du volume de solution mère pour atteindre la concentration théorique prédéterminée (en poids sec) des bouteilles en verre " Pyrex " de 1 litre - Mélange sur rouleur à environ 10 tours/minute jusqu'à cristallisation complète de la solution mère sur les parois des flacons, sous hotte - Temps maximum de roulage : 3 heures (en raison du volume de sol. mère introduit : 45,87 mL pour 1000 g de sédiment sec) - Une série de flacons sans Phénanthrène ni solvant subit le même conditionnement pour servir au sédiment non enrichi qui est destiné au test contrôle. - Dans chaque flacon, introduction de la quantité de sédiment nécessaire pour atteindre la concentration théorique prédéterminée et roulage 3 heures à température ambiante, à l'obscurité, dans les bouteilles en verre fermées. Contenu de la bouteille = part de sédiment plus part égale d'eau de mer référence pour le roulage. Le nombre de flacon est adapté à la quantité de sédiment nécessaire aux expérimentations sur test bivalve (Ifremer) et copépoде (Institut Océanographique)
	Préparation du sédiment contaminé en phénanthrène pour l'enrichissement en tétramin	<ul style="list-style-type: none"> - Transfert immédiat du contenu des bouteilles dans des béciers stériles de 2 litres - décantation une nuit à 4 °C, à l'abri de la lumière - Siphonnage de "l'eau surnageante" des bouteilles (eau de roulage) - Récupération du sédiment humide pour les tests en sédiment contact et détermination du poids sec (3 aliquotes de 3 à 5 g de sédiment humide mis en étuve à 60 °C pendant 48 h) - <u>Envoi en Chronopost</u> (en boîte isotherme avec bloc de froid), des quantités de sédiment nécessaires aux tests copépoде réalisés à l'Institut Océanographique. - Mise au réfrigérateur et à l'abri de la lumière, en flacons de verre stériles des fractions destinées au test bivalve (Ifremer) pour un emploi dans les 48 heures suivantes (après mesure du taux d'humidité)
	<ul style="list-style-type: none"> - Préparation du sédiment dopé (ou non) en phénanthrène pour l'enrichissement en 	<ul style="list-style-type: none"> - Chaque fraction de sédiment (dopée ou non en phénanthrène) est alors reprise et les quantités requises pour les essais prélevées pour un enrichissement en tétramin pris comme matière organique. - Trois concentrations de tétramin sont préparées pour avoir des sédiment enrichis avec 0, 15, 0,015 et 0,0015 % de tétramin; soit 0,66 ; 0,066 et 0,0066 g de CO /kg de sédiment sec

	tétramin (MO)	- Le tétramin préalablement broyé est mélangé au sédiment à l'aide d'un mixer juste avant le test.
--	---------------	--

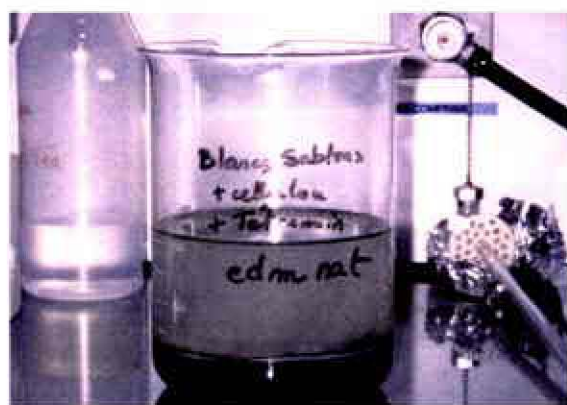
Utilisation du sédiment		
	<ul style="list-style-type: none"> - Laboratoire - Conditions d'utilisation du sédiment contaminé - Différents milieux testés 	<ul style="list-style-type: none"> - Ifremer - Chaque type de sédiment est testé à raison de 0,1 ; 1 ; 5 et 10 g de sédiment humide/L d'eau de mer référence ; les embryons fécondés (fécondation plus 10 à 15 mn) sont inoculés dans les milieux ainsi préparés - Sédiment tel quel, sédiment plus phénanthrène (HAP) mais sans tétramin (MO), sédiment plus tétramin mais sans HAP et sédiment dopé en HAP et MO.
	<ul style="list-style-type: none"> - Laboratoire - Conditions d'utilisation du sédiment contaminé - Différents milieux testés- 	<ul style="list-style-type: none"> - IO-LPEM - A réception à Paris les échantillons de sédiment sont mélangés avec du Tétramin aux concentrations de 0.15 ; 0.015 et 0,0015 % en poids de sédiment humide. <p>un sédiment témoin sans HAP et sans Tétramin, un sédiment avec HAP et sans Tétramin – sédiments dopés avec HAP et Tétramin.</p>

ANNEXE 3.3. (Ifremer)

Illustrations du dopage des sédiments naturels et artificiel

Essai de maturation, avec bullage, avant dopage en HAP (16 jours à 20 °C (± 2 °C) :

Sédiment des Blancs Sablons avec matières organiques (cellulose + tétramin) : après une maturation de 14 jours en eau de mer de référence naturelle l'eau surnageante est trouble et un film de bactéries recouvre la surface du sédiment.



7 cm d'eau de mer

3 cm de sédiment

Roulage du sédiment des Blancs Sablons :

Le sédiment est roulé, à raison d'un volume de sédiment humide pour un volume d'eau de mer référence, après dopage en phénanthrène par wall coating. Roulage réalisé à l'abri de la lumière sous hotte aspirante



(photos F. Quiniou, ©Ifremer)

ANNEXE 3.4. (IO - LPEM)

Techniques de dopage des sédiments

1. Les techniques utilisées

1.1. Mélangeur rotatif de laboratoire "Roller" de marque Wheaton :

par dépôt sur paroi " wall coating " d'une solution aqueuse de HAP ou introduite sous forme de poudre. L'homogénéité du mélange obtenu dépend de la nature du sédiment, de la vitesse de rotation des tambours, de la durée de la rotation, du comportement du sédiment dans le système (un mauvais brassage peut se produire du fait de la consistance du sédiment). Ce type de mélangeur convient pour quelques centaines de grammes de sédiment.

1.2. Robot mélangeur de type ménager :

mélange poudre + sédiment humide (naturel) ou sec (artificiel). Ces robots conviennent jusqu'à un kg de sédiment. Pour des quantités correspondant à la préparation de " sédiment mère " par mélange de poudres à l'état sec, ne dépassant pas une centaine de grammes, on peut utiliser des petits mélangeurs de ménage. Leur vitesse de rotation peut cependant ne pas convenir à certains sédiments fragiles.

Aucune des méthodes proposées n'est satisfaisante. Des systèmes de type industriel pour le mélange des poudres pourraient être adaptés, mais ils sont utilisés en général pour de grands volumes de poudres.

2. Méthode de mélange des contaminants : " dopage "

2.1. Dopage à sec :

poudre à poudre. Les HAP sont pesés à la balance de précision Metler AE 260 et introduits directement dans le flacon en verre pyrex de 1 litre remplie à moitié par le sédiment artificiel en poudre et mélangés tout d'abord à la main à l'aide d'une tige en verre pendant quelques dizaines de secondes. Puis l'ensemble est obturé et disposé sur le Mélangeur rotatif. Plus la concentration de HAP par kg de sédiment est faible plus l'opération est délicate. La vitesse de rotation (40t/mn maximum avec l'appareil utilisé) et la durée (12 heures) sont les facteurs les plus importants pour l'homogénéisation du mélange. Cette vitesse de rotation est limitée et peut être non adaptée au type de sédiment. On peut faire varier cette vitesse en couplant les axes de rotation des tambours avec un moteur électrique relié à un variateur de courant. Pour la préparation de sédiment dits " mère " à très forte concentration en HAP on peut utiliser un petit mélangeur de type " hachoir à persil " qui convient très bien pour quelques centaines de gr de poudres

2.2. Dopage du sédiment sec artificiel par contact humide avec une solution de HAP

Pour dissoudre les HAP on utilise soit de l'acétone (Merck pour analyse) soit du méthanol (pour CLHP Prolabo). Les solutions aqueuses ne dépassent pas 2 ml par kg de sédiment (un plus grand volume d'acétone entraînant des effets létaux non négligeables pour le copépode). La solution aqueuse est déposée à l'aide d'une pipette sur les parois du flacon et le flacon est disposé sur le mélangeur rotatif " roller ".

2.3. Dopage du sédiment naturel :

le sédiment naturel est prélevé humide. Son utilisation à l'état sec a posé quelques problèmes et a été abandonnée. En effet, le sédiment obtenu après séchage avait la dureté du ciment et nécessitait une pulvérisation préalable au mélange avec les HAP. On a donc préféré utiliser le sédiment à l'état humide et un robot rotatif du commerce comme homogénéisateur. Ce robot qui peut atteindre une vitesse de 5000 t/minute entraîne un mélange rapide en quelques minutes. Les résultats des séries de tests biologiques comme ceux de l'analyse chimique ont montré une bonne homogénéité du mélange sédiment naturel humide + poudre de HAP .

Les HAP utilisés au LPEM sont des poudres, du commerce, de marque Aldrich (fluoranthène) ou Acros (benzo-k-fluoranthène ; phénanthrène) pour analyse. Les solvants destinés à la préparation des solutions aqueuses sont des produits pour analyse.

ANNEXES 4

Protocoles des tests

ANNEXE 4.1. (Ifremer)
Protocole expérimental du bio essais
"développement embryo-larvaire de bivalve"

Espèce + souche	<i>Crassostrea gigas</i>
Eau de mer référence	Eau de mer référence naturelle provenant de l'écloserie d'Ifremer à Argenton (Carte 1). Ajustée à la salinité 30 avec de l'eau déminéralisée, puis filtrée sur cartouche type millipore de vide de maille 0,2 µm. L'eau est employée fraîche (moins de 10 jours après sa collecte) et conservée à l'abri de la lumière en salle thermostatée (10 à 15 °C maximum)
<ul style="list-style-type: none"> - Conditions d'essais - stade des organismes - durée et conditions d'exposition - milieu d'essai 	<p>Œufs fécondés, inoculés dans les milieux à tester à fécondation ° 10 à 15 mn 24 heures à 24 °C, à l'obscurité et sans apport de nourriture 800 à 1000 embryons pour 30 mL de milieu d'essai 3 à 5 réplicats par concentration d'essai 10 témoins</p>
<ul style="list-style-type: none"> - Système expérimental 	Pots stériles en polystyrène cristal de 100 mL Essai en volume de 30 mL
<ul style="list-style-type: none"> - Mesures effectuées - taux de réussite - du stade larve "D" - expression des résultats 	<p>Pourcentage de larve "D" normales et anormales. Différenciation entre larves "D" normales, larves avec anomalies du développement du manteau ou de la coquille et blocage au stade embryon. (illustrations annexe 4.2.). Dénombrements faits sur 100 individus par réplicat PBA = 100 - % larves "D" normale PNA = ((PBA dans essai - PBA témoin)/(100 - PBA témoin)) x 100 . Formule de Abbot (Anonyme, 1980)³</p>
<ul style="list-style-type: none"> - Critères de validité - Biologique - Toxique de référence 	<p>Témoins : moins de 20 % d'anomalie de développement CuSO₄ : la CE50 doit être comprise dans l'intervalle des valeurs acceptables selon Quiniou <i>et al.</i> (1999b)⁴ 4,88 ± 12,15 µg CuSO₄ /L La salinité de 30 et le pH des solutions étudiées (7 à 7,8) sont compatibles avec un bon développement embryonnaire des bivalves (Davis, 1958⁵. Calabrese et Davis, 1966⁶).</p>
Laboratoire + norme éventuelle	Ifremer Protocole ASTM ⁷ modifié décrit dans Quiniou et Alzieu (1999) ⁸

³ Anonyme. 1980. Standard methods for the examination of waters and wastewaters, American Public Health Association. 15th ed. Washington, D.C., 301 p.

⁴ Quiniou F., Delesmont R. et Delesmont E., 1999a. Application du test du développement embryonnaire de bivalve à la surveillance du milieu marin. 25 ans du RNO, Nantes octobre 1999. (Poster).

⁵ Davis H.C., 1958. Survival and growth of clam and oyster larvae at different salinities. *biol. Bull. mar. bio lab.*, Woods Hole, 14, 296-307.

⁶ Calabrese A. and Davis H.C., 1966. The pH tolerance of embryos and larvae of *Mercenaria mercenaria* and *Crassostrea virginica*. *Biol. Bull. mar; biol. lab.*, Woods Hole 131., 427-436.

⁷ ASTM, 1994. Standard guide for conducting static acute toxicity tests starting with embryos of four species of saltwater bivalve molluscs. Annual book of standards, American Society for Testing and Materials, Philadelphia, vol 11.05, 223-240.

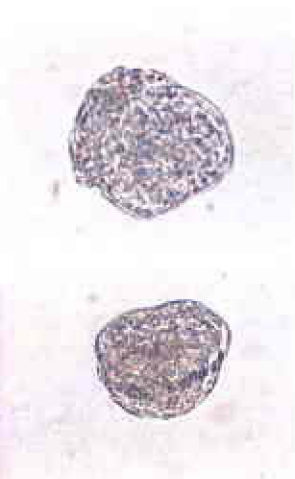
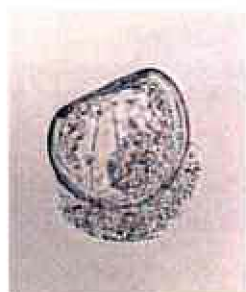
⁸ Quiniou F. et Alzieu C., 1999. L'analyse des risques chimiques appliquée aux dragages, in : Dragages et environnement marin Coord. C. Alzieu, Ed. Ifremer, 127-147.

ANNEXE 4.2. (Ifremer)

Illustration des anomalies de développement embryo-larvaire de l'huître creuse (*Crassostrea gigas*)



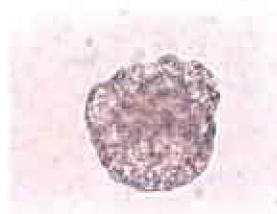
Larve "D" normale (longueur 60 à 80 μm)



Larves "D" anormales



anomalies de manteau et de coquille



Développement bloqué au stade embryon.

(photos F. Quiniou, ©Ifremer)

ANNEXE 4.3. (IO - LPEM) Protocole expérimental du bio essais

"Test de létalité du copépode" *Tigriopus brevicornis*



T. brevicornis femelle adulte

Espèce + souche	<i>Tigriopus brevicornis</i>
Eau de mer référence	Eau de mer référence naturelle provenant de Roscoff (point B de référence). L'eau est vieillie pendant un mois (destruction de la MO)
Conditions d'essais	
<ul style="list-style-type: none"> • stade des organismes • durée et conditions d'exposition • milieu d'essai 	-adultes de taille 800µm en moyenne -96 heures eau de mer vieillie, filtrée 0.45µm
Système expérimental	Cristallisoirs en pyrex de 25ml stérilisés Essai en volume de 20mL
Mesures effectuées	
<ul style="list-style-type: none"> • EXPRESSION DES RESULTATS 	-taux de mortalité exprimé en %
Critères de validité	
<ul style="list-style-type: none"> • Biologique 	Témoins : moins de 20 % de mortalité
Laboratoire + norme éventuelle	LPEM normalisation proposée à l'AFNOR

ANNEXE 4.3. (IO - LPEM) – Suite

Moyens utilisés

Eau de mer :

L'eau de mer qui a été utilisée provient du point B (site de référence pour la qualité de l'eau de mer, théoriquement non polluée) de la station marine de Roscoff, sa salinité est de 35,5 ‰. Elle est conservée au laboratoire à l'obscurité et dans des bidons de 35 litres jusqu'à son utilisation. Le stockage a lieu pendant au moins un mois. Pendant cette période, la matière organique, particulaire et dissoute est dégradée par les bactéries et le milieu devient rapidement anoxique. Subsiste seulement une matière organique dite inerte (sans action sur les organismes vivants) non dégradable, constituée de macromolécules. A la différence des eaux utilisées dans les éclosiers, l'eau de mer de Roscoff n'est pas qualitativement contrôlée lors de son prélèvement.

Avant chaque test, l'eau est préfiltrée sur papier filtre Prolabo n° 5, puis filtrée à l'aide de membranes de 0,45µm de porosité : elle est ainsi dépourvue de matière organique active. Lorsque des analyses de HAP sont nécessaires, les filtrations se font sur membrane GFC (fibre de verre de 0,8 µm de porosité).

Les tests ont été effectués en enceinte climatique (LMS Cooled incubator) à la température constante de 20 °C au degré près. L'éclairage varie selon un cycle de 12 heures selon un protocole définis une fois pour toute

Salinité 35, pH = 8,3

Préparation pour les expériences

- 1 - filtration sur papier filtre Prolabo pour éliminer les grosses particules
- 2 - filtration sur membrane en fibre de verre Watmann FC 0,8µm de porosité

sédiments :

origine naturelle
origine artificielle

Verrerie :

Cristallisoirs (50 ml), pipettes Pasteur, pipettes de 20 ml, **Balance de précision Metler**

La faible taille des copépodes et leur abondance permet la répétition des tests et l'utilisation de faibles volumes d'eau de mer (20 ml) et de sédiment (15 g).

Les copépodes (20) sont introduits à raison d'un par ml dans un cristallisoir contenant 20 ml d'eau de mer filtrée 0,45 µm. Chaque concentration est testée cinq fois et constitue une série. Chaque série est tri-pliquée. 5 témoins ne contiennent pas de HAP. Les cristallisoirs sont recouverts de papier aluminium pour limiter l'évaporation. La température de l'expérience est de 20 °C au degré près ; le pH est de 7,83. Au bout de 96 heures on compte les copépodes morts

Tests sur les HAP's en phase aqueuse :

Les gammes de concentration testées (ajoutées à l'eau de mer naturelle) ont été les suivantes :

Fluoranthène : 50, 75, 100, 200, 300, 400, 500 µg.l⁻¹
Benzo-k-fluoranthène : 2.5, 5, 7, 10, 75, 100, 200 µg.l⁻¹
Phenanthrene : 10, 20, 40, 50, 100, 200, 300, 400 µg.l⁻¹



Annexe 4.4. (IO - LPEM)

Méthodes d'analyse des effets conjugués des substances toxiques

Les théories sur l'action des mélanges font référence à un ensemble de travaux scientifiques s'appuyant :

- sur la méthode des isohogrammes ultérieurement nommé concept de concentration-addition (Loewe & Hirschneck, 1926⁹)
- sur la méthode d'analyse statistique des effets des mélanges à partir de modèles d'action similaire simples ou indépendants, de nombreux biostatisticiens (Bliss, 1939¹⁰) ; Finney, 1942¹¹ ; Plackett & Hewell 1948¹² ; Ashford, 1958¹³).

L'analyse des effets conjugués comprend trois parties :

- analyse des mécanismes d'action combinée
- description du phénomène " effets conjugués "
- prédiction de la toxicité des mélanges. Cette dernière partie est importante pour prévoir et évaluer le risque des associations de composés chimiques présents dans l'environnement, soit de manière accidentelle ou chronique.

Les effets observés sont dits :

additifs lorsque les effets du mélange sont l'addition des effets individuels

synergiques lorsque les effets du mélange sont supérieurs à la simple addition des effets de chacune des substances impliquées

antagonistes lorsque les effets du mélange sont inférieurs à l'addition de chacun des composés pris séparément.

De nombreux modèles existent comme :

- le MTI (Mixture Toxicity Index, Krnemann, 1981¹⁴), le QSAR (Quantitative Structure Activity Relationships, Deneer *et al.*, 1987¹⁵), les isoboles (Brodinius, 1990¹⁶), les courbes de réponse (De March, 1987¹⁷) ou le 1CFOK (First order Kinetics models, Mc Carthy *et al.*, 1992¹⁸). Les courbes de réponse dessinent la réponse de l'organisme dans une gamme de toxicité. En examinant la courbe, deux modèles sont applicables pour déterminer mathématiquement la toxicité du mélange. Le premier appelé " similar joint action " (Bliss 1939¹⁰) ou concentration addition (Andersen et Weber, 1975¹⁹) est utilisable quand les courbes dose réponse sont

⁹ Loewe S., Muischnek H., 1926 – über Kombination wirkungen. 1) Mitleigung : Hilfsmittel der Fragerstellung. *Naumym-Schmiedebergs Arch. Exp. Pathol. Pharmacol.*, 114 : 313-326.

¹⁰ Bliss, C.I., 1939 – The toxicity of poisons applied jointly. *Ann. Appl. Biol.*, 26 : 585-615.

¹¹ Finney, D.J., 1942 – The analysis of toxicity tests on mixtures of poisons. *Ann. Appl. Biol.*, 29: 82-94

¹² Plackett, R.L., Hewlett P.S., 1948 – Statistical aspects of the independent joint action of poisons, particular insecticides. I. The toxicity of a mixture of poisons. *Ann. Appl. Biol.* 35: 347-358.

¹³ Ashford, J.R., 1958 – Quantal responses to mixtures of poisons under conditions of simple similar action. The analysis of uncontrolled data. *Biometrika*, 45 : 74-88.

¹⁴ Knemann, H., 1981 – Fish toxicity tests with mixtures of more than two chemicals : a proposal for a quantitative approach and experimental results. *Toxicology*, 19 : 229-238

¹⁵ Deneer J.W., Sinnige T.L., Seinen W., Hermens J.L.M., 1987 – Quantitative structure activity relationships for the toxicity and bioconcentration factor of nitrobenzene derivatives towards the guppy *Poecilia reticulata*. *Aquat. Toxicol.* 10 : 115-129.

¹⁶ Brodinius, S.J., 1990 – Modelling the joint toxicity of xenobiotics to aquatic organisms : Basic concepts and approaches. In MA Mayes, Baron GM, eds. *Aquatic Toxicology and Risk Assessment*. 14 STP 1124. American Society for testing and Materials, Philadelphia, PA, USA : 107-127.

¹⁷ De March, B.G.E., 1987 – Simple similar action and independent joint action : two similar models for the joint effects of toxicants applied as mixtures. *Aquat. Toxicol.*, 9 : 291-304.

¹⁸ McCarthy, L.S., Osburn G.W., Smith A.D., Dixon D.G., 1992 – Toxicokinetic modeling of mixtures of organics chemicals. *Environ. Toxicol.Chem.*, 11:1037-1047.

¹⁹ Andersen, P.D., Weber L.J., 1975 – The toxicity to aquatic pollutants of mixture of heavy metals. *International Proceedings, Heavy Metals in the Environment*, Toronto, Ontario, Canada, October, 27-31 : 933-954.



parallèles (coefficient des pentes égaux). Les études portant sur des produits chimiques (Brodénus *et al.*, 1995²⁰) ont montré que le modèle de simple addition-concentration n'était valable que pour les éléments chimiques ayant le même mode d'action chez l'organisme étudié (Mc Carthy *et al.*, 1992¹⁸ ; Brodénus *et al.*, 1995²⁰).

- Le deuxième modèle d'action combinée, initialement nommé "indépendant joint action" (Bliss, 1939¹⁰) est appelé réponse-addition (Andersen et Weber, 1975¹⁹). Chaque polluant du mélange contribuant à la réponse globale de l'organisme, seulement si les concentrations entraînent un seuil spécifique (comme une mortalité de 50 % des organismes).

$$XUT_A + YUT_B + 1UT (A+B)$$

UT est l'Unité Toxique

A et B = les contaminants étudiés

X et Y = toxicités relatives de chaque contaminant ($X=CA/CL50_A$; $Y=CB/CL50_B$)

CA et CB = les concentrations des toxiques dans le mélange provoquant 50 % de mortalité

²⁰ Brodénus, S.J., Kahl M.D., Hoglund M.D., 1995 – Use of joint toxic response to define the primary mode of toxic action for diverse industrial organics chemicals. *Environ. Toxicol. Chem.*, 9: 1591-1605.



ANNEXE 5

Rendement du dopage

ANNEXE 5.1. (IO – LPEM)

Rendement du dopage des sédiments artificiel et naturel

En fonction de leurs caractéristiques physico-chimiques et du traitement physique appliqué pour le dopage, les échanges de contaminants entre les sédiments testés et le compartiment eau, lui-même constitué de l'eau interstitielle et de l'eau de recouvrement dite "surnageante" peuvent varier en fonction de la solubilité des contaminants, des mouvements affectant l'eau et le sédiment (remise en suspension, bioturbation...). Les tests étant effectués en mode statique (sans courant d'eau), il était nécessaire d'évaluer par l'analyse chimique la capacité des contaminants à migrer du sédiment dopé jusqu'à la pleine eau. Surtout s'agissant d'Hydrocarbures polycycliques aromatiques dont la solubilité dans l'eau est mal connue. D'une manière générale leur solubilité varierait de $1\mu\text{g.l}^{-1}$ à 1mg.l^{-1} . Leur solubilité dans l'eau de mer, milieu fortement réactif est inconnue.

Pour le phénanthrène on admet dans l'eau douce une solubilité de $823\pm 38\mu\text{g.l}^{-1}$. Le fluoranthène serait moins soluble : $76\mu\text{g.l}^{-1}$ et le benzo-k-fluoranthène de 76ng.l^{-1} . Ces analyses étaient nécessaires pour mettre en évidence l'exposition des organismes pendant 4 jours aux HAP. Compte tenu du coût financier de ces analyses, celles-ci ont été limitées principalement au phénanthrène. Quelques analyses ont été effectuées pour le fluoranthène. Des analyses chimiques ont été effectuées par le LCAM de l'Université de Lille 1 sur 55 échantillons : 24 de sédiment, 24 de l'eau surnageante, 8 d'eau interstitielle. Ces échantillons ont été prélevés à différents moments J0, J2, J4, J9.

Les analyses ont concerné essentiellement le phénanthrène et le fluoranthène. Si d'une manière générale, les résultats montrent bien la présence dans l'eau des HAP dopant le sédiment, l'importance du flux sédiment-eau est difficile à évaluer.

Phénanthrène

Sédiment artificiel

Pour une concentration de $1,95\text{mg/kg}$ à JO on observe au bout de 2 jours une concentration de $510\mu\text{g.kg}^{-1}$ soit une diminution de près de 75 %. L'eau surnageante passe de 0 le premier jour à $3,5\mu\text{g.l}^{-1}$ au bout de 24 heures et à $90,34\mu\text{g.l}^{-1}$ au bout de 48 heures. A 9 jours la concentration est de $29,12\mu\text{g.l}^{-1}$. S'agit-il d'une conséquence de la dégradation par les bactéries ? L'eau interstitielle pour laquelle une seule mesure a été faite montre une concentration au bout de 24 heures

Sédiment naturel

Pour une concentration initiale de $3,61\text{mg/kg}$ de sédiment on observe une diminution de 55 % au bout de quatre jours et de presque 100 % au bout de 9 jours.

Pour l'eau surnageante on passe de $4,80\mu\text{g.l}^{-1}$ au bout de 24 heures à $20,02\mu\text{g.l}^{-1}$ au bout de 48 heures soit 4,17 fois plus. A quatre jours les valeurs sont de $12,39\mu\text{g.l}^{-1}$ et $13,85\mu\text{g.l}^{-1}$ au bout de 9 jours.

Pour l'eau surnageante la concentration de $572,63\mu\text{g.l}^{-1}$ au bout de 24 heures passe à $283,7\mu\text{g.l}^{-1}$ au bout de 48 heures, $183,85\mu\text{g.l}^{-1}$ au bout de 72 heures et à $149,12\mu\text{g.l}^{-1}$ au bout de 9 jours soit une diminution de près de 75 %. Ce qui est cohérent avec l'analyse du sédiment brut. A noter que le phénanthrène est le plus soluble des trois HAP testés.



ANNEXE 5.1. suite (IO – LPEM)

Rendement du dopage des sédiments artificiel et naturel

Fluoranthène

Sédiment artificiel

Pour une concentration initiale de 349,6 mg/kg de sédiment on obtient une concentration de 206,73 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ au bout de 48 heures, 187,39 $\mu\text{g.l}^{-1}$ au bout de 72 heures et 161,94 $\mu\text{g.kg}^{-1}$ au bout de 96 heures. soit une diminution moyenne de la concentration de 46,9 $\mu\text{g.kg}^{-1}.\text{j}^{-1}$ (dissolution du fluoranthène dans l'eau douce : 75 $\mu\text{g.l}^{-1}$).

Eau surnageante : on observe à partir des analyses du milieu : 428 $\mu\text{g.l}^{-1}$ au bout de 24 heures, 406,94 $\mu\text{g.l}^{-1}$ au bout de 72 heures et 236,58 $\mu\text{g.l}^{-1}$ au bout de 96 heures

Une deuxième série d'échantillons a donné successivement : 189,07 ; 178,02 ; 113,5 $\mu\text{g.l}^{-1}$.

Ces valeurs sont supérieures aux valeurs de solubilité dans l'eau douce (75 $\mu\text{g.l}^{-1}$). Soit il s'agit de contaminations au cours du recueil des échantillons (en particulier par des particules chargées en HAP) soit d'erreurs d'analyse. Compte tenu de la décroissance dans les deux séries de mesure, il est probable que l'erreur vienne de la phase de filtration des échantillons.

Phenanthrène					
jours	0	1	2	4	9
<i>Sédiment artificiel</i>					
<i>sédiment brut*</i>	1,95	-	0,51		0,51
<i>eau interstitielle**</i>	-	53,4	-		29,12
<i>eau surnageante**</i>		3,5	90,34		
<i>Sédiment naturel des Blancs Sablons</i>					
<i>sédiment brut*</i>	3,61			1,64	0,05
<i>eau interstitielle**</i>	<		29,17 22,10		
<i>eau surnageante**</i>	0	4,8 μ	20,02	12,39	13,85

Fluoranthène					
jours	0	1	2	3	4
<i>Sédiment artificiel</i>					
<i>sédiment brut*</i>	349,57		206,73	187,39	161,94
<i>eau surnageante**</i>	0	428,05		406,94	236,58
	0	189,05		178,02	114,93

* valeurs en $\mu\text{g.g}^{-1}$

** valeurs en $\mu\text{g.l}^{-1}$

Annexes 6

Résultats des bio essais



ANNEXE 6.1. (Ifremer)

Evaluation de l'innocuité des matières organiques

Avant toute incorporation dans le sédiment de référence, l'innocuité des MO a été recherchée *en testant* ses dernières seules en phase aqueuse à des concentrations correspondant aux quantités présentes dans les sédiments qui seront testés ultérieurement. Le tableau suivant donne les concentrations de MO testées.

sédiment g/l		0	1			5			10		
% COT			1	5	10	1	5	10	1	5	10
Tétramine	20 %	0	1,36	6,8	13,6	6,8	34	68	13,6	68	136
	80 %	0	5,4	27,2	54,4	27,2	136	272	54	272	544
Cellulose	20 %	0	1,49	7,44	14,9	29,8	37,2	298	14,9	74,4	149
	80 %	0	5,95	29,8	59,5	7,45	149	74,5	59,5	298	595

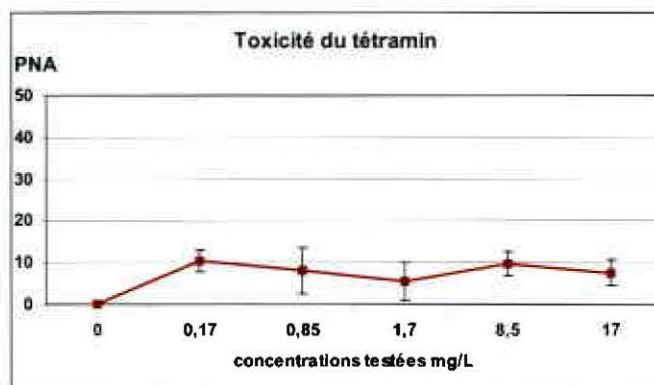
Quantités de MO introduite dans les milieux testés (valeurs exprimées en mg/l)

Pourcentage de larves anormales en présence de matière organique (Tétramine ou Cellulose) testées seules pour des taux de COT de 1, 5 ou 10 %, constitué de 20 ou 80 % de chacune de ces deux MO dans 1, 5 ou 10 g/l de sédiment. moyenne de 3 réplicats et (écart-type).

g/l		0	1			5			10		
%COT			1	5	10	1	5	10	1	5	10
Tétramin	20 %	6.7 (0.9)	22.5 (7.0)	49 (7.0)	100	49 (7.0)	100	100	100	100	100
	80 %	6.7 (0.9)	74.6 (19.4)	99.3 (0.5)	100	74.6 (19.4)	100	100	99.3 (0.5)	100	100
Cellulose	20 %	6.7 (0.9)	7.0 (2.3)	10.3 (4.7)	5.5 (2.0)	10.3 (4.7)	8.5 (0.9)	4.2 (0.7)	5.5 (2.0)	4.2 (0.7)	6.6 (0.9)
	80 %	6.7 (0.9)	13.3 (2.8)	5.2 (2.0)	5.0 (1.7)	5.2 (2.0)	6.6 (0.9)	7.6 (1.5)	5.0 (1.7)	7.5 (1.5)	

Effet de la Tétramin testée seule en quantités équivalentes à un sédiment testé jusqu'à 10 g/l (poids sec) avec un enrichissement en matière organique correspondant 0,17 % de Tétramine. PNA = Pourcentage Net de larves Anormales ; IC95 % = Intervalle de confiance à 95 % ; pour 6 réplicats par concentration testée.

Annexe 6.1. (Ifremer)

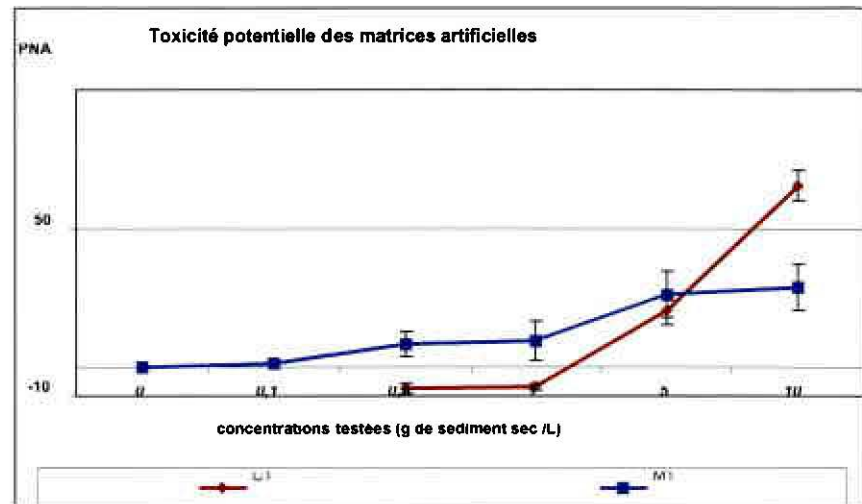


équivalent sédiment g/l	0	0,1	0,5	1	5	10
tétramin g/L	0	0,17	0,85	1,7	8,5	17
PNA moyen	0	10,3	8,1	5,5	9,7	7,5
(écart-type)	0	2,6	5,6	4,6	2,9	3,1

Toxicité du tétramín en PNA (pourcentage Net de larves Anormales)

Annexe 6.2.

Evaluation de la toxicité potentielle des matrices artificielles



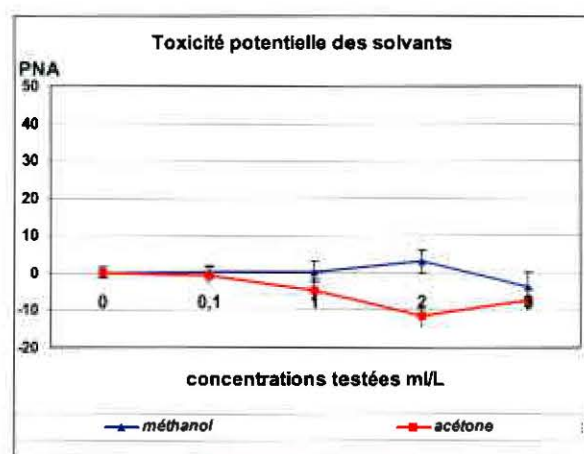
La matrice M1 ne contient pas de matière organique et la matrice C1 contient 4,85 % d' α cellulose et 0,15 % de tétraméthylamine soit 2 % de COT.

Matrice	Concentration g/L	0	0,1	0,5	1	5	10
C1	moyenne	0		- 7,1	- 6,9	20,4	65,8
	IC 95 %	0		1,9	1,5	4,6	5,6
M1	moyenne	0	1,3	8,5	9,9	26,4	29,1
	IC 95 %	0	1,7	4,5	7,2	8,6	8,3

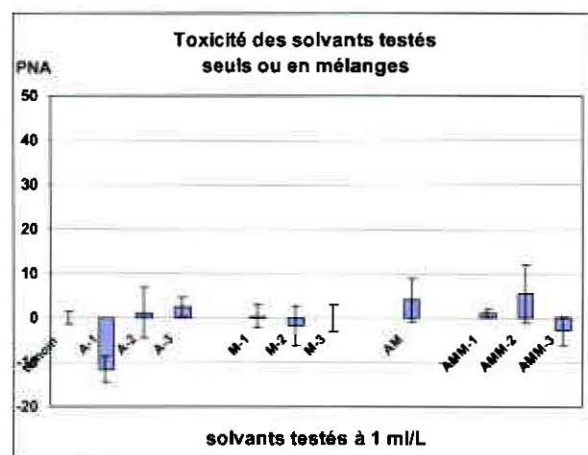
Tableau des valeurs moyennes de Pourcentage Net d'Anomalie de développement embryonnaire de l'huître creuse et IC 95 %, lorsqu'il est réalisé en présence de 0,1 à 10 g de sédiment sec /L

Annexe 6.3. (Ifremer)

Evaluation de l'innocuité des solvants vis-à-vis de *Crassostrea gigas*



Toxicité potentielle du méthanol et de l'acétone vis-à-vis du développement embryolaire de l'huître creuse exprimée en Pourcentage Net d'Anomalies (PNA). Aucun effet toxique n'est observé entre 0,1 et 3 ml/L.



Toxicité potentielle du méthanol et de l'acétone vis-à-vis du développement embryolaire de l'huître creuse exprimée en Pourcentage Net d'Anomalies (PNA). Les deux solvants testés seuls ou en mélange binaire et ternaire à la concentration de 1 ml/L ne provoquent pas de toxicité significative.

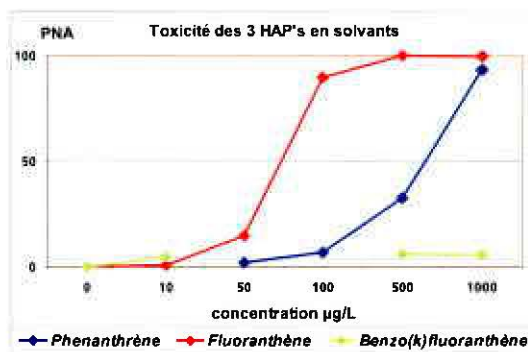
ANNEXE 6.4. (Ifremer)

Toxicité des HAP's en phase aqueuse

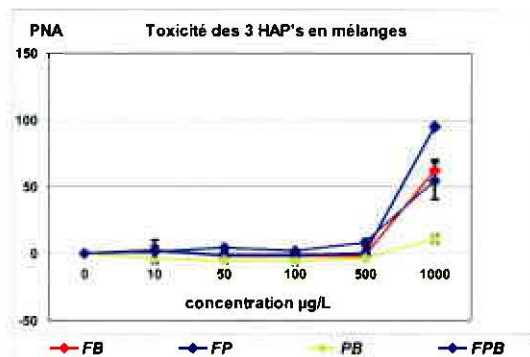
Testés après mise en solution à saturation en eau de mer de référence pendant 24 h. Après agitation sur plaque magnétique, les solutions ont été filtrées sur 0,2 µm et testées telles quelles et diluées : aucun effet toxique n'a été observé aux plus fortes concentrations (5 réplicats).

Milieux testés	% de larves	Anormales
témoin	moyenne	4,47
	écart-type	3,29
	IC 95	2,88
Benzo(k)fluoranthène (Bk)	moyenne	4,92
	écart-type	3,66
	IC 95	3,20
Phénanthrène (P)	moyenne	1,43
	écart-type	0,91
	IC 95	0,80
Fluoranthène (F)	moyenne	6,25
	écart-type	3,47
	IC 95	3,04

Toxicité des HAP's testés en solvant

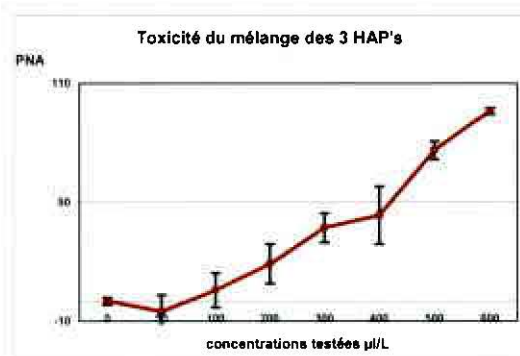


HAP's testés un par un en solvant



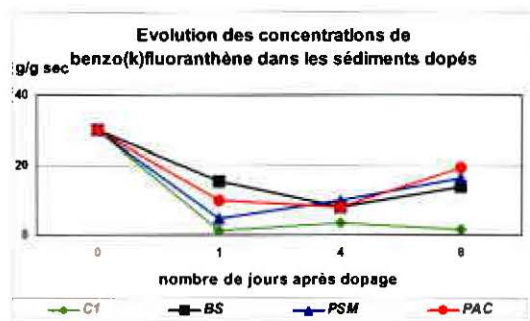
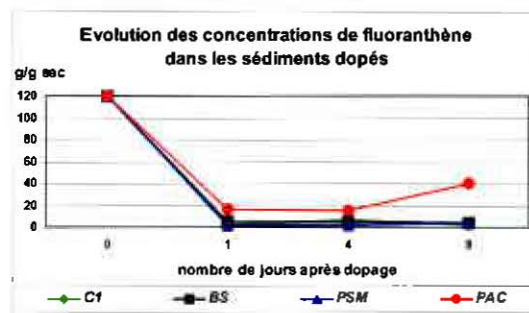
HAP's testés en mélanges binaires (50 %) ou ternaire (33 %)

HAP'S TESTES EN MELANGE : Bk 21,93 % + P 25,44 % + F 52,63 % EN SOLVANTS (MOYENNE ± IC 95 %)

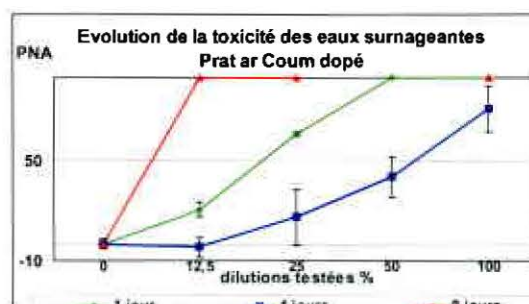
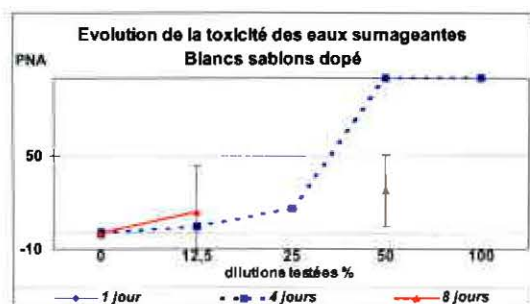
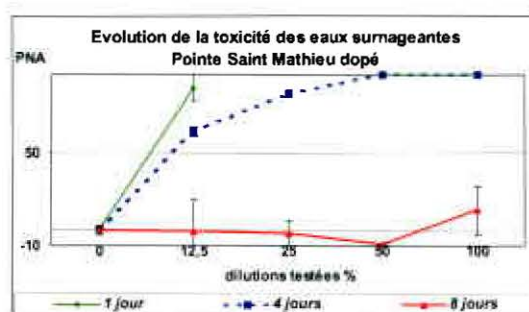
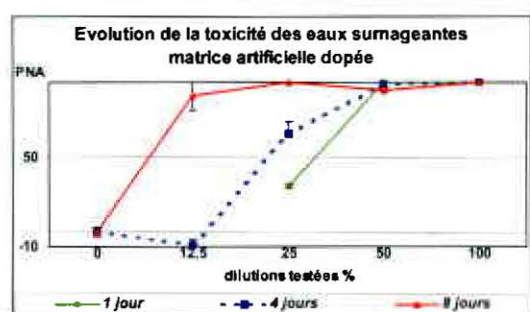


HAP's testés en mélange : Bk 21,93 % + P 25,44 % + F 52,63 % en solvants (moyenne ± IC 95 %)

Annexe 6.5. (Ifremer) Evolution des concentrations de HAP's dans les sédiments et eaux surnageantes après dopage



Evolution des concentrations de HAP's dans les sédiments, un à huit jours après le dopage. Concentrations de départ :
P = 58 mkg,
F = 120 MG/KG,
Bk = 30 mg/kg.



Evolution de la toxicité des eaux surnageantes, 1 à 8 jours après le dopage des sédiments naturels et artificiel en HAP's (moyenne \pm IC 95 %).

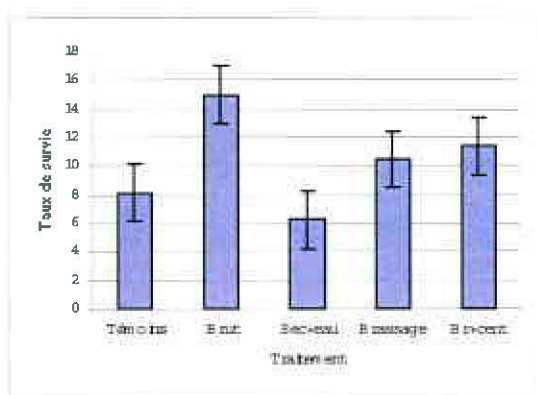
Annexe 6.5. (suite) (Ifremer)

HAP's µg/L	jours	C1	BS	PSM	PAC
	0	0	0	0	0
Phénanthrène	1		1259	1223.9	664.9
	4	653.7			420.9
	8		216.5	112.9	10.9
	0	0	0	0	0
Fluoranthrène	1		1943.2	1634.4	647.9
	4	427.6			385.3
	8		340.2	53.8	81.5
	0	0	0	0	0
Benzokfluoranthène	1		117.5	172.1	333.2
	4	208.1			151.3
	8		216.5	21.5	38

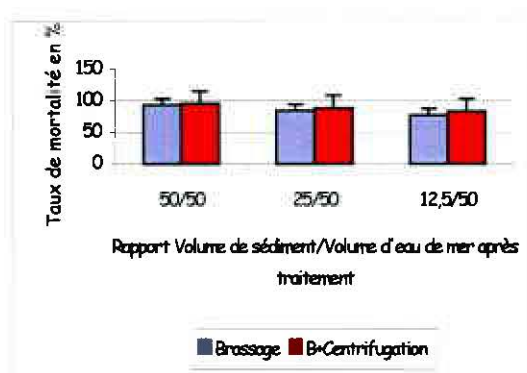
Concentrations mesurées dans les eaux surnageantes, un à huit jours après le dopage.
(C1 = matrice artificielle, BS = Blancs Sablons, PSM = Pointe Saint-Mathieu, PAC = Prat ar Coum)

ANNEXE 6.6. (IO – LPEM)

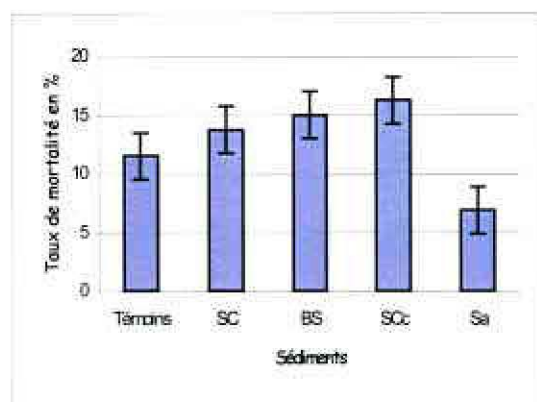
Facteurs méthodologiques influençant la réponse du test de mortalité de *Tigriopus brevicornis*



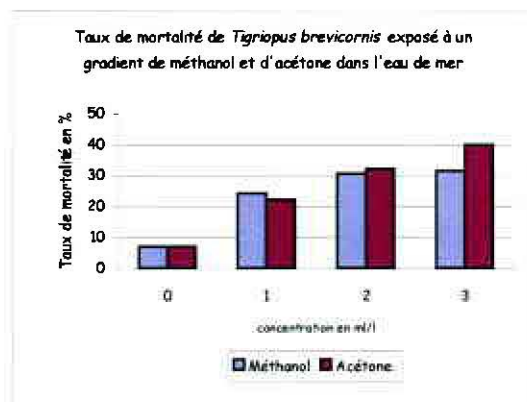
1. Variation de la qualité du sédiment naturel des Blancs Sablons selon son état et le traitement mécanique subi (Rapport 1998)



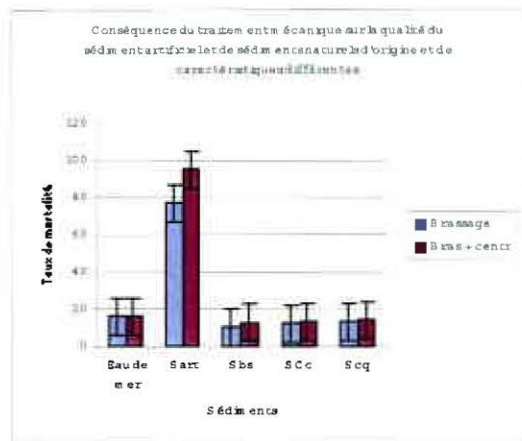
4. Variation de la qualité du sédiment artificiel en fonction du traitement subi et du rapport volume de sédiment volume d'eau



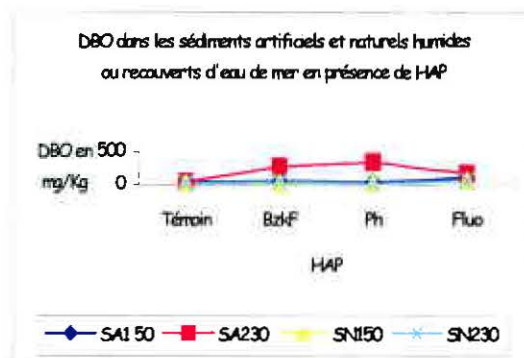
2. Variation de la qualité des sédiments en fonction de leur origine et de leurs caractéristiques (Rapport 1998)



5. Toxicité du méthanol et de l'acétone utilisés pour la préparation des solutions aqueuses de HAP



3. Conséquences du traitement mécanique sur la qualité du sédiment artificiel et de sédiments naturels d'origine et de caractéristiques variées



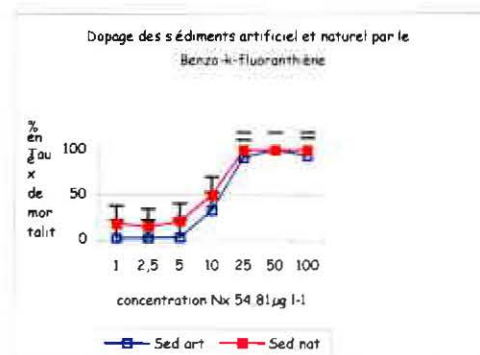
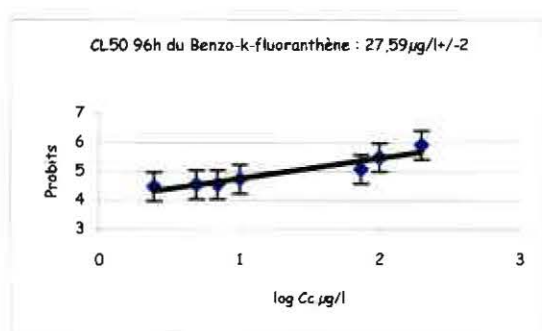
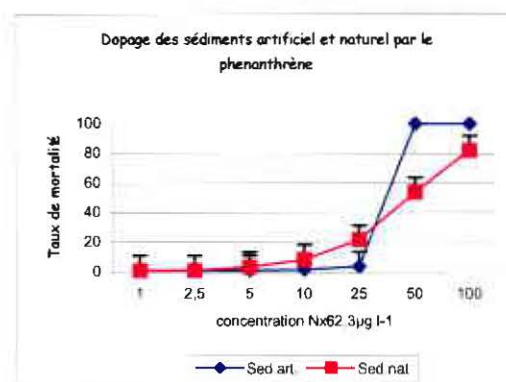
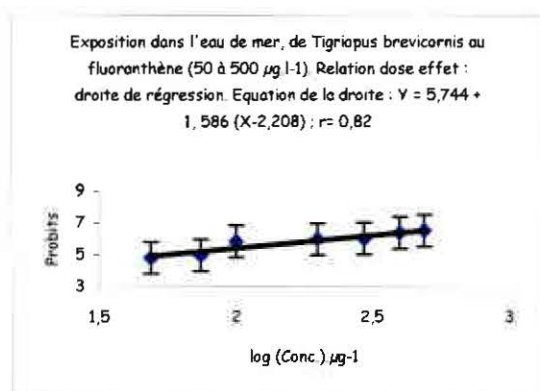
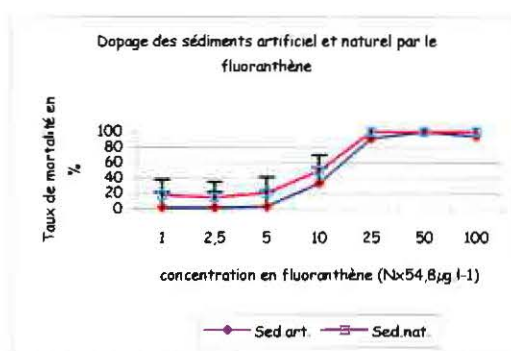
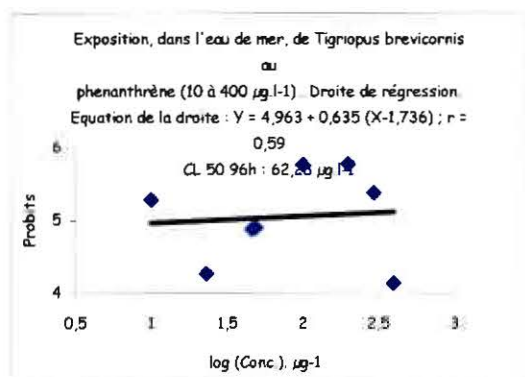
6. DB.O. Demande biologique en oxygène des sédiments artificiel (SA) et naturel des sédiments artificiel (SA) et naturel Blancs Sablons (SN) humides (SA2 30 et SN2 30) ou recouverts d'eau de mer (SA1 50 et SA2 50) en présence des HAP testés

ANNEXE 6.7. (IO – LPEM)

Comportement des HAP's dans les différents milieux

Eau de mer :
Recherche des CL50 (96 h)
pour le copépode (Rapport 99)

Sédiment :
Conséquence sur le taux de mortalité du
copépode du dopage par les HAP des
sédiments artificiel et naturel.

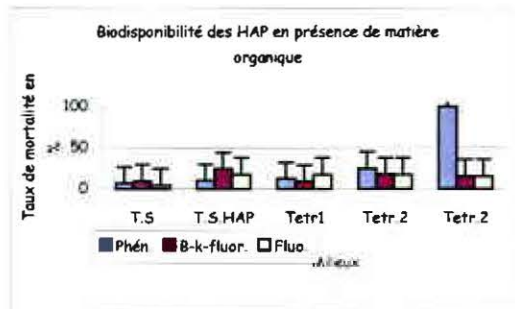


ANNEXE 6.8. (IO – LPEM)

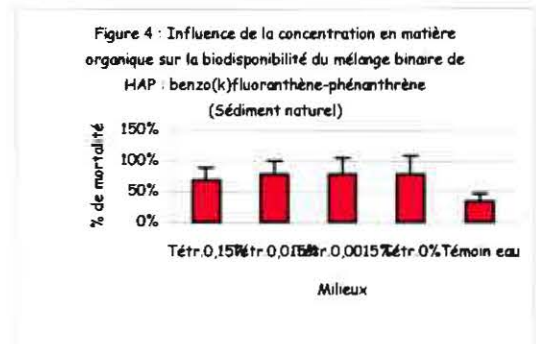
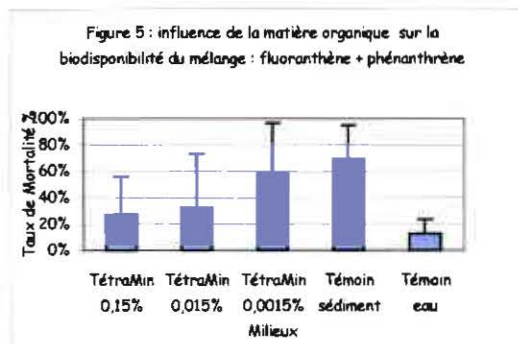
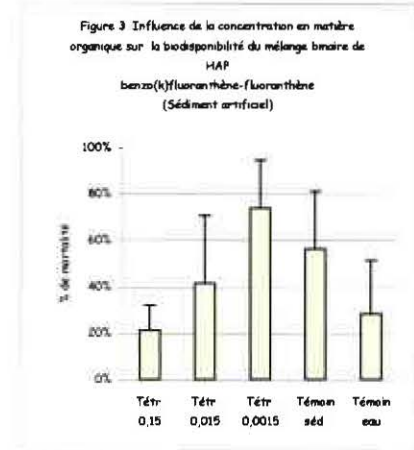
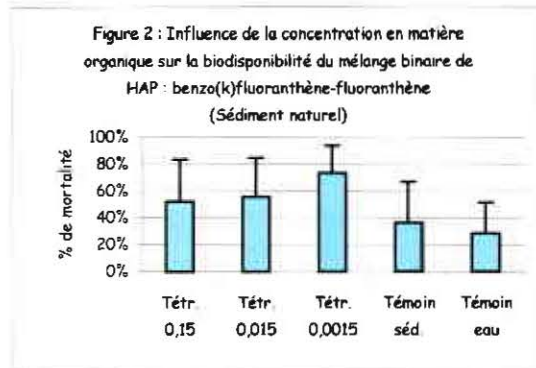
Matière organique et sédiment :

Biodisponibilité des HAP's dans le sédiment en présence de Tetramin (0,15 % ; 0,015 % ; 0,0015 % (Rapport 2000, 2001)

1. Biodisponibilité individuelle des HAP's



2. Biodisponibilité des mélanges binaires de HAP



3. Biodisponibilité du mélange ternaire de HAP

