

Doctorat Nouveau Régime
N° Ordre :



THESE

Présentée à

**L'Ecole Doctorale des Sciences de la Mer
Institut Universitaire Européen de la Mer**

En vue de l'obtention du grade de

Docteur de l'Université de Bretagne Occidentale

Spécialité : Chimie Marine

Emina MAMACA

Etude du comportement à court terme de produits chimiques flottants après leur déversement en mer et recherche d'un indicateur d'exposition biologique

Soutenue le 14 décembre 2006 à 14h30 devant la commission d'examen composé de :

Roger KANTIN, Chercheur IFREMER (Rapporteur)

Michel WARTEL, Professeur à l'Université de Lille 1 (Rapporteur)

Philippe GIAMARCHI, Professeur à l'Université de Bretagne Occidentale (Examineur)

Michel GIRIN, Directeur du CEDRE (Examineur)

Pierre Le CORRE, Professeur à l'Université de Bretagne Occidentale (Examineur)

Ricardo RISO, Maître de Conférence (HDR) à l'Université de Bretagne Occidentale (Examineur)

Hélène THOMAS-GUYON, Maître de Conférence à l'Université de La Rochelle (membre invité)

Je tiens à remercier,

Monsieur le Professeur Pierre Le Corre, Directeur de cette thèse, pour la confiance qu'il a placée dans mon travail.

Monsieur Ricardo Riso, Maître de Conférence pour sa grande disponibilité et ses multiples conseils dans l'encadrement de cette thèse.

Monsieur Michel Girin, Directeur du Cedre, qui m'a accueillie et soutenue pendant toutes ces années.

Monsieur Stéphane Le Floch, Docteur en chimie, sans qui ce sujet n'aurait pas vu le jour et pour la grande confiance qu'il m'a accordée.

Messieurs les membres du jury pour l'intérêt qu'ils ont porté à ce travail.

le personnel du Cedre, ingénieurs, techniciens et secrétaires qui, à un moment ou un autre, m'ont apporté leur aide ainsi que leur bonne humeur.

tous ceux qui ne sont pas cités ici mais qui m'ont accompagné dans ce travail tout au long de ces années.

L'aspect biologique des travaux a été réalisé au laboratoire d'Aquamiljo à Stavanger en Norvège. Je tiens à remercier toutes les personnes de ce laboratoire qui ont contribué à la réalisation de cette partie. J'exprime ma gratitude à Thierry Baussant, Chercheur en biologie, pour son ouverture d'esprit, son enthousiasme et son accueil au sein de son laboratoire.

PRINCIPALES ABREVIATIONS

AFNOR :	Association Française de NORmalisation
Cedre :	Centre de documentation de recherche et d'expérimentation sur les pollutions accidentelles des eaux
CEPPOL :	Commission d'Etudes Pratiques de lutte anti-POLLution
CROSS :	Centre Régional Opérationnel de Surveillance et de Sauvetage
DOP :	Diocylphtalate
EPA :	Environmental Protection Agency
F :	Flottant
FE :	Flottant Evaporant
Fp :	Flottant persistant
E :	Evaporant
GESAMP :	Groupe d'Experts des Nations Unies sur les Aspects Scientifique de la Pollution Marine
IMDG :	International Maritime Dangerous Goods
MARPOL :	MARine POLLution
NRRT :	Neutral Red Retention Time
OMI :	Organisation Maritime Internationale
PID :	Détecteur à photo-ionisation
POLREP :	POLLution REPort
SEBC :	Standardised European Behaviour Classification
SITREP :	SITuation REPort
SLAR :	Side Looking Airborne Radar
SOLAS :	Safety Of Life At Sea

SOMMAIRE

INTRODUCTION GENERALE	1
CHAPITRE 1 : CLASSIFICATION, COMPORTEMENT ET IMPACT SUR LE MILIEU MARIN DES SUBSTANCES CHIMIQUES FLOTTANTES	6
1. GÉNÉRALITÉS SUR LES SUBSTANCES CHIMIQUES	7
1.1. <i>Les différentes classifications</i>	7
1.2. <i>Etat des lieux du trafic</i>	17
1.3. <i>Accidentologie maritime et produits chimiques</i>	25
2. COMPORTEMENT DANS L'ENVIRONNEMENT MARIN DES SUBSTANCES CHIMIQUES FLOTTANTES : CAS DES HYDROCARBURES.....	29
2.1. <i>Devenir à court terme</i>	30
2.2. <i>Devenir à plus long terme</i>	32
2.3. <i>Prévision du comportement des produits chimiques en vue de l'intervention</i>	33
2.4. <i>Influence des paramètres environnementaux sur le comportement des produits chimiques, cas de la température et de la salinité</i>	40
3. IMPACT SUR L'ENVIRONNEMENT MARIN - BIOMARQUEUR	42
3.1. <i>Présentation des biomarqueurs</i>	44
3.2. <i>Mesure de la stabilité membranaire du lysosome par le rouge neutre (NRRT)</i>	45
3.3. <i>Présentation de l'espèce bioindicatrice retenue</i>	47
4. LES PRODUITS CHIMIQUES RETENUS POUR L'ÉTUDE	50
4.1. <i>Critères de sélection</i>	50
4.2. <i>Les caractéristiques des produits chimiques retenus pour l'étude</i>	50
CHAPITRE 2 : MATERIEL ET METHODES	53
1. LES TROIS ÉCHELLES EXPÉRIMENTALES.....	54
1.1. <i>Méthodologie au laboratoire</i>	54
<i>L'Ultra Turrax</i>	55
<i>Le Shake Flask</i>	55
<i>L'Élution sur Colonne</i>	55
1.2. <i>Etude du comportement des produits chimiques en cellules flottantes</i>	60
1.3. <i>Validation en mer ouverte : expérimentation RAPSODI II</i>	62
2. TECHNIQUES DE PRÉLÈVEMENT DES ÉCHANTILLONS	66
2.1. <i>Echantillonnage des nappes de produits ; la surface</i>	66
2.2. <i>Echantillonnage et analyse ; la colonne d'eau</i>	67
3. TECHNIQUES ANALYTIQUES UTILISÉES	68
3.1. <i>Détection et quantification des produits chimiques dans l'atmosphère</i>	68

3.2. <i>Caractérisation et analyse des échantillons de produits prélevés dans les nappes</i>	69
3.3. <i>Analyse des échantillons prélevés dans la colonne d'eau</i>	72

CHAPITRE 3 : CARACTERISATION DE LA DISPERSION NATURELLE DES PRODUITS CHIMIQUES AU LABORATOIRE..... 75

1. MISE AU POINT DES MÉTHODES ANALYTIQUES UTILISÉES : CAS DU NONYLPHÉNOL	76
1.1. <i>Dispersion naturelle maximale</i>	76
1.2. <i>Diffusion moléculaire ou dispersion naturelle minimale</i>	78
1.3. <i>Cinétique de dispersion naturelle</i>	78
1.4. <i>Discussion</i>	81
2. APPLICATION DE LA MÉTHODOLOGIE AUX PRODUITS CHIMIQUES RETENUS	84
2.1. <i>L'acide oléique</i>	84
2.2. <i>Le benzène</i>	89
2.3. <i>Le styrène</i>	91
3. CONCLUSION	93

CHAPITRE 4 : ESSAIS *IN SITU* EN CELLULES FLOTTANTES 94

1. COMPARTIMENT ATMOSPHÉRIQUE.....	95
1.1. <i>Le styrène</i>	95
1.2. <i>Le benzène</i>	97
2. COMPORTEMENT DES NAPPES EN SURFACE.....	99
2.1. <i>L'huile de ricin</i>	99
2.2. <i>L'huile de soja</i>	102
2.3. <i>L'acide oléique</i>	106
2.4. <i>Le dioctylphtalate</i>	110
2.5. <i>Le styrène</i>	113
2.6. <i>Le benzène</i>	115
2.7. <i>Discussion</i>	116
3. DISPERSION NATURELLE DANS LA COLONNE D'EAU	117
3.1. <i>L'huile de ricin</i>	117
3.2. <i>L'huile de soja</i>	118
3.3. <i>L'acide oléique</i>	119
3.4. <i>Le dioctylphtalate</i>	120
3.5. <i>Le styrène</i>	121
3.6. <i>Le benzène</i>	122
3.7. <i>Discussion</i>	123

CHAPITRE 5 : ESSAIS *IN SITU* EN MER OUVERTE – RAPSODI II – 124

1. EVOLUTION DES PRODUITS CHIMIQUES DANS L'ATMOSPHÈRE	125
2. VIEILLISSEMENT DES NAPPES EN SURFACE	125
2.1. <i>Dérives des nappes</i>	125

2.2. <i>Observations aériennes</i>	126
2.3. <i>Comportement physico-chimique des produits déversés</i>	130
3. DISPERSION NATURELLE DANS LA COLONNE D'EAU	134
3.1. <i>L'huile de ricin</i>	134
3.2. <i>L'huile de soja</i>	135
3.3. <i>L'acide oléique</i>	137
3.4. <i>Le dioctylphtalate</i>	138
3.5. <i>Discussion</i>	139
CHAPITRE 6 : IDENTIFICATION D'UN STRESS LIE A UNE POLLUTION ACCIDENTELLE A L'AIDE DU BIOMARQUEUR NRRT	143
CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES	156
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES	162
ANNEXES	175
<i>ANNEXE 1 : Bilan des principaux accidents maritimes mettant en jeu des substances chimiques</i>	176
<i>ANNEXE 2 : Bilan des principaux biomarqueurs</i>	192
<i>ANNEXE 3 : Protocoles expérimentaux des trois méthodes mis en place au laboratoire</i>	199
<i>ANNEXE 4 : publications, posters et proceedings</i>	204

INTRODUCTION GENERALE

L'accroissement du trafic par voie maritime des substances chimiques liquides justifie la nécessité de connaître leur comportement en cas de déversement accidentel en mer afin d'adapter au mieux et dans les plus brefs délais les stratégies de lutte. Il y a environ 2200 produits chimiques qui circulent sur les voies maritimes internationales (GESAMP, 1982, 1989). Le tonnage des produits chimiques transitant au large de la pointe bretonne est recensé par le CROSS CORSEN. Il a augmenté de 18% en 1996 et de 53% en 2000 par rapport au tonnage total transitant dans cette zone (CEPPOL, 2001). Cet accroissement du trafic maritime en substances chimiques engendre une augmentation du risque de déversements accidentels pouvant causer de graves dommages environnementaux dans les océans. A titre d'exemple, le *Cason* en 1987, transportant des produits toxiques, s'est échoué sur les côtes espagnoles (Marchand *et al.*, 1997). Sa cargaison a explosé, entraînant d'importantes émanations de gaz toxiques. Cet accident n'est pas un cas isolé, on peut citer également l'*Anna Broere* en mai 1988 contenant 200 tonnes (T) d'acrylonitrile et 118 T de dodécylbenzène, l'*Alessandro Primo* en 1991 contenant 550 T d'acrylonitrile et 2000 T de 1,2-dichloroéthane, le *Rosa M* en 1997 contenant 70 T de matière dangereuse, et plus récemment le *Ievoli Sun* (octobre 2000) avec 4000 T de styrène, 1000 T d'isopropanol et 1030 T de méthyléthylcétone ainsi que le *Bow Eagle* (août 2002) avec 200 T d'acétate d'éthyle. Les accidents impliquant des déversements accidentels d'huile végétale sont également nombreux. C'est ainsi qu'en 1978, la fuite répétée d'huile de colza dans le port de Vancouver s'est traduite par l'engluement de quantité d'oiseaux (Mc Kelvey *et al.*, 1980). En 1991, une importante pollution par huile de tournesol (1500 T), occasionnée par le naufrage du *Kimya*, fut responsable d'une surmortalité des moules (Mudge *et al.*, 1993, 1995). Enfin, en 1997, l'*Allegra*, transportant 900 T d'huile de palmiste, en a déversé 250 T le long des côtes de la Manche (Le Goff, 1998).

Afin de répertorier les produits chimiques, une classification basée sur leurs propriétés physico-chimiques a été proposée par des représentants de l'Union Européenne et élaborée dans le cadre de l'accord de Bonn (Bonn Agreement, 1994). Cette classification a permis de différencier quatre grands types de catégories de produits, à savoir ceux qui s'évaporent (E), ceux qui flottent (F), ceux qui se dissolvent (D) ou ceux qui coulent (S). Dans la réalité, la situation est plus complexe car des produits peuvent présenter des caractéristiques qui appartiennent à plus d'une catégorie.

L'importance d'une réponse adaptée pour chaque type de pollution a conduit l'OMI (Organisation Maritime Internationale), par l'intermédiaire d'un groupe de travail, le GESAMP

(Groupe d'Experts des Nations Unies sur les Aspects Scientifique de la Pollution Marine) (Wells *et al.*, 2001) à répertorier l'ensemble des substances chimiques selon la classification MARPOL 73/78 (IMO, 1997) basée sur les propriétés physico-chimiques des produits et leur niveau de toxicité. Cette réglementation, valable pour l'ensemble du trafic maritime mondial, est élaborée à partir de données bibliographiques provenant de tests expérimentaux effectués en eau douce (tests physico-chimiques, tests de toxicité). Le manque de connaissance sur le comportement des produits chimiques dans l'eau de mer a entraîné des problèmes lors des naufrages de chimiquiers. L'accident du chimiquier *Ievoli Sun* contenant 6000 T de produit chimique dont 4000 T de styrène en est un exemple. Un travail expérimental d'urgence a dû être développé afin de répondre à des questions aussi bien d'ordre chimique que d'ordre biologique :

- tout d'abord la solubilité du styrène dans l'eau de mer s'est révélée deux fois plus faible qu'en eau douce. Des remontées de styrène issues de l'épave ont été observées jusqu'en surface et ont posé des problèmes aussi bien en terme d'intervention qu'en terme de sécurité pour les navires sur zone ;
- puis le deuxième problème rencontré suite à cet accident est la toxicité du styrène sur les organismes marins. Des observations réalisées sur des tourteaux récupérés à proximité de l'épave ont montré que ces organismes présentaient une forte odeur de styrène. Ces observations ainsi que l'absence de données bibliographiques sur les organismes marins ont amené le Ministère de l'Aménagement du Territoire et de l'Environnement à demander au *Cedre* de réaliser des expérimentations de contamination / décontamination sur des organismes marins (moules, tourteaux, huîtres).

L'absence de connaissances sur le devenir des produits chimiques déversés en mer nous a conduit à mettre en œuvre cette étude. Seul les produits flottants ont été retenus. Trois raisons essentielles justifient ce choix :

- A la différence des produits qui se dissolvent, qui coulent ou qui s'évaporent, les produits flottants restent suffisamment de temps en surface pour présenter un réel danger vis à vis de la faune et de la flore. La mortalité importante d'oiseaux dans le port de Vancouver suite à un déversement accidentel d'huile de Colza en est un exemple (Mc Kelvey *et al.*, 1980).
- A la différence des produits qui s'évaporent ou qui se dissolvent, une part plus ou moins importante selon la nature du produit flottant considéré est susceptible de se disperser naturellement et d'entraîner une perturbation du milieu benthique. La surmortalité de

moules occasionnée par un déversement d'huile de tournesol lors du naufrage du Kimya (Mudge et al., 1993) est également un exemple.

- A la différence des produits qui s'évaporent, qui se dissolvent où qui coulent, le temps de résidence des produits flottants dans les eaux de surface est suffisamment important pour tenter de mettre en œuvre une procédure de récupération (opération de chalutage, pompage,...).

Le choix des produits flottants, objet de nos travaux, est effectué sur la base d'une étude bibliographique qui tient compte du transport des produits par voie maritime, et ceci au niveau national, européen et mondial. Les objectifs de ce travail sont :

- la mise en place d'une méthodologie au laboratoire permettant la caractérisation de la dispersion naturelle des produits chimiques sélectionnés,
- l'étude du comportement des produits chimiques à l'aide de l'outil cellules flottantes en rade de Brest,
- d'étudier le comportement de ces mêmes produits chimiques en mer ouverte,
- la définition d'un biomarqueur d'exposition afin d'évaluer le stress subi par un organisme marin suite à une pollution marine accidentelle par produits chimiques flottants.

La première partie de ce travail concerne l'étude bibliographique du transport par voie maritime des produits chimiques. Une sélection des produits chimiques les plus transportés est effectuée et s'oriente sur des produits flottants du type F (flottant), FE (flottant, évaporant), Fp (flottant, persistant) et E (évaporant). Une recherche documentaire approfondie sur les produits chimiques retenus est réalisée. Cette recherche s'oriente principalement sur les paramètres physico-chimiques qui sont étudiés (solubilité, densité, pression de vapeur). Cette étude bibliographique fait l'objet du premier chapitre.

Le deuxième chapitre présente le matériel et les méthodes utilisés. Les trois échelles expérimentales sont présentées dans cette partie. Les tests de l'ultra turrax, du shake flask et de l'élution sur colonne sont présentés dans la partie laboratoire. Les essais en rade de Brest et la campagne en mer sont également présentés ainsi que la caractérisation des produits par les appareils d'analyses (GC-MS, SF-UV, Purge and Trap, PID,...).

Le chapitre trois contribue à la caractérisation de la dispersion naturelle d'une substance chimique au laboratoire. Des essais sont effectués sur un intervalle de temps compris entre 90

minutes et 120 minutes et les résultats obtenus, à travers les trois tests laboratoire, sont présentés et discutés.

Le chapitre quatre présente la caractérisation du comportement des produits chimiques déversés en mer à l'aide de l'outil cellules flottantes en rade de Brest. Les essais sont réalisés sur une période de 96 heures (5 jours). La viscosité, la teneur en eau, la densité, l'émulsification directe et indirecte sont mesurées et discutées dans ce chapitre.

Le chapitre cinq porte sur la caractérisation du comportement des produits chimiques au cours d'une expérimentation en mer ouverte. Les essais sont réalisés sur une période de 12 heures. La viscosité, la teneur en eau, la densité, l'émulsification directe et indirecte sont mesurées et discutées dans cette partie.

Le chapitre six expose l'évaluation d'un stress subi par la moule suite à une pollution marine accidentelle à l'aide du biomarqueur NRRT (Neutral Red Retention Time). Cette expérimentation est effectuée sur une période de contamination par le styrène de 7 jours, le test du NRRT est effectuée sur l'haemolymph des moules. Ce travail a fait l'objet d'une publication dans la revue « Aquatic Toxicology » et l'article est présenté dans ce chapitre.

**CHAPITRE 1 : CLASSIFICATION,
COMPORTEMENT ET IMPACT SUR LE MILIEU
MARIN DES SUBSTANCES CHIMIQUES FLOTTANTES**

1. Généralités sur les substances chimiques

1.1. Les différentes classifications

En raison de la grande diversité des substances chimiques, plusieurs systèmes de classification sont développés au niveau de l'Union Européenne et au niveau mondial. Ils sont basés soit sur les caractéristiques physico-chimiques intrinsèques aux substances, soit sur leur comportement à court terme en cas de déversement accidentel, ou encore sur leur toxicité, écotoxicité...

1.1.1. Classification NST

La Nomenclature Statistique des Transports de Marchandises (NST) est une classification établie au niveau de l'Union Européenne et qui répartie les produits en 10 chapitres, 19 sections, 52 groupes et 177 positions (Isemar, 1999 ; Tableau 1.1). Cette nomenclature est notamment utilisée par les ports français pour décrire le trafic des produits qui y transitent. Il est donc, en théorie, possible de comparer les importations – exportations d'un port à l'autre.

Tableau 1.1 : Nomenclature Statistique des Transports de Marchandises (19 sections).

NST	Description
0	Produits agricoles et animaux vivants
1	denrées alimentaires et fourrages
2	Combustibles minéraux solides
3A	Produits pétroliers bruts
3B	Produits pétroliers raffinés
4A	Minerais ferreux et déchets pour la métallurgie
4B	Minerais et déchets non ferreux
5A	Produits métallurgiques ferreux
5B	Produits métallurgiques non ferreux
6A	Minéraux bruts ou manufacturés et matériaux de construction
6B	Matières premières pour l'industrie chimique
7	Engrais
8A	Produits chimiques de base
8B	Pâtes à papier et celluloses
8C	Autres produits chimiques
9A	Matériel de transport et matériel agricole
9B	Machines et articles métalliques
9C	Verre, faïence, porcelaine
9D	Autres articles manufacturés

1.1.2. Classification OMI

Au niveau international, l'Organisation Maritime Internationale (OMI) est le principal acteur dans l'élaboration de règles relatives aux navires transportant des matières dangereuses. Les critères de classification du comportement à court terme des substances chimiques déversées accidentellement ont été élaborés dans le cadre des travaux de l'Accord de Bonn et figurent dans le chapitre 25 du Manuel de lutte (Bonn Agreement, 1994). Sur la base de leur état physique (gaz, liquides, solides), et de leur caractéristiques physico-chimiques (densité, pression de vapeur et solubilité), les substances chimiques sont classées en 12 groupes (figure 1.1). L'OMI a adopté la Convention pour la prévention de la pollution par les navires (dite Convention MARPOL 73/78) qui couvre l'ensemble des pollutions susceptibles d'être engendrées depuis les navires et leur cargaison. La convention MARPOL 73/78 est divisée en six annexes, chacune consacrée à un type bien précis de pollution :

- Annexe I : pollution par les hydrocarbures,
- Annexe II : pollution par les substances liquides nocives transportées en vrac,
- Annexe III : pollution par les substances nuisibles transportées par mer en colis,
- Annexe IV : pollution par les eaux usées des navires,
- Annexe V : pollution par les ordures des navires,
- Annexe VI : pollution de l'atmosphère par les navires.

L'étude du comportement des substances chimiques déversées accidentellement en mer ne concerne que les substances liquides nocives transportées en vrac, c'est-à-dire les substances classées dans l'Annexe II en fonction des types de pollution qu'elles peuvent engendrer. Au total, quatre catégories de pollution sont identifiées en fonction des dangers décroissants qu'elles présentent pour le milieu marin :

Catégorie A : risques graves pour les ressources marines, la santé humaine et/ou les autres utilisations de la mer (ex : nonylphénol, crésol),

Catégorie B : risques pour les ressources marines, la santé humaine et/ou les autres utilisations de la mer (ex : styrène, éthylbenzène),

Catégorie C : risques faibles pour les ressources marines, la santé humaine et/ou les autres utilisations de la mer (ex : octanol, benzène),

Catégorie D : risques discernables pour les ressources marines, la santé humaine et/ou les autres utilisations de la mer (ex : huiles végétales, acide oléique).

Les produits qui n'entrent dans aucune de ces catégories sont considérés comme « hors catégorie », c'est-à-dire non nocifs pour l'environnement marin à l'instar du jus de pomme.

Le système de classement MARPOL est basé sur la caractérisation des profils de dangers des substances chimiques vis-à-vis de l'homme et de l'environnement marin, dont la méthodologie et l'évaluation sont réalisées par un groupe de travail du GESAMP (Groupe d'experts des Nations-Unies sur les aspects scientifiques de la pollution marine). Ce groupe de travail, intitulé « Evaluation of the hazards of harmful substances » (EHS), travaille de manière permanente et indépendante depuis 1974 pour le compte de l'OMI. L'établissement d'un profil de danger d'une substance chimique sert à divers aspects réglementaires (constructions des navires) et opérationnels (rejets opérationnels, déversements accidentels) (Wells *et al.*, 1999).

Plusieurs auteurs critiquent cette classification notamment en stipulant que des produits chimiques classés D (très faiblement nocif) peuvent avoir des impacts importants sur l'environnement marin en cas de déversement accidentel (Crump-Wiesner et Jennings, 1975). Par exemple, les huiles végétales et animales, qui représentent une grande quantité de produits solides et liquides transportés par les navires, sont classées en catégorie D de l'annexe II. Or, le dépôt d'huile sur les plumes des oiseaux et la fourrure des mammifères peut entraîner des engluements puis des noyades, ainsi qu'une hypothermie qui va augmenter la vulnérabilité des espèces touchées (Mc Kelvey *et al.*, 1980 ; Anonyme, 1997a, 1997b). Une pollution par une huile végétale ou animale peut aussi aboutir à un appauvrissement du milieu en oxygène, ce qui entraîne la mort de poissons et d'autres organismes aquatiques par asphyxie (Mudge *et al.*, 1993, 1995). Ainsi, il est primordial de ne pas se focaliser uniquement sur des produits considérés comme étant dangereux : même des déversements de produits chimiques classés D selon l'Annexe II de la convention MARPOL 73/78 peuvent avoir des conséquences très graves.

1.1.3. Classification en tant que « polluant marin »

Dans le cadre de la Convention internationale MARPOL 73/78, le groupe d'experts du GESAMP (the joint Group of Experts on the Scientific Aspects of Marine environmental Protection) a établi un profil de danger pour les substances liquides transportées en vrac par voie maritime. Ce profil de danger prend en compte quatre types de préoccupations en cas de déversements accidentels en mer :

- Dommage aux ressources marines,
- Dangers pour la santé humaine,
- Réduction de l'agrément des sites,
- Interférences avec d'autres usagers de la mer.

Ceci a conduit à définir pour chaque substance, un profil de risque selon cinq catégories d'effet :

- A : Bioaccumulation et biodégradation,
- B : Dommages causés aux ressources vivantes : toxicité aquatique aiguë et chronique,
- C : Risque pour la santé humaine : ingestion, inhalation et contact cutané,
- D : Irritation, corrosion et effets à long terme sur la santé,
- E : Interférence avec les autres usagers de la mer.

A partir de ces différentes catégories, il est possible de classer les substances chimiques transportées en colis, donc répertoriées dans le code IMDG, comme « polluant marin » selon deux groupes : P (polluant marin) et PP (polluant marin grave). La différenciation entre P et PP se fait selon le profil de risque du GESAMP (Tableau 1.3).

Tableau 1.3 : Définition de la notion de « polluant marin » selon le code IMDG à partir des profils de risques du GESAMP.

PROFIL DE RISQUE DU GESAMP		CODE IMDG
A	B	
+	-	P "polluant marin"
-	4	
T	-	
Z	-	
+	4	PP "polluant marin grave"
-	4 (< 0,01 ppm)	

1.1.4. Classification en fonction du risque physique

Le système de classification élaboré dans le cadre de la Convention internationale de 1974 pour la sauvegarde de la vie humaine en mer (SOLAS 74), et expliqué dans le code IMDG (IMO, 2000), a pour objectif d'assurer la sécurité et la protection des équipages durant le transport et la manipulation des substances transportées. Ce système de classification répartit les produits chimiques en neuf classes de risque, elles-mêmes découpées en sous-classes (Tableau 1.2). Il permet de procéder à une première analyse de la situation en cas de

déversements de substances dangereuses. Les risques définis par ce système de classification sont la combustion, l'explosion, la toxicité, la réactivité, la radioactivité et la corrosion.

Tableau 1.2 : Les 9 classes risques du code IMDG (IMO, 2000).

Classe 1	Matières et objets explosifs
Classe 1.1	Matières et objets présentant un risque d'explosion en masse
Classe 1.2	Matières et objets présentant un risque de projection, sans risque d'explosion en masse
Classe 1.3	Matières et objets présentant un risque d'incendie avec un risque léger de souffle, ou de projection, ou des deux, sans risque d'explosion en masse
Classe 1.4	Matières et objets ne présentant pas de risques notables
Classe 1.5	Matières très peu sensibles présentant un risque d'explosion en masse
Classe 2	Gaz comprimés, liquéfiés ou dissous sous pression
Classe 2.1	Gaz inflammables
Classe 2.2	Gaz ininflammables, non toxiques
Classe 2.3	Gaz toxiques
Classe 3	Matières liquides inflammables
Classe 3.1	Groupe à point éclair faible (point éclair < -18°C, en creuset fermé)
Classe 3.2	Groupe à point éclair moyen (point éclair = ou > -18°C et < 23°C, en creuset fermé)
Classe 3.3	Groupe à point éclair élevé (point éclair = ou > 23°C mais ne dépassant pas 61°C, en creuset fermé)
Classe 4	Matières solides inflammables
Classe 4.1	Matières solides inflammables
Classe 4.2	Matières spontanément inflammables
Classe 4.3	Matières qui au contact de l'eau émettent des gaz inflammables
Classe 5	Matières comburantes et peroxydes organiques
Classe 5.1	Matières comburantes
Classe 5.2	Peroxydes organiques
Classe 6	Matières toxiques et matières infectieuses
Classe 6.1	Matières toxiques
Classe 6.2	Matières infectieuses
Classe 7	Matières radioactives
Classe 8	Matières corrosives
Classe 9	Matières et objets dangereux divers

1.1.5. Classification en fonction de la réactivité

Certaines substances chimiques peuvent être très réactives. La réactivité caractérise la capacité d'une substance à se modifier chimiquement soit par réaction d'addition, de substitution ou de décomposition. Les réactions chimiques peuvent être endothermiques ou exothermiques.

Dans le cas d'accidents concernant le transport de substances chimiques dangereuses, les risques liés à la réactivité des substances concernent le navire et son équipage ainsi que l'environnement immédiat. Il est donc important de pouvoir évaluer la réactivité des substances transportées pour définir le mode d'intervention envisageable en cas de déversement accidentel dans les eaux.

La réactivité des substances peut être définie à partir des réactions d'un produit donné avec :

- L'oxygène de l'air (dioxygène),
- L'eau,
- Lui-même,
- Les autres substances chimiques se trouvant à proximité.

Réaction avec l'oxygène de l'air (dioxygène)

La combustion est la réaction d'une substance avec l'oxygène conduisant à un dégagement de chaleur et quelque fois à une explosion. Les différences entre feu et explosion tiennent à l'intensité des réactions d'oxydation. Pour débiter une combustion, une substance doit être enflammée. Ainsi, un incendie et une explosion dépendent du rapport stoechiométrique entre la substance et l'air (dioxygène) et de la force de la source d'inflammation. Les sources d'inflammation sont variées (feu, friction, chaleur, étincelles, radiations, bruit). Les navires, les aéronefs représentent des sources potentielles d'inflammation et, lorsqu'un gaz liquéfié s'échappe, le risque d'inflammation est grand (Marchand, 1997).

Il est à présent connu que de nombreux produits chimiques possèdent des groupes fonctionnels explosifs. Nombre d'entre eux sont des composés azotés ou des esters azotés. D'autres composés possédant des groupes peroxydes sont instables, explosifs compte tenu de la réaction des peroxydes avec l'oxygène de l'air. Certaines substances (éther di-isopropylique, chlorure de vinylidène, acétylène di-vinylque, amides de sodium et de potassium...) s'oxydent facilement dans l'air pour former des peroxydes explosifs. C'est pour cette raison que les substances formant des peroxydes doivent être transportées avec des antioxydants afin d'inhiber la formation de ces composés.

Lorsqu'une substance s'échappe dans l'atmosphère à l'état de gaz ou de vapeur, l'explosion peut avoir lieu si la concentration de la substance est comprise entre les limites inférieure et supérieure d'explosion (LIE et LSE). Il n'y a pas danger d'explosion ou d'incendie si la concentration maximale de la substance dans le nuage gazeux est en dessous de la limite inférieure d'explosion (LIE) ; la quantité de chaleur développée est alors trop faible pour enflammer la partie gazeuse voisine. La réaction s'arrête d'elle-même du fait d'un mélange réactif insuffisant. A l'opposé, au dessus de la limite supérieure d'explosion (LSE), la concentration d'oxygène est trop faible pour maintenir la combustion de la substance.

Afin d'évaluer les risques d'inflammation d'une substance volatile, le critère utilisé est celui de son point éclair. Le point éclair d'un liquide combustible est défini comme étant la température la plus faible (°C) à partir de laquelle la phase vapeur qui s'échappe dans

l'atmosphère forme un mélange inflammable (Ramade, 1999). L'OMI utilise ce critère pour la classification du transport par voie maritime des substances liquides inflammables (Tableau 1.2). Trois sous-groupes sont définis sur la base de leur point éclair : -18°C , 23°C et 61°C (Creuset clos). Les substances appartenant au premier sous-groupe (point éclair $< -18^{\circ}\text{C}$, OMI 3.1) représentent le groupe le plus dangereux sur le plan du risque d'incendie, tandis que les substances ayant un point éclair supérieur à 61°C ne sont pas considérées comme inflammables (OMI 3.3).

Réaction avec l'eau

Certaines substances réagissent avec l'eau, soit par réaction d'hydratation, soit par réaction d'hydrolyse. Ce type de réaction prend toute son importance en cas de déversement accidentel dans l'eau et dans le fait d'utiliser la plupart du temps de l'eau pour lutter contre un incendie à bord d'un navire. Les produits résultant de ces réactions peuvent s'enflammer ou exploser, être toxiques et avoir des effets corrosifs sur les matériaux. Les réactions avec l'eau sont nombreuses : des réactions de décomposition sous l'effet de l'humidité tel le cyanure de sodium pour relâcher de l'acide cyanhydrique qui est un gaz toxique ou encore l'hydrolyse de l'anhydride acétique en acide acétique. Certaines de ces réactions sont explosives (exemple : acide chlorosulfonique). D'autres produits de réaction sont corrosifs : le chlorure ferrique solide (FeCl_3) réagit avec l'eau (réaction exothermique) en libérant des vapeurs d'acide chlorhydrique (HCl). Les substances de la classe OMI 4.3 (« matières dangereuses en présence d'humidité ») émettent, au contact de l'eau, des gaz inflammables. C'est le cas des alcalis comme le potassium et le lithium, des composés du magnésium ou encore le sodium et le carbure de calcium.

Les réactions de combinaison, comme l'hydratation, sont généralement exothermiques. L'oléum ($\text{H}_2\text{SO}_4 + \text{SO}_3$) réagit violemment au contact de l'eau : il se dissout en libérant une grande quantité de chaleur. Le dichlore forme des hydrates ($\text{Cl}_2\text{H}_2\text{O}$) et une solution corrosive d'acide chlorhydrique (HCl) et d'acide hypochloreux (HClO) dissous dans l'eau. Il faut aussi noter que certains produits sont très réactifs vis-à-vis de l'humidité de l'air : ils peuvent alors s'enflammer spontanément, c'est le cas du phosphore blanc, des alcalis, de certains composés organométalliques et des hydrures métalliques.

Réaction du produit avec lui-même

La polymérisation est la réaction d'addition de petites molécules (monomères) pour former des molécules plus grandes (polymères, macromolécules), telles que du polystyrène,

polyisoprène, polyacrylonitrile. La réaction de polymérisation peut devenir rapidement incontrôlable. Pour éviter ce type de réactions durant le transport et le stockage, des inhibiteurs à la polymérisation sont ajoutés à de faibles concentrations. C'est le cas pour une vingtaine de substances chimiques telles que le styrène, l'acrylonitrile et les composés acrylates. D'autres substances chimiques se décomposent à température ambiante sous l'effet de la lumière ou d'un léger réchauffement. Au-dessus d'une certaine température, certaines substances peuvent se décomposer, c'est le cas des substances appartenant à la classification OMI 4.1 ("solides inflammables") et OMI 5.2 ("peroxydes organiques").

Réaction avec d'autres substances

Le contact d'un produit chimique avec un autre, à l'occasion d'un accident, peut conduire à des réactions chimiques violentes. De telles réactions peuvent générer des incendies ou des explosions, ou produire des gaz toxiques dangereux pour le navire, l'équipage et les équipes d'intervention. L'OMI, sur la base des réactivités entre produits, a proposé des tables de séparations : les produits non compatibles entre eux doivent être stockés séparément. Le nombre de combinaisons de produits chimiques qui posent des problèmes d'incompatibilité est très grand.

1.1.6. Classification en fonction des paramètres physico-chimiques des produits

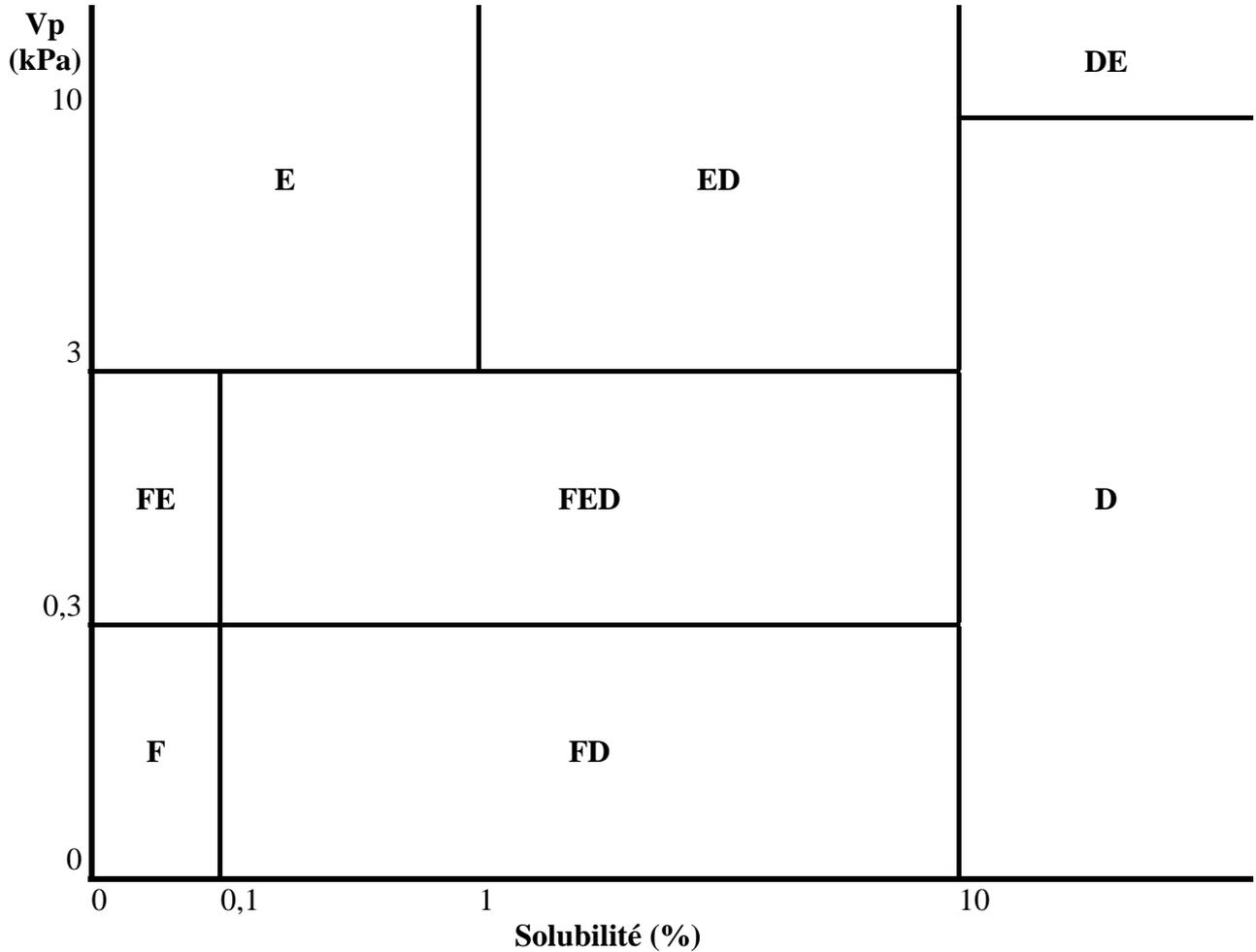
Les produits chimiques peuvent également être classés en tenant compte de différents paramètres physico-chimiques qui décrivent leur affinité vis-à-vis de l'air, la surface de l'eau, la colonne d'eau ou le fond. Dans un contexte accidentel, cette classification a la particularité de prévoir le comportement à court terme du produit déversé. Les critères pour caractériser ce comportement physico-chimique des produits déversés sont issus du système européen de classification élaboré dans le cadre de l'Accord de Bonn (Bonn Agreement, 1994). Le principe essentiel de ce système consiste à caractériser les substances chimiques déversées en vrac selon qu'elles s'évaporent (E), flottent (F), se dissolvent (D) ou coulent (S). A partir de cette caractérisation de base et, se fondant sur d'autres données concernant leurs propriétés physiques, les substances chimiques sont classées en douze groupes (Tableau 1.4).

Tableau 1.4 : Les douze groupes de substances chimiques réparties selon leurs propriétés (GESAMP, 2002).

<i>Groupe principal</i>		<i>Sous-groupe</i>	
G	gaz	GD	Gaz / qui se Dissout
E	qui s'évapore	ED	Évaporateur / qui se Dissout
F	qui flotte	FE	Flotteur / Évaporateur
		FD	Flotteur / qui se Dissout
		FED	Flotteur / Évaporateur / qui se Dissout
D	qui se dissous	DE	qui se Dissous / Évaporateur
S	qui coule	SD	qui Coule/ qui se Dissout

Les limites de chacun de ces groupes et sous-groupes sont présentées sur la figure 1.1. Dernièrement, une autre catégorie est apparue : celle des produits considérés comme étant des flottants persistants (Fp), c'est-à-dire l'ensemble des substances chimiques dont la viscosité est supérieure ou égale à 10 cSt (1centistoke=1mm²/s).

LIQUIDE d < 1,03



LIQUIDE d > 1,03

S	SD	D ou DE (si p.v. >10kPa)
0	0,1	5

GAZ p.v. > 101,3 kPa à 20°C

G	GD	
0	10	

SOLIDE

d < 1,03	F	FD	D
d > 1,03	0	10 %	100 %
	S	SD	D
	Solubilité (%)		

Figure 1.1 : Comportement des substances chimiques en cas de déversement accidentel selon leur état et leurs propriétés physiques (GESAMP, 2002) ; F(Flottant); D(Soluble); E(Evaporant); S(Coulant) ; Vp = pression de vapeur.1.2.

1.2. Etat des lieux du trafic

1.2.1. Les principaux modes de transport des produits chimiques

Le transport maritime des produits chimiques peut se faire par différents types de navires selon que le produit concerné se trouve sous forme gazeuse, liquide ou solide et suivant le tonnage transporté.

1.2.1.1. *Le transport sous forme conditionnée*

Le transport sous forme conditionnée comprend l'ensemble des produits qui sont transportés sous forme de colis divers (fûts, conteneurs, remorques citernes...). Les navires qui assurent ce type de transport ne sont pas spécialisés dans le transport des substances chimiques, et ils peuvent être des cargos conventionnels, des porte-conteneurs ou des rouliers (Figure 1.2). Le chargement des produits à bord doit donc être fonction des caractéristiques du produit, de son conditionnement, des autres produits transportés et de l'incompatibilité de ces matières entre elles.



Figure 1.2 : Exemples de porte-conteneurs.

1.2.1.2. *Le transport en vrac de produits solides*

Le transport du vrac solide est assuré par des navires appelés vraquiers. Ces navires ont de larges écoutilles et de vastes cales sans entreponts (Figure 1.3) et ils assurent le transport d'une large gamme de produits qui va des céréales (blé, maïs...) aux matériaux conventionnels de construction (produits sidérurgiques, bois...).



Figure 1.3 : Exemples de vraquiers.

1.2.1.3. *Le transport en vrac de produits liquides ou gazeux*

Ce type de transport est assuré par des navires citernes spécialisés tels que les chimiquiers qui sont soumis à des réglementations très strictes en terme de construction navale (Recueils IBC (*IMO*, 1998) et IGC (*IMO*, 1993)). Ils disposent de structures protégées afin de résister aux agressions des substances transportées et ils se répartissent dans quatre catégories :

- les navires adaptés aux transports des produits pétroliers raffinés ou des produits chimiques ou de plusieurs produits séparés (Figure 1.4) ;
- les navires citernes parcellaires qui forment la plus grande partie des transporteurs de produits chimiques (TPC). Ils peuvent transporter autant de produits dangereux qu'ils ont de cuves à bord ;
- les navires citernes spécialisés dans le transport d'un seul produit : les soufriers, les asphaltiers, les transporteurs d'huile de graissage... ;
- les gaziers : le gaz est transporté à l'état liquide et maintenu dans cet état en jouant sur la pression et la réfrigération.



Figure 1.4 : Exemples de chimiquiers.

1.2.2. Le trafic maritime des produits chimiques

Un état des lieux succinct du trafic maritime des substances chimiques en terme de fréquence et en terme de tonnage est réalisé afin d'optimiser le choix des substances pour notre étude.

Cet état des lieux est réalisé à l'aide d'une enquête adressée aux ports les plus représentatifs du trafic maritime au niveau national mais aussi européen et mondial.

1.2.2.1. Au niveau mondial

En 1999, la quantité de substances nocives et potentiellement dangereuses transportées par voie maritime s'élevait à 2 284 millions de tonnes par an (BP Amoco, 1999). Ces substances peuvent être réparties en cinq catégories (Figure 1.5) : les produits pétroliers, les produits issus de la chimie du pétrole (naphtalène, gasoil...), les produits chimiques (styrène, benzène...) qui représentent 4% des quantités transportées, les gaz naturels liquéfiés (LNG) et les gaz de pétrole liquéfiés (LPG).

Sous l'appellation « produits chimiques » sont regroupées quatre catégories de produits : les huiles végétales et animales, les composés organiques (méthanol, éthylène glycol...), les composés inorganiques qui correspondent aux acides et aux bases (acide sulfurique, acide phosphorique, soude caustique...), et la catégorie « autre » qui contient notamment l'ensemble des alcools non toxiques pour l'être humain.

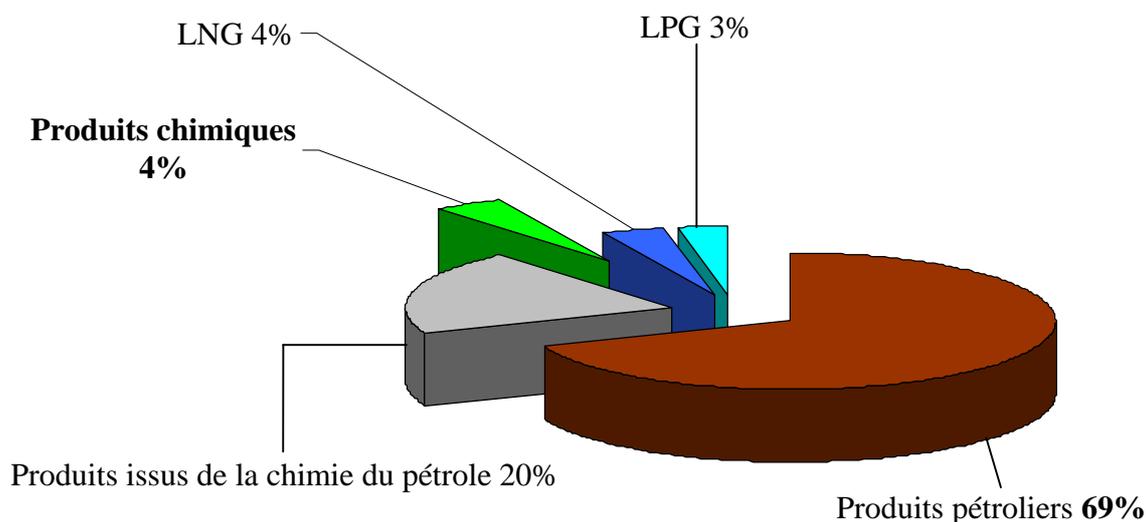


Figure 1.5 : Répartition des substances nocives et potentiellement dangereuses transportées par voie maritime au cours de l'année 1999 (BP Amoco, 1999).

Le commerce mondial par voie maritime, toutes marchandises confondues, s'est accru ces dernières années, passant de +1,3% à +2% en tonnage en une année. Cette augmentation est le résultat d'une augmentation du rythme de croissance de la quasi totalité des pays

industrialisés. A titre d'exemples, la croissance de l'économie américaine a été estimée à 4,5% et celle de l'Europe Occidentale a atteint ou dépassé un taux de 3%.

En terme de sécurité maritime, cet accroissement du trafic entraîne dans la même proportion une augmentation du risque de pollution de l'environnement marin, pour ce qui concerne la fréquence des accidents (collision, échouage, naufrage) et les volumes déversés.

1.2.2.2. Au niveau européen

Ces dernières années, le trafic maritime intra union européenne, toutes matières confondues, a été marqué par une tendance à la hausse du tonnage transporté dans la plupart des pays. En comparant les données de 1990 à celles de 1996, l'Espagne, la Suède et la Finlande se distinguent par une augmentation d'environ 20% ; l'Italie et le Royaume-Uni affichent une hausse de quelque 10%. Globalement, parmi les états membres déclarants, le Royaume-Uni, les Pays-Bas et la Finlande affichent les mouvements les plus nombreux, près de quatre fois le trafic enregistré dans des pays comme l'Irlande ou la Belgique.

En ce qui concerne la nature des différents types de fret traités dans chaque état membre, les marchandises en vrac occupent une place importante : les marchandises en vrac sec et liquide confondu représentent entre 51% (Belgique) et 86% (Espagne) du volume total traité. Parmi les autres catégories de fret, les unités roll on / roll off (RO-RO) ont un poids considérable dans les pays caractérisés par un important service de "ferries" comme le Danemark (35%), la Suède (25%), l'Irlande (18%) ou le Royaume-Uni (13%). Les grands porte-conteneurs détiennent la part la plus élevée en Belgique (19%) suivi des Pays-Bas (14%) et de l'Irlande (13%). Dans le trafic maritime intra union européenne, le type de navire le plus impliqué dans le trafic appartient au groupe des navires « transporteur non spécialisé », suivi des vraquiers.

1.2.2.3. Au niveau français

Dans le cadre de l'Accord de Bonn de 1983, qui concerne la coopération en matière de lutte contre la pollution en Mer du Nord par les hydrocarbures et autres substances chimiques dangereuses, un système normalisé de Rapports sur les Pollutions, dénommé POLREP, a été institué. Ce système permet aux autorités chargées de la lutte contre ces pollutions de pouvoir échanger des informations en cas de pollutions en mer ou en présence de menace de pollution de ce type (rapports SITREP : SITUation REPort). Les POLREP permettent de situer l'intensité des infractions de pollution sur les axes de navigation. Cette procédure a ensuite été établie au niveau national, pour l'ensemble des eaux marines sous juridiction française. A

partir de la carte de localisation de l'ensemble des POLREP et SITREP reçus en 2000 (Figure 1.6) et, même si cette carte de répartition n'est pas nécessairement représentative de la réalité de tous ces événements (elle dépend des zones survolées par les avions des Douanes Françaises), elle donne cependant des informations sur les axes maritimes les plus fréquentés le long de nos côtes. L'étude de cette carte met en évidence certaines zones à risque comme le rail d'Ouessant, le Golfe de Gascogne et la façade Est de la Corse. La côte Corse semble plus particulièrement exposée aux pollutions marines peut-être du fait de l'activité industrielle de la Ligurie (Italie). En effet, les exportations et importations de la Lombardie (Milan) et du Piémont (Turin) se font majoritairement par les ports de Gène et de La Spézia impliquant un trafic maritime conséquent en mer de Ligurie.

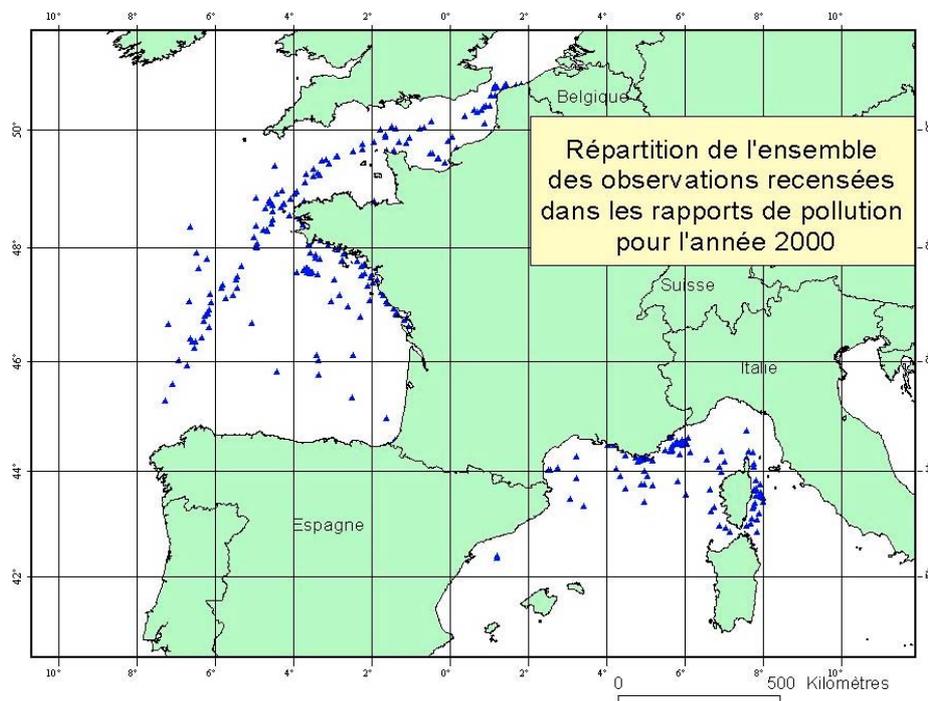


Figure 1.6 : Répartition de l'ensemble des observations recensées pour l'année 2000 (POLREP et SITREP confirmés ou non) (Cedre, 2001b).

Afin d'analyser plus finement le trafic en Manche, et notamment afin d'identifier les substances qui y circulent, les données du CROSS (Centre Régional Opérationnel de Surveillance et de Sauvetage) Corsen sont traitées. En effet, les navires transitant dans les dispositifs de séparation de trafic sont soumis à une procédure de déclaration obligatoire de leurs cargaisons. Cependant, si cette procédure est de mieux en mieux respectée dans le cas des matières dangereuses transportées de façon significative, des matières dangereuses transportées en complément des cargaisons principales sont encore "dissimulées" dans le trafic. En ce qui concerne l'évolution du nombre de cargaisons qui transitent dans les zones

« Manche Est », « Manche Ouest » et « Ouest Bretagne », il apparaît clairement que le nombre global de cargaisons ne cesse de diminuer, à l'exception des engrais dont le nombre de transports a triplé entre 1999 et 2001 (Cedre, 2001).

Cette évolution globale recouvre des disparités sensibles d'une catégorie à l'autre. La diminution du nombre des cargaisons d'hydrocarbures n'a pas été compensée par une augmentation des volumes transportés. Il en résulte une diminution sensible des quantités d'hydrocarbures qui transitent par voie maritime. A l'opposé, le nombre de cargaisons de produits chimiques a diminué entre 1996 et 2001 (passant de 2650 à 2214), alors que les quantités transportées ont été multipliées par un facteur 1,5 (passant de 17 à pratiquement 27 millions de tonnes par an) ce qui représente une augmentation d'environ 59% en cinq ans (Figure 1.7). Cette augmentation du tonnage des produits chimiques est d'autant plus nette lorsqu'elle est exprimée en pourcentage du trafic total des substances transitant en Manche.

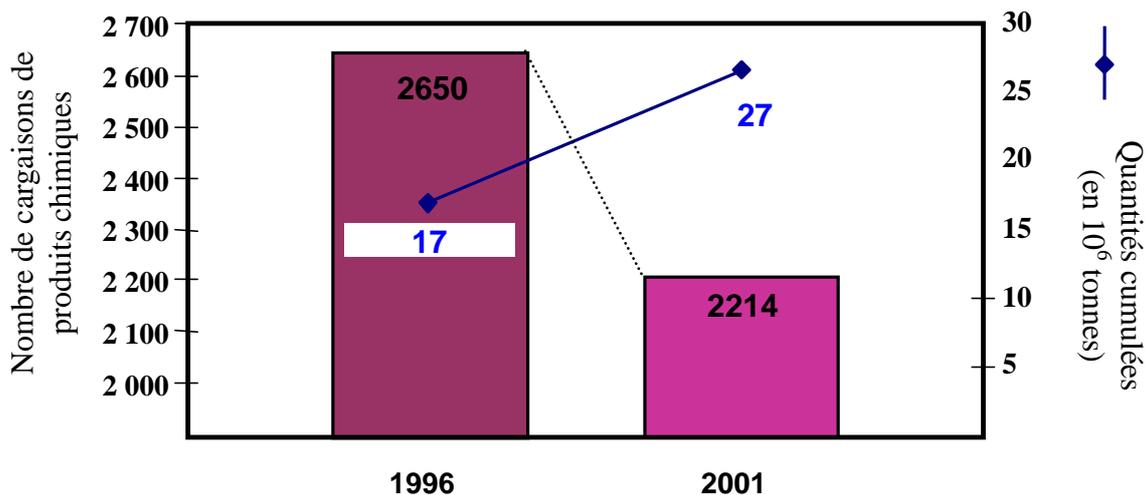


Figure 1.7 : Evolution du trafic maritime en Manche entre 1996 et 2001 (Cedre, 2001).

En conclusion, il apparaît clairement que, si le nombre de cargaisons de produits chimiques décroît depuis quelques années, le tonnage transporté a augmenté. En procédant à une analyse plus détaillée des informations fournies par la CEPPOL, il apparaît qu'au cours de ces dix dernières années lorsqu'on prend en compte uniquement les produits déclarés, pas moins de 16 produits chimiques ont transité en Manche (CEPPOL, 2001). Les plus rencontrés (en terme de fréquence et de tonnage cumulés sur dix ans) sont le benzène, les huiles végétales et animales (V&A), les oléfines (ou alcènes), le xylène, les alcools et le styrène (Figure 1.8). Le trafic portuaire du port de Rouen, Dunkerque, Nantes Saint-Nazaire ainsi que celui des ports

autonome de Bordeaux, Marseille, Paris et le Havre ont été pris en compte. Les résultats obtenus sont en adéquation avec les données de la CEPPOL.

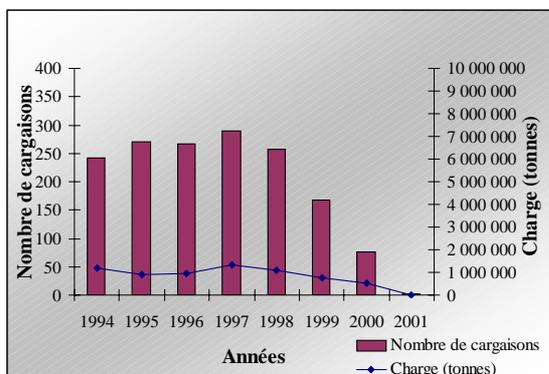


Figure 1.8.a : Evolution du trafic en benzène.

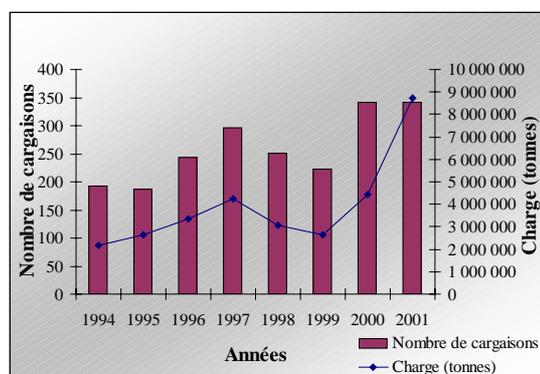


Figure 1.8.b : Evolution du trafic en huiles (V&A).

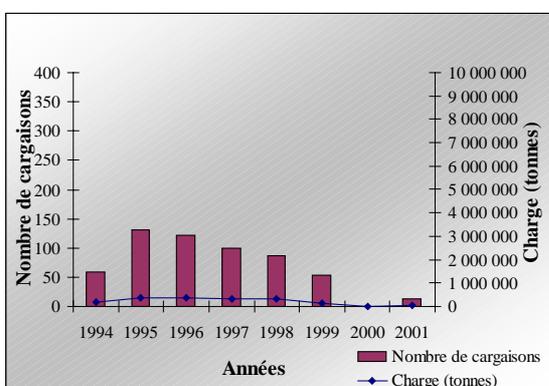


Figure 1.8.c : Evolution du trafic en xylène.

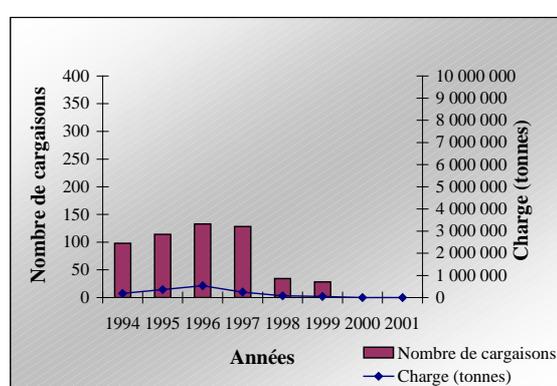


Figure 1.8.d : Evolution du trafic en oléfines.

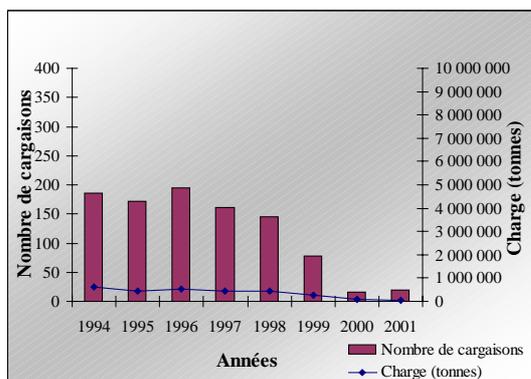


Figure 1.8.e : Evolution du trafic en styrène.

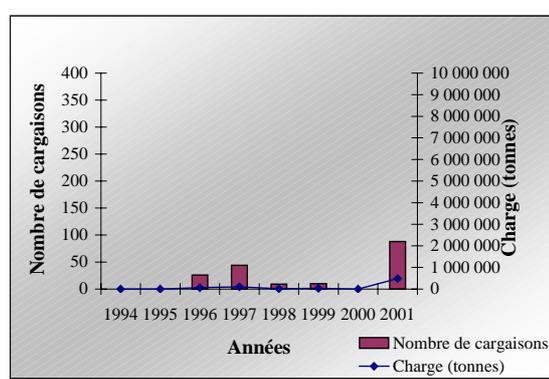


Figure 1.8.f : Evolution du trafic en alcools.

Figure 1.8 : Evolution du trafic maritime en Manche entre 1994 et 2001 (source : CEPPOL).

Cependant, ces données sont à prendre avec précaution pour plusieurs raisons :

- aucune vérification n'est réalisée directement à bord des navires,
- certains produits sont référencés sous un nom commercial et n'apparaissent donc pas en tant que produits chimiques,
- certains produits chimiques transportés en faible quantité et sous forme conteneurisée ne sont pas mentionnés.

Les figures 1.8 (a-f) montrent que ce sont les huiles végétales et animales qui sont les plus rencontrées en Manche (aussi bien en nombre de cargaisons qu'en tonnage). En effet, leur tonnage comme leur nombre de cargaisons augmentent, passant de 192 cargaisons et 2,2 millions de tonnes d'huiles transportées en 1994 à 341 cargaisons et 8,2 millions tonnes en 2001. Il en est de même pour les alcools alors que le trafic des autres produits cités ne cesse de baisser et ce malgré l'augmentation du trafic global des produits chimiques. Le xylène, par exemple, n'a pas été répertorié en 2000.

De plus, il faut préciser que cette analyse ne prend pas en compte le type de conditionnement (conteneurs, fûts, vraciers...) puisque seules les substances à IMO identifiées sont répertoriées. Il serait intéressant de faire apparaître ce paramètre puisque les risques encourus en sont directement fonction (un chimiquier représente un risque potentiellement plus important qu'un porte-conteneurs transportant des produits chimiques conteneurisés). Les risques sont également différents en fonction de la nature du produit transporté. Dans les ports français, une exploitation rapide des résultats de l'enquête montre que les tonnages les plus importants (entrée et sortie) sont relevés pour les acides liquides, la pâte à papier, la soude caustique et le méthanol. De plus, les produits relevés sont différents d'un port à l'autre et sont directement fonction des industries implantées à proximité du port. Ainsi, la majorité des produits chimiques transitant dans le port de Saint-Malo (soude caustique et acide phosphorique) sont destinés à une usine d'engrais située sur la zone portuaire.

Il faut toutefois noter qu'il est difficile de connaître avec précision la nature des produits embarqués et débarqués dans les ports. En effet, si les ports français utilisent la classification NST, ils ne le font que de façon limitée. La plupart du temps, seules les neuf catégories principales sont mentionnées, et il est difficile d'obtenir le détail des sous-catégories.

1.3. Accidentologie maritime et produits chimiques

Le développement du transport maritime au cours du siècle passé a engendré une augmentation du nombre et du type de navires sur nos océans : porte-conteneurs, cargos, chimiquiers, gaziers, vraquiers, ferries... La diversité des navires et des modes de conditionnement ont rendu nécessaire une étude a posteriori sur les multiples accidents afin de déterminer la catégorie de navires le plus souvent impliquée dans des pollutions chimiques, d'identifier le type de déversement, et ainsi rechercher si une ou plusieurs substances sont plus fréquemment déversées que les autres, auquel cas elles seront pré-sélectionnées pour que leur comportement soit évalué expérimentalement.

1.3.1. Nature des accidents liés au transport maritime des produits chimiques

Les accidents maritimes sont de différentes natures :

- Les collisions comme l'accident en Manche le 1^{er} octobre 1997 qui provoqua l'éventrement de l'*Allegra* entraînant le déversement de 900 T d'huile de palmiste (Bucas et Saliot, 2002) ;
- Les naufrages comme l'exemple récent du *Ievoli Sun* au large de Cherbourg en octobre 2000 laissant échapper de ses cuves 4000 T de styrène (Law *et al.*, 2003 ; Le Floch et Merlin, 2005) ;
- Les accidents mineurs qui n'occasionnent pas de naufrage comme le navire *Sinbad* en décembre 1979 perdant une grande partie de sa cargaison de cylindres de dichlore à l'entrée du port d'Amsterdam ;
- Les accidents portuaires comme dans l'entrée du port de Zhanjiang au sud de la Chine le 9 mars 1995 entre un caboteur et le chimiquier le *Chung Mu N°1* transportant du styrène monomère. La collision a sérieusement endommagé une citerne contenant 310 tonnes du produit.

Tous ces scénarios ont des conséquences très variables. Le facteur le plus déterminant en terme de risque pour l'homme et pour l'environnement est le produit chimique en lui-même. Le risque ne sera pas le même si la substance est corrosive (les acides, les produits chlorés), toxique (des solvants type benzène), ou encore inflammable ou explosive. Il apparaît donc qu'en cas d'accident, il est indispensable de connaître le produit concerné afin de prendre les décisions qui s'imposent et ainsi adapter l'intervention à la situation en un minimum de temps. Comme le risque d'accidents est lié à l'importance du trafic maritime du produit, les études doivent porter en priorité sur les produits les plus rencontrés et les plus dangereux.

Les statistiques sur les accidents passés donnent de bonnes indications sur les produits dits prioritaires. Ainsi, aux Etats-Unis, une étude a été menée de 1992 à 1996 afin d'avoir une approche statistique sur la nature des produits dangereux les plus fréquemment déversés, depuis les navires ou les installations de manutention portuaire (U.S. Coast Guard, 1999). Au total, 423 déversements de substances dangereuses ont été recensés, déversements qui pour la moitié d'entre eux ont conduit à la perte totale du produit ainsi qu'à des atteintes plus ou moins graves à la santé humaine. Les résultats obtenus mettent en évidence un nombre important de déversements d'acide sulfurique (30 % des accidents) et également, à un taux moindre, de toluène et de soude caustique.

De la même manière, Marchand in Fingas (2001) a publié une liste de substances chimiques (150 produits) hautement prioritaires à partir de données qui prennent en compte le nombre de fois où ces substances ont été impliquées dans un déversement, les volumes déversés, les volumes transportés ainsi que leur toxicité. Les dix premières substances chimiques, classées par ordre de priorité décroissant sont : acide sulfurique, polychlorobiphényle (PCB), hydroxyde d'ammonium, dichlore, acide chlorhydrique, ammoniaque, hydroxyde de sodium, toluène, éthylène glycol et nitrate d'ammonium.

1.3.2. Types de navires impliqués

L'analyse des 69 accidents les plus marquants des 50 dernières années a permis d'identifier le type de navire qui a été le plus souvent impliqué dans un accident ayant entraîné des déversements de substances chimiques en mer (Tableau 1.5). Ce recensement est non exhaustif.

Tableau 1.5 : Catégories de navires impliqués dans des accidents ayant entraîné des déversements de produits chimiques.

Type de navires	Nombre d'accidents
Citernier, chimiquier, gazier	26
Cargo	24
Porte-conteneurs	11
Vraquier	5
Ferry	3
TOTAL	69

La répartition en pourcentage des types de navires impliqués dans les accidents met en évidence qu'il s'agit de 38% de citernier, chimiquier et gazier et 34% de cargo. Les porte-conteneurs sont impliqués à une hauteur de 16%, les vraquiers de 7% et enfin les ferries avec 4%.

1.3.3. Mode de conditionnement des substances

En complément à l'analyse des types de navires impliqués dans les accidents, une analyse du mode de conditionnement des produits chimiques déversés en mer a été réalisée (Tableau 1.6).

Tableau 1.6 : Les différents modes de conditionnement des produits chimiques déversés en mer.

Mode de conditionnement	Nombre d'accidents
Cuves (en vrac)	46
Fûts, cylindres	18
Sacs et sachets	3
Autres (boîtes...)	2

La répartition en pourcentage des différents modes de conditionnement est de 66% pour les cuves, de 27% pour les fûts et cylindres, de 4% pour les sacs, sachets et de 3% pour les autres (boîte...).

De cette analyse, il ressort que la majorité des pollutions chimiques sont dues à la rupture des cuves des navires (46 accidents) suite à une collision, à un échouage ou à une explosion à bord. Ce genre d'accident, qui est le plus fréquent, est généralement à l'origine d'un déversement important de produits chimiques à la mer et, de ce fait, à l'origine de pollutions majeures. C'est le conditionnement en fûts, cylindres ou petites citernes qui arrive en seconde position (18 accidents). Ces conditionnements sont le plus souvent transportés à bord de cargos et de porte-conteneurs, et les accidents correspondent à des pertes en mer de ces fûts suite à des conditions météo-océaniques défavorables.

1.3.4. Substances chimiques déversées

L'analyse des 69 accidents a montré que l'acide sulfurique et le nitrate d'ammonium ont été déversés à plusieurs reprises et en grande quantité, respectivement 20 000 et 8 000 tonnes. De plus, au total six substances chimiques flottantes ont été identifiées (huile de ricin, huile de soja, acide oléique, dioctylphtalate, styrène et benzène), substances pour lesquelles une stratégie de lutte / récupération en mer pourra être définie à la fin de cette étude.

Les États-Unis et le Canada ont également procédé à l'analyse des accidents maritimes impliquant des produits chimiques (Tableau 1.7).

Tableau 1.7 : Produits chimiques les plus impliqués dans les accidents maritimes aux États-Unis (US Coast Guard, 1999) et au Canada (Fingas, 2001).

États –Unis	Code SEBC	Canada	Code SEBC
Acide sulfurique	D	Acide sulfurique	D
Toluène	E	Acide chlorhydrique	D
Soude caustique	D	Biphényles polychlorés	*
Benzène	E	Ethylèneglycol	D
Styrène	FE	Hydroxyde de sodium	D
Acrylonitrile	DE	Ammoniac	DE
Xylène	FE	Acide nitrique	D
Acétate de vinyle	ED	Chlore	*
Acide phosphorique	D	Hydroxyde d'ammonium	D

En comparant les résultats obtenus, l'analyse des accidents maritimes a permis de souligner :

- Les déversements accidentels de produits chimiques en mer ont essentiellement lieu à partir de navires spécialisés dans le transport de produits chimiques (38%) et à partir de cargos (35%).
- Dans 66% des cas, les déversements ont pour origine des fuites au niveau des cuves des navires.
- Parmi la multitude de substances transportées quotidiennement, l'acide sulfurique est le produit chimique le plus impliqué dans les accidents aussi bien en terme de fréquence qu'en terme de quantités déversées. En ce qui concerne les produits chimiques flottants, deux huiles végétales ont été identifiées (huile de ricin, huile de soja) ainsi que styrène et benzène.

2. Comportement dans l'environnement marin des substances chimiques flottantes : cas des hydrocarbures

Les composés anthropiques flottants déversés accidentellement dans l'environnement marin vont subir des modifications physico-chimiques qui vont caractériser leur comportement et devenir. Ces modifications sont liées aux paramètres intrinsèques du produit concerné mais également aux paramètres inhérents au milieu (température, densité et salinité de l'eau) ainsi qu'aux conditions météo-océaniques rencontrées sur la zone de déversement (état de la mer, vitesse du vent, courants marin). La figure 1.9 est réalisée sur la base des connaissances acquises suite aux marées noires.

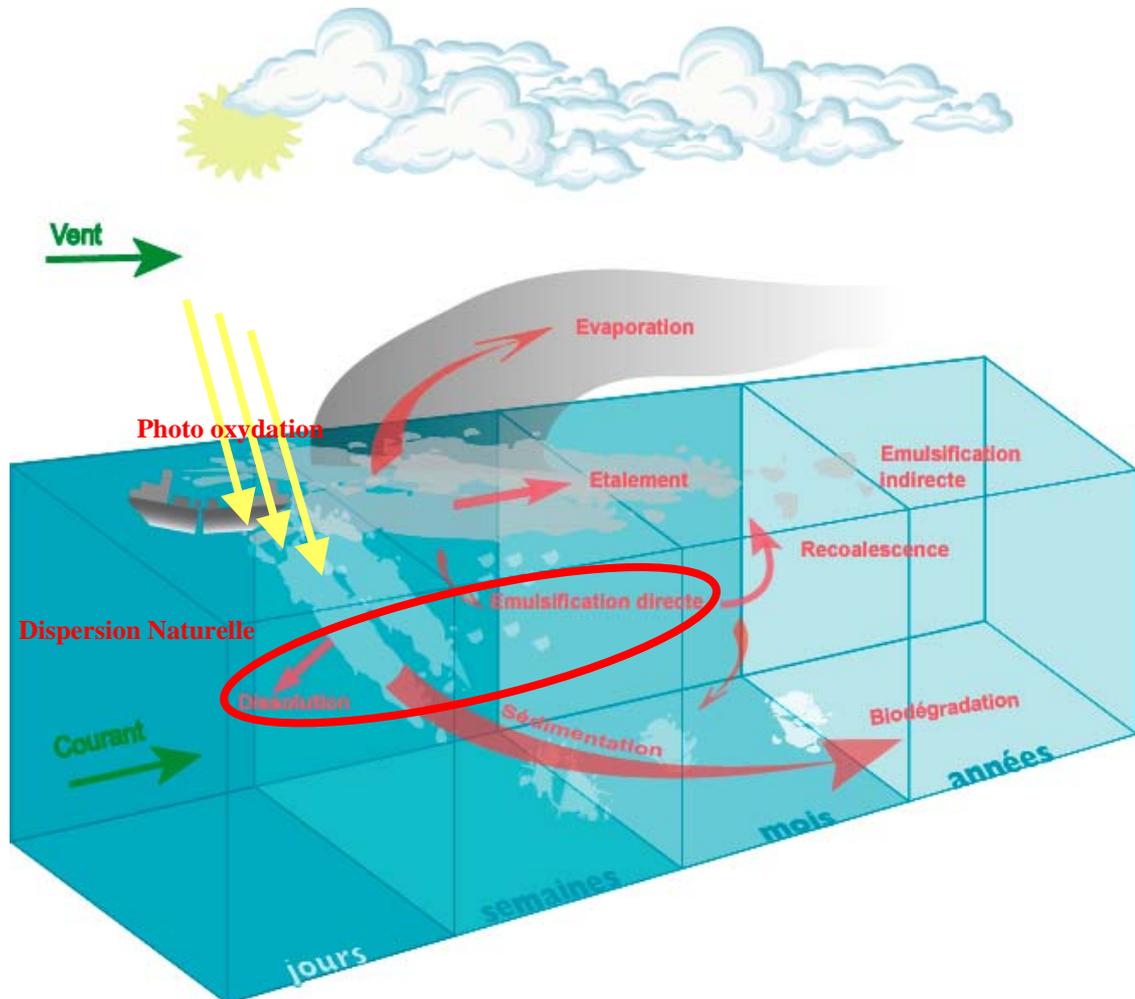


Figure 1.9 : Comportement et devenir d'un produit anthropique flottant (exemple d'un hydrocarbure) dans l'environnement marin (Source : Cedre).

Ainsi, le comportement des produits en mer est le résultat d'effets à court terme et d'effets à long terme. Les effets à court terme, observables dans les quelques heures qui suivent le déversement sont l'étalement, l'émulsification indirecte, la dispersion naturelle dans la colonne d'eau (solubilité et émulsification directe) et l'évaporation dans l'atmosphère. Ces différents phénomènes sont plus ou moins importants selon la nature du produit et les conditions environnementales au moment du relargage. Les effets à plus long terme sont les processus de dégradation (autoxydation, photoréaction, hydrolyse, polymérisation, biodégradation...) et la sédimentation dans la colonne d'eau.

En cas de déversement accidentel, il est important de connaître le comportement à court terme des produits déversés afin de prévoir leur devenir dans l'environnement marin et ainsi d'y associer les techniques d'intervention les plus appropriées. Koops (2005) souligne l'importance des processus d'évaporation et de dispersion naturelle dans ce devenir à court terme, et leur étroite interdépendance avec les paramètres environnementaux dont les conditions météo-océaniques.

2.1. Devenir à court terme

2.1.1. Etalement / déplacement

Au cours des phases initiales d'une pollution, l'étalement constitue l'un des processus les plus significatifs. Il est caractérisé par le taux d'étalement qui est d'autant plus faible que la viscosité du produit déversé est élevée (Fay, 1971 ; Mackay *et al.*, 1980). Il est important de souligner que les fluctuations de ce taux sont fonction des variations des conditions hydrographiques du moment, comme les courants, l'amplitude des marées et la vitesse des vents et que l'étalement ne sera jamais uniforme. La nappe finit toujours par se fractionner en bandes étroites qui s'orientent parallèlement à la direction du vent.

2.1.2. Emulsification indirecte ou émulsion inverse

Les produits chimiques déversés en mer et soumis à l'hydrodynamisme marin vont rapidement former des émulsions de type eau dans huile ou émulsion inverse ; ce phénomène sera d'autant plus important que les produits déversés ont une viscosité élevée, ce qui correspond notamment aux flottants persistants telles les huiles végétales, ainsi que de la nature tensioactive du ou des produits déversés (National Research Council, 1985 ; Poré, 1992 ; Fingas, 1993, Lewis et Walker, 1993).

Lors de ces processus d'émulsification, les caractéristiques physico-chimiques du produit déversé évoluent. Par exemple, la densité d'une émulsion peut atteindre 1,03 pour une huile végétale de densité initiale de 0,8 et sa viscosité peut être mille fois supérieure à celle de l'huile de départ. Le produit liquide d'origine est ainsi transformé en un matériau semi-solide assez lourd. Le taux d'évaporation s'en trouve diminué et les techniques de lutte doivent être adaptées à ces transformations (Fingas *et al.*, 1994 ; 1995 et 1997 ; Le Goff et Marchand, 1998).

2.1.3. Dispersion naturelle

Sous ce terme sont regroupés deux processus physico-chimiques très différents mais complémentaires, à savoir l'émulsification directe qui est caractéristique des produits hydrophobes et la dissolution qui est d'autant plus importante que le produit est soluble.

2.1.3.1. *Emulsion directe*

Les émulsions de produit dans l'eau, ou émulsion directe, sont sous la forme de gouttelettes de produit en suspension dans la colonne d'eau. Les vagues et, de façon générale, la turbulence qui règne à la surface de la mer vont produire une énergie mécanique de mélange suffisante pour faire passer le produit sous la surface de l'eau. La taille des gouttelettes formées sera fonction de l'énergie mécanique mise en jeu. Les gouttelettes de petite taille (diamètre inférieur à quelques dizaines de microns) auront tendance à rester en suspension dans la colonne d'eau, et de ce fait, à migrer sous l'influence des courants marins, ce qui aura pour conséquence d'entraîner une dispersion importante de la pollution et de rendre les gouttelettes plus accessibles aux microorganismes responsables des processus de biodégradation. Enfin, les gouttelettes plus volumineuses, de diamètre de l'ordre de quelques centaines de microns, auront tendance à remonter en surface pour former une nouvelle nappe - selon des processus de coalescence - qui à terme, finira par s'échouer sur le littoral (Fraser and wicks, 1995).

2.1.3.2. *Dissolution*

Le taux et l'importance de la dissolution d'un polluant sont fonction de son hydrosolubilité, de son taux d'étalement, de l'hydrodynamisme marin ainsi que de la salinité et la température de l'eau de mer. Pour les produits chimiques à pression de vapeur élevée, il est important de souligner que les processus d'évaporation l'emportent sur les processus de dissolution : ils agissent de 10 à 1000 fois plus rapidement (Jensen and Roy, 1976 ; Le Floch, 2002).

2.1.4. *Evaporation*

L'importance du processus d'évaporation est conditionnée par la volatilité du produit déversé (Jensen and Roy, 1976). Mais le taux d'évaporation est également augmenté en présence de mers fortes, de vitesses de vents élevées et de températures plus chaudes.

Le processus d'évaporation va entraîner la formation d'un nuage gazeux qui pourra être, soit de densité inférieure à celle de l'air, et donc, en cas de produit toxique, présenter un danger important pour les intervenants, soit de densité inférieure à celle de l'air et ainsi se diluer plus rapidement dans l'atmosphère (Koops, 2005).

2.2. Devenir à plus long terme

Le devenir à plus long terme caractérise des processus qui débutent immédiatement après le déversement et qui s'inscrivent dans la durée, à l'image de l'ensemble des processus de dégradation (autoxydation, photoréaction, hydrolyse, polymérisation, biodégradation...) et des phénomènes de sédimentation avec ou non adsorption sur la matière en suspension.

2.2.1. *Dégradation*

Un produit chimique déversé à la surface de la mer va immédiatement être soumis à des phénomènes de dégradation du fait des contraintes environnementales. A titre d'exemple, les processus de dégradation des huiles végétales sont connus pour des produits séjournant de façon prolongée au contact de l'air, de l'humidité et éventuellement dans des conditions de température peu propices à une bonne conservation. Les triglycérides peuvent donc subir une oxydation qui, selon le processus mis en œuvre, est soit une « autoxydation », qui est une réaction radicalaire en chaîne (Hui, 1992), soit une « photoxydation », nécessitant la présence d'un photosensibilisateur et l'exposition à la lumière (Gunstone, 1984 ; Horton and Fairhurst, 1987 ; Le Goff, 2002). Les triglycérides peuvent également être dégradés par hydrolyse, en présence d'eau (Karleskind, 1992). Ils peuvent aussi être biodégradés en présence de bactéries

ou polymérisés en mer (Arnaud, 1994 ; Mudge *et al.*, 1994 et 1995 ; Le Goff and Marchand, 1998).

Ces phénomènes interviennent également dans le devenir des substances chimiques dites pures ; c'est-à-dire autres que les huiles végétales, les céréales ou encore les formulations commerciales tels les engrais. A titre d'exemple, en 2002, suite à l'accident de Brindisi (Italie) où 1 500 tonnes de diphenyl-methane-diisocyanate ont été déversées en mer, de nombreuses boulettes de type « polystyrène » se sont échouées sur les plages méditerranéennes avoisinant le lieu du déversement. Ces boulettes étaient le résultat de la polymérisation spontanée du produit chimique au contact de l'eau de mer.

2.2.2. Sédimentation

L'interaction du produit chimique avec les particules en suspension dans la colonne d'eau (minérales et organiques) va engendrer la formation d'un floc qui aura tendance à sédimenter. A plusieurs reprises, les effets positifs de la floculation sur la dégradation du produit déversé ont été mis en évidence (Le Floch *et al.*, 2002). Des expérimentations de laboratoire ont montré que la plupart des substances chimiques à l'origine d'émulsions directes forment, sous réserve qu'il y ait suffisamment d'agitation, des flocons constitués d'une ou plusieurs gouttes de produit entourées de grains de minéraux fixés sur leur surface (Lee *et al.*, 1998). Cette agrégation, en empêchant la coalescence des gouttes de produit déversé, favorise les processus de biodégradation en augmentant la surface accessible aux sels nutritifs, à l'oxygène et aux bactéries (Bragg *et al.*, 1994 ; Lee *et al.*, 1997). Ainsi, les phénomènes de floculation favorisent la sédimentation des produits déversés et leur biodégradation.

2.3. Prévision du comportement des produits chimiques en vue de l'intervention

Afin d'organiser la lutte contre un déversement, il est primordial de connaître le comportement du ou des produits chimiques impliqués et ainsi appréhender au mieux leurs destinations finales. Pour se faire, de nombreuses études ont été réalisées en particulier sur les transferts de la surface vers l'atmosphère (détermination du taux d'évaporation) et de la surface vers la colonne d'eau (détermination du taux de solubilisation et d'émulsification directe). Ces études ont pour objectif de modéliser ces transferts.

2.3.1. Taux de dispersion et de solubilisation

La dispersion, ou émulsification directe, correspond au passage de gouttes de produit dans la colonne d'eau. La méthode de Delvigne and Sweeney (1988) décrit ce phénomène à partir de l'équation 5.

$$Q = C_0 D^{0.57} S_{cov} F_{wc} d^{0.7} \Delta d \quad (5)$$

Où

- Q est le taux de transfert de masse (en $kg \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$) ;
- d est le diamètre maximal des gouttes ;
- Δd représente la gamme de variation du diamètre des gouttes autour de d ;
- $C_0 = 4.45 \times 10^{-5}$ pour les hydrocarbures, avec ν la viscosité cinématique (si le calcul donne une valeur négative alors $C_0 = 0$). C_0 est le coefficient de pénétration du produit chimique dans la colonne d'eau.
- D est l'énergie de mélange des vagues par unité de surface.
- F_{wc} est la fraction de mer frappée par les vagues, avec $F_{wc} = 0.032 [(U-5)/(8.13 \times U)]^2$ où U est la vitesse du vent en $m \cdot s^{-1}$ et g est l'accélération de la pesanteur en $m \cdot s^{-2}$;
- S_{cov} représente la surface de la mer frappée par les vagues, en modélisation cette surface est souvent estimée comme étant égale à 1.

Cette méthode nécessite de connaître le diamètre maximal des gouttes, ce qui n'est pas systématiquement le cas. La modélisation devient alors approximative d'autant plus qu'elle prend en compte l'état de la mer au moment du déversement, afin de décrire la pénétration du produit dans la colonne d'eau, et que cet état de mer est difficilement descriptible à l'aide d'un coefficient.

En ce qui concerne la cinétique de dissolution, elle peut être expliquée à l'aide de l'équation 6 qui a été définie par Mackay et Yeun (1983).

$$dM_s / dt = k_s A S \quad (6)$$

Où

- M_s est la masse de produit dissoute (en kg) ;
- t est le temps (en s) ;
- k_s est le coefficient de transfert relatif à la dissolution (en $m \cdot s^{-1}$). Pour une vitesse du vent U inférieure à $5 \text{ m} \cdot \text{s}^{-1}$, on estime $k_s = 10^{-3} + 34.1 \times 10^{-4} U^* Sc_L^{-0.5}$. Avec U^* en tant que

vitesse de friction et égale à $(6.1+0.634)^{0.5}U10^{-2}$ et où S_{CL} est le nombre de Schmidt de la phase liquide ;

- A désigne la superficie de la nappe (en m^2) ;
- S désigne la solubilité du produit chimique et est égale à $S_0e^{\alpha t}$ avec S_0 la solubilité initiale du produit chimique et, α une constante de vieillissement.

Cette équation de la dissolution est l'unique équation permettant de décrire ce phénomène pour le milieu marin.

2.3.2. Détermination de la solubilité théorique

La modélisation des processus de dissolution d'un produit donné est basée sur la connaissance de sa solubilité, solubilité qui peut être explicitée selon plusieurs techniques décrites dans la littérature.

Estimation de la solubilité à partir du coefficient de partage octanol / eau (K_{ow})

D'après Hansch *et al.* (1968), la solubilité d'un produit peut être déterminée à l'aide de son coefficient de partage octanol / eau selon la relation 7.

$$\log C_w^{sat} = A - B \log K_{ow} \quad (7)$$

Au total, 18 régressions linéaires ont été établies afin de déterminer la solubilité de différents groupes chimiques (Lyman, 1996). Ces équations donnent une estimation de la solubilité à une température d'environ 25°C et elles sont présentées dans le tableau 1.8.

Estimation de la solubilité à partir de l'équation générale de solubilité selon Yalkowsky

Yalkowsky *et al.* (2002) ont proposé une équation générale pour la solubilité (molaire) des composés organiques, à 25°C, nécessitant l'introduction d'uniquement deux paramètres : le point de fusion (MP en °C) et le coefficient de partage octanol / eau (Equation 8).

$$\log S = 0,5 - 0,01 (MP - 25) - \log K_{ow} \quad (8)$$

Avec, si le produit est liquide (MP<25), $MP - 25 = 0$.

Cette équation générale suppose que :

- La solubilité idéale d'un solide est décrite par l'équation de Vant'Hoff, avec S l'entropie de fusion décrite par la loi de Walden (entropie de fusion=56,5 J.deg mol⁻¹ pour un composé non-associé);
- K_{ow} est indépendant de la concentration en soluté et de la saturation mutuelle des phases eau et octanol;

- La miscibilité complète d'un soluté et de l'octanol correspond à une solubilité fractionnelle molaire dans l'octanol de 0,5 (\Leftrightarrow solubilité molaire de 3,15);
- Le MP du composé ne change pas en présence d'eau.

Tableau 1.8 : Régressions linéaires permettant l'estimation de la solubilité de différentes classes chimiques selon Lyman (1996).

N° de l'éq.	Equation	Unités de S	R ²	Classes chimiques
2-2	$\log S = -1,37 \log K_{OW} + 7,26$	$\mu\text{mol.l}^{-1}$	0,903	Classes mélangées ; hydrocarbures aromatiques et chlorés bien représentés
2-3	$\log S = -0,922 \log K_{OW} + 4,184$	mg.l^{-1}	0,740	Classes mélangées ; pesticides bien représentés
2-4	$\log S = -1,49 \log K_{OW} + 7,46$	$\mu\text{mol.l}^{-1}$	0,970	Classes mélangées ; plusieurs pesticides
2-5	$\log 1/S = 1,113 \log K_{OW} - 0,926$	mol.l^{-1}	0,935	Alcools
2-6	$\log 1/S = 1,229 \log K_{OW} - 0,720$	mol.l^{-1}	0,960	Cétones
2-7	$\log 1/S = 1,013 \log K_{OW} - 0,520$	mol.l^{-1}	0,980	Esters
2-8	$\log 1/S = 1,182 \log K_{OW} - 0,935$	mol.l^{-1}	0,880	Ethers
2-9	$\log 1/S = 1,221 \log K_{OW} - 0,832$	mol.l^{-1}	0,861	Alkyles halogénés
2-10	$\log 1/S = 1,294 \log K_{OW} - 1,043$	mol.l^{-1}	0,908	Alcynes
2-11	$\log 1/S = 1,294 \log K_{OW} - 0,248$	mol.l^{-1}	0,970	Alcènes
2-12	$\log 1/S = 0,996 \log K_{OW} - 0,339$	mol.l^{-1}	0,951	Aromatiques (benzène et dérivés benzéniques)
2-13	$\log 1/S = 1,237 \log K_{OW} + 0,248$	mol.l^{-1}	0,908	Alcanes
2-14	$\log 1/S = 1,214 \log K_{OW} - 0,850$	mol.l^{-1}	0,912	Tous les composés décrits par les éq. 2-5 à 2-12 plus les propionitriles
2-15	$\log 1/S = 1,339 \log K_{OW} - 0,978$	mol.l^{-1}	0,874	Tous les composés décrits par les éq. 2-5 à 2-13 plus les propionitriles
2-16	$\log S = -2,38 \log K_{OW} + 12,90$	$\mu\text{mol.l}^{-1}$	0,656	Esters de phosphates
2-17	$\log S = -0,9874 \log K_{OW} - 0,0095t_m + 0,7178$	mol.l^{-1}	0,990	Benzènes halogénés
2-18	$\log S = -0,88 \log K_{OW} - 0,01 t_m - 0,012$	mol.l^{-1}	0,979	Hydrocarbures aromatiques rigides (aromatiques polynucléaires)
2-19	$\log S = -0,962 \log K_{OW} + 6,5$	$\mu\text{mol.l}^{-1}$	0,878	Hydrocarbures halogénés en C1 et C2 (8 composés avec Cl, 1 avec Br)

t_m : point de fusion en °C.

Estimation de la solubilité à partir de la structure moléculaire (méthode de Irmann)

Irmann (1996) a développé une méthode d'estimation de la solubilité aqueuse des hydrocarbures et hydrocarbures halogénés à partir d'informations structurales uniquement (Lyman, 1996). Cette méthode nécessite la substitution de constantes atomiques et structurales, dérivées de mesures de solubilités de presque 200 composés, dans l'équation 9.

$$- \log S = x + \sum y_i n_i + \sum z_j n_j \quad (9)$$

Le logarithme négatif de la solubilité (S en g.g.⁻¹ H₂O) est calculé à partir :

- d'une valeur de base x dépendante de la classe du composé ;
- de la contribution y_i d'atomes spécifiques multipliés par leurs fréquences n_i dans la molécule ;
- de la contribution z_j d'éléments structurels variés qui sont présents à des fréquences n_j dans la molécule.

Les valeurs x, y et z sont données dans les tableaux 1.9, 1.10 et 1.11.

Pour un composé gazeux à pression normale (1 atm) l'équation donne la solubilité du gaz liquéfié à la pression de vapeur de coexistence des deux phases. Ceci peut être converti en la valeur approximative de S, à 1 atmosphère, en divisant par la pression de vapeur (en atm) du composé pur. Pour un composé solide à 25°C l'équation donne la solubilité du liquide « supercooled ». La vraie solubilité du solide (S_{sol}) peut être obtenue par l'approximation suivante (équation 10), suggérée par Irmann :

$$- \log S_{sol} = - \log S + 0.0095 (t_m - 25) \quad (10)$$

Avec $-\log S$ valeur déterminée précédemment et t_m point de fusion du solide en °C. Le facteur 0,0095 est basé sur une entropie de fusion supposée de 13 cal.mol.⁻¹°C⁻¹.

Tableau 1.9 : Valeurs de x.

<i>Type de composés</i>		<i>x</i>
C ₆ H ₆	Composé aromatique	0,5
X, H, =C	Dérivé halogéné, aliphatique insaturé, avec halogène sur le C insaturé, et avec H dans la molécule (sans F)	0,5
F, H, (Cl), -C	Dérivé halogéné, aliphatique saturé, contenant H en plus de F	0,5
X, H, -C	Dérivé halogéné, aliphatique saturé (sans F)	0,9
X, -C ou F, (X), -C	Dérivé perhalogéné (avec F), aliphatique saturé (sans H dans la molécule)	1,25
X, =C	Dérivé perhalogéné (sans F), aliphatique insaturé	0,9
H, C	Hydrocarbure, aliphatique	1,5
	Cycloaliphatique	-0,35

Tableau 1.10 : Valeurs de y.

Atome	Emplacement	y
C		0,25
H		0,12
F	Sur C aromatique	0,19
	Sur C saturé	0,28
Cl	Sur C aromatique et insaturé	0,67
	Sur C saturé	0,37
Br	Sur C aromatique et insaturé	0,70
	Sur C saturé	0,49
I	Sur C aromatique et insaturé	1,12
	Sur C saturé	0,82

Tableau 1.11 : Valeurs de z.

Elément structurel	z	
-C=C-	Double liaison (non conjuguée) dans un composé aliphatique pur	-0,35
-C=C-C=C-	2 doubles liaisons conjuguées dans un composé aliphatique	-0,55
-C≡C-	Triple liaison (individuelle) dans un composé aliphatique pur	-1,05
$\begin{array}{c} \text{X} \\ \\ \text{CH} \\ / \quad \backslash \end{array}, \quad \begin{array}{c} \text{X} \\ \\ \text{CH}_2 \end{array}$	Groupe avec à la fois H et halogènes (dont F) sur le même C saturé	-0,30
-CHX-	Groupe non-terminal se présentant plusieurs fois	-0,10
$\begin{array}{c} \text{C} \\ \\ \text{---C---C} \\ \end{array}, \quad \begin{array}{c} \text{C} \\ \\ \text{---C---R} \\ \end{array}$	Chaîne aliphatique ramifiée ou monosubstitution non-terminale	-0,10

Cette approche de la solubilité n'est pas utilisable pour des molécules contenant l'oxygène, de l'azote ou du soufre : la solubilité des composés comme le nonylphénol ou l'acide oléique ne peut donc pas être estimée.

Estimation de la solubilité à partir de la méthode AQUAFAC

Cette méthode prédit le coefficient d'activité molaire γ_m à partir duquel la solubilité molaire peut être déduite (Boethling, 2000). Le coefficient d'activité molaire est donné par l'équation 11.

$$\log \gamma_m = \sum n_i q_i \quad (11)$$

Avec :

n_i : le nombre de fois qu'un groupe fonctionnel apparaît ;

q_i : la contribution de ce groupe (Tableau 1.12).

Tableau 1.12 : Valeurs de q dans la méthode AQUAFAC (N/D = groupe pas encore défini).

X_n-G	q	X_nY-G	q	X_nY_2-G	valeurs de q
X_2-CH_2	0,545	$XY-CH_2$	0,03	Y_2-CH_2	0,149
X_3-CH	0,305	X_2Y-CH	0,085	XY_2-CH	- 0,127
X_4-C	0,019	X_3Y-C	- 0,308	X_2Y_2-C	- 0,52
$X_2-C=$	0,583	$XY-C$	0,525	Y_2-C	0,319
X_2-O	- 1,51	$XY-O$	- 0,664	Y_2-O	- 0,017
X_3-N	- 3,428	X_2Y-N	0,379	XY_2-N	0,320
$X_2-C=O$	- 0,968	$XY-NH$	- 0,110	$Y_2-C=O$	- 0,41
X_2-NH	- 2,233	$Y-CH_3$	0,204	Y_2-NH	N/D
$X-CH_3$	0,706	$Y-CH=$	0,321		
$X-CH=$	0,636	$Y-Cl$	0,409		
$X-Cl$	0,389	$Y-Br$	0,645		
$X-Br$	0,379	$Y-CHO$	- 0,772		
$X-CHO$	- 1,111	$Y-NH_2$	- 1,193		
$X-NH_2$	- 1,911	$Y-CONH$	- 0,847		
$X-NO_2$	- 0,127	$Y-CON$	N/D		
$X-COOH$	N/D	$Y-NO_2$	0,082		
$X-OH$	- 2,285	$Y-COOH$	- 1,419		
$X=CH_2$	0,579	$Y-OH$	- 1,81		
EPOXIDE	- 0,301	$XY-C=O$	- 0,722		
X_2-S	N/D	$XY-S$	N/D		

Un atome voisin d'un X, ou atome hybridé sp^3 , est un hydrogène, un carbone aliphatique, un halogène, un azote d'une fonction amine ou un oxygène. Un atome voisin d'un Y, ou atome hybridé sp^2 , inclus les carbones aromatiques, les azotes et les groupes nitro. Un atome voisin d'un YY est un carbone aromatique en tête de pont, comme dans un naphthalène, ou un groupe qui est lié à 2 carbones aromatiques, comme le carbonyle d'une diphenyl cétone.

Une fois le coefficient d'activité molaire déterminé la solubilité peut alors être calculée selon la relation 12.

$$x_w^{sat} = 1/\gamma \quad (12)$$

2.4. Influence des paramètres environnementaux sur le comportement des produits chimiques, cas de la température et de la salinité

Les différents écosystèmes marins peuvent être, entre autres, caractérisés par les paramètres physiques intrinsèques que sont la température et la salinité. En effet, dans un contexte accidentel, ces deux paramètres ont une influence non négligeable sur le devenir à court terme du produit déversé et notamment sur les processus de dispersion naturelle (solubilisation et émulsification directe) dans la colonne d'eau.

2.4.1. La température

L'hydrosolubilité d'un produit chimique est fonction de la température, et ceci, dans des proportions et des sens variables selon sa nature chimique (Lyman, 1996). Par analogie avec la dépendance température / pression de vapeur, il est possible de déduire la dépendance à la température de la solubilité molaire d'un liquide selon l'équation 13.

$$d(\ln x_w^{\text{sat}}) / dt = \Delta H_S^e / RT^2 \quad (13)$$

Avec ΔH_S^e l'enthalpie de dissolution qui est le coût ou gain énergétique résultant du désassemblage des associations moléculaires et établissant une nouvelle série de liaisons intra et intermoléculaires.

ΔH_S^e est constituée de :

- l'enthalpie de rupture des attractions des molécules de produit dans sa phase pure ΔH_1 ;
- l'enthalpie de rupture des attractions des molécules d'eau dans l'eau ΔH_2 ;
- l'enthalpie d'attraction du produit et de l'eau ΔH_3 ;
- l'enthalpie dû au « freezing effect », ΔH_{ice} , c'est à dire la possibilité des molécules d'eau à faire des interactions plus fortes autour des molécules organiques.

L'enthalpie de dissolution est alors définie avec l'équation 14.

$$\Delta H_S^e = \Delta H_1 + \Delta H_2 + \Delta H_3 + \Delta H_{\text{ice}} \quad (14)$$

En supposant ΔH_S^e constant sur une gamme de température réduite et en passant en unités molaires et en logarithme décimal, l'intégration de la première équation donne l'équation 15.

$$\log C_w^{\text{sat}} = - (\Delta H_S^e / 2.303 RT) + \text{cste} \quad (15)$$

La température influence ainsi la dissolution des produits chimiques. La plupart des composés organiques deviennent plus solubles quand la température augmente, mais cette loi n'est pas systématique à l'exemple du p-dichlorobenzène.

2.4.2. La salinité

La présence de sels dissous ou de minéraux dans l'eau, notamment dans l'eau de mer, entraîne, en général, une diminution de la solubilité. La relation générale entre la salinité et la solubilité, encore appelée relation de Setschenow, peut s'exprimer à l'aide de l'équation 16.

$$\log (S^0/S) = K_S C_S \quad (16)$$

Avec :

S^0 : solubilité molaire dans l'eau pure ;

S : solubilité molaire dans l'eau salée ;

K_S : paramètre empirique de salting (ou constante de Setschenow) ;

C_S : concentration molaire en sels.

Xie *et al.* (1997) ont passé en revue cet effet de sels et ont proposé une corrélation simple entre K_S et le volume molaire Le Bas (calculé à partir de fragments atomiques, Reid *et al.*, 1984).

$$K_S = 0,0018 V_{LeBas}$$

Yalkowsky and Ni (2002) ont eux aussi proposé une corrélation basée cette fois sur le coefficient de partage octanol / eau (K_{ow}). Cette corrélation est présentée à l'aide de l'équation 17.

$$K_S = 0,04 \log K_{ow} + 0,114 \quad (17)$$

La théorie de Long and McDevit (1952) concernant l'effet de sels attribue le signe de K_S à l'influence du sel sur la structure de l'eau (Millero, 2000). Si la solution est compressée par les interactions ion / eau, il devient plus difficile d'introduire le non-électrolyte dans la solution (« salting out »). Si la solution est moins structurée, il est plus facile de dissoudre le non-électrolyte (« salting in »).

Les études ont été menées sur de l'eau de mer artificielle obtenue selon la méthode d'Aminot et Chaussepied (1983) (tableau 1.13).

Tableau 1.13 : Protocole de préparation de l'eau de mer artificielle.

1. Dissoudre dans environ 800 mL d'eau distillée
2. 32 g de NaCl + 14 g de MgSO ₄ , 7 H ₂ O + 0,2 g de NaHCO ₃
3. Compléter à 1L avec de l'eau distillée : chlorosité = 19,4g.l ⁻¹ (S ≈ 34,2‰)

3. Impact sur l'environnement marin - biomarqueur

L'analyse de la qualité de l'environnement marin (colonne d'eau, faune, flore marine) lors des pollutions accidentelles par des produits chimiques est primordiale pour des raisons à la fois écologiques et socio-économiques. L'utilisation de variables biologiques s'est progressivement imposée comme moyen d'apprécier la qualité des eaux et des écosystèmes aquatiques. Elle présente de nombreux avantages par rapport aux paramètres physico-chimiques. En effet, des émissions ponctuelles de polluants peuvent être difficilement décelables par analyses physico-chimiques des eaux alors qu'elles peuvent avoir des conséquences importantes sur le milieu biologique. Les variables biologiques permettent une évaluation du devenir et des effets des polluants dans le compartiment biologique car les organismes vivants sont sensibles à une large gamme d'impacts physiques, chimiques et biologiques, et peuvent apporter des réponses précises et graduées aux conséquences de ces perturbations. Elles intègrent à la fois les effets individuels et cumulatifs de plusieurs sources de perturbations, que ces dernières soient ponctuelles ou diffuses. Ce sont de bons intégrateurs des phénomènes intervenant à plusieurs échelles de temps et d'espace et permettent d'évaluer les changements éventuels des écosystèmes sur le long terme, à la fois sur le quantitatif et le qualitatif.

A titre d'exemple, l'accident du chimiquier *Ievoli Sun* contenant 6000 T de produit chimique dont 4000 T de styrène a mis en évidence une contamination de la colonne d'eau et d'organismes marins à proximité de l'épave et des zones de pêche. Ces observations, ainsi que l'absence de données bibliographiques, ont montré l'importance de développer des outils tels que les « biomarqueurs d'exposition », permettant d'évaluer l'exposition des individus à des xénobiotiques.

L'exposition et/ou l'assimilation de polluants par un organisme marin provoque des effets plus ou moins importants sur sa santé en fonction de la durée d'exposition ou de la dose ingérée. La figure 1.10 montre les changements physiologiques d'un organisme lors d'une détérioration progressive de son état de santé. L'exposition à des doses croissantes de polluants entraîne des réponses physiologiques compensatoires (zone de compensation). Lorsque la compensation physiologique est insuffisante pour maintenir les fonctions vitales, s'ensuivent des conséquences pathologiques (zone de non compensation). En A ce sont des

mécanismes physiotoxicologiques concernés par l'intoxication et en B des réponses correspondantes des biomarqueurs à ces diverses étapes. Le rectangle en pointillés rouge correspond aux biomarqueurs d'exposition. En B1, les biomarqueurs interviennent dans le maintien de l'homéostasie de l'organisme, en « tamponnant » l'effet du polluant. En B2, les biomarqueurs interviennent en compensant l'action des polluants – en limitant sa toxicité. En B3 et B4, les biomarqueurs ne contribuent pas à cette compensation. En première approximation, en B1 et B2 se rencontrent essentiellement des biomarqueurs d'exposition, en B3 et B4 des biomarqueurs d'effet ainsi que de sensibilité.

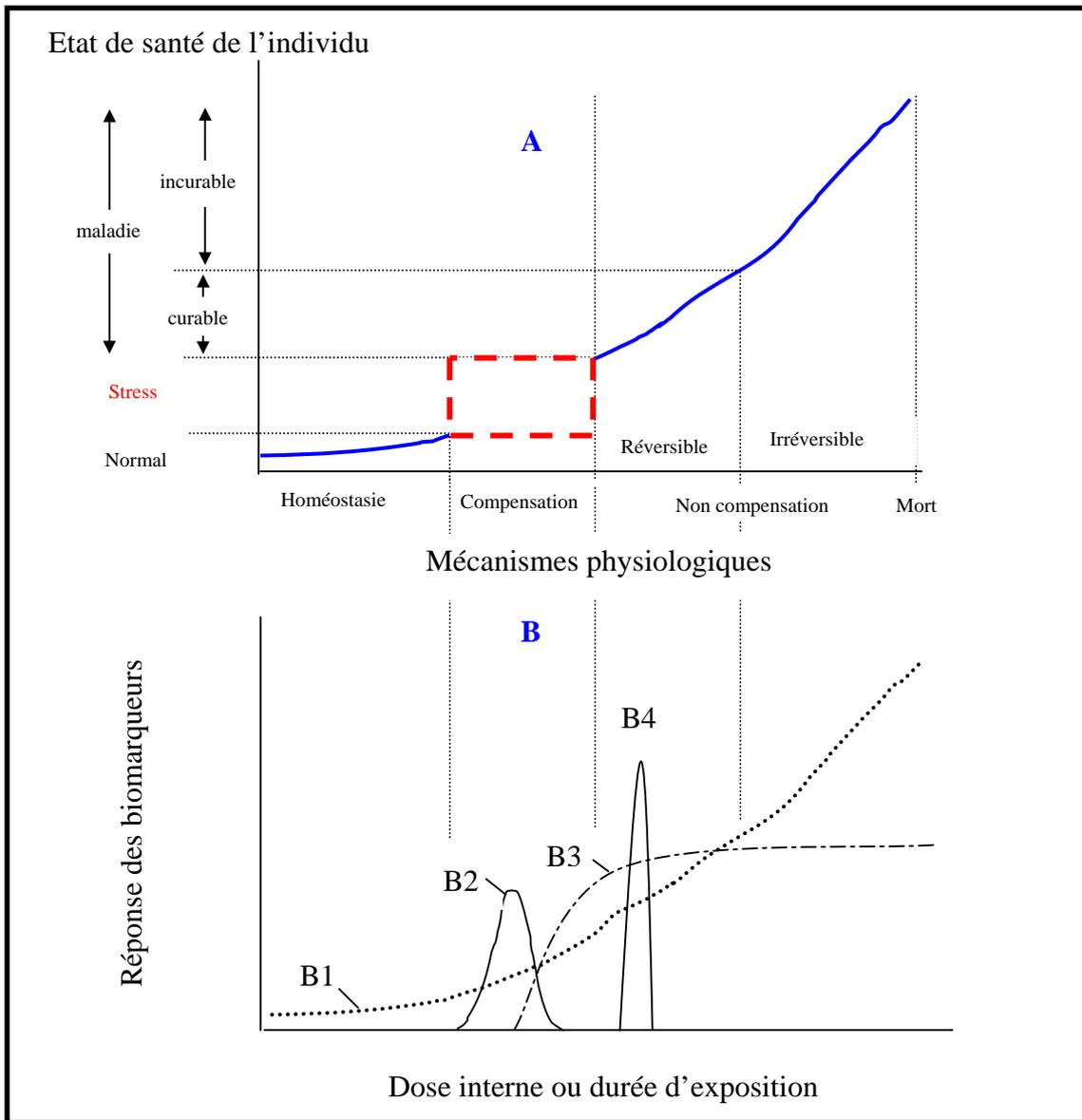


Figure 1.10 : Schémas des diverses étapes des processus d'intoxication d'un organisme après exposition ou ingestion de polluant (Depledge, 1994).

3.1. Présentation des biomarqueurs

Un biomarqueur est un changement observable et/ou mesurable au niveau moléculaire, biochimique, cellulaire, physiologique ou comportemental, qui révèle l'exposition présente ou passée d'un individu à au moins une substance chimique à caractère polluant. La mesure, au sein d'individus provenant du milieu naturel, de paramètres moléculaires, biochimiques, cellulaires ou physiologiques est regroupée sous le terme de biomarqueur (Lagadic *et al.*, 1997).

Dans la littérature, différentes définitions du terme biomarqueur sont retrouvées. D'après NRC (National Research Council, 1987), les biomarqueurs sont des mesures dans les fluides corporels, les cellules ou les tissus indiquant des modifications dues à la présence et à l'importance des polluants ou d'une multitude de réponses. Les biomarqueurs traduisent les réponses biologiques aux toxines environnementales et anthropiques (Bucheli and Fent, 1995), ou encore une mesure reflétant une interaction entre le système biologique et un éventuel danger, qui peut être chimique, biologique ou physique (Who, 1993). Peakal (1994) définit un biomarqueur comme un changement de réponses biologiques (moléculaire, cellulaire et physiologique) modifiant leur fonctionnement et relié à l'exposition aux produits chimiques environnementaux ayant des effets toxiques. Une situation de stress provoquée par les polluants peut-être un déclencheur d'une cascade de réponses biologiques, chacune d'elles pouvant en théorie servir de biomarqueur (McCarthy *et al.*, 1991).

Afin de faire un choix des plus judicieux, une synthèse bibliographique a permis de connaître l'existence de différents types de biomarqueurs (Annexe 2), signaux pouvant indiquer, chez les organismes marins, une pollution de l'environnement. Cette synthèse a dans un premier temps, permis de définir un système de classification de ces biomarqueurs, puis, dans un second temps, de trouver un biomarqueur adéquat pour cette étude. Sous le terme de biomarqueur sont regroupés un nombre important d'indices permettant d'obtenir des informations sur l'état physiologique, au niveau cellulaire, tissulaire, de l'organisme ou de la population. Certains sont de natures enzymatiques, hormonales, vitaminiques ou encore glucidiques, protéiques... Ils représentent des réponses biochimiques, histologiques, physiologiques spécifiques de la dégradation de la qualité chimique du milieu et sont situés à un stade précoce de la cascade d'évènements pouvant déboucher sur des conséquences écotoxicologiques significatives (Khalanski and Souchon, 1994). En combinant ces

informations avec les impératifs de l'étude en terme de surveillance de l'impact d'une pollution accidentelle en milieu marin, notre choix s'est orienté vers la stabilité membranaire des lysosomes le biomarqueur cellulaire.

3.2. Mesure de la stabilité membranaire du lysosome par le rouge neutre (NRRT)

La technique analytique consistant à mesurer la stabilité de la membrane du lysosome (NRRT) afin de déterminer si la cellule a été ou non exposée à un polluant, et par extension l'organisme tout entier, présente plusieurs avantages dont les principaux sont :

- elle ne nécessite pas un temps d'exposition important au polluant,
- elle garantit une certaine fiabilité de la réponse (ce test est utilisé de façon routinière pour contrôler le relargage des plate-formes pétrolières),
- elle s'effectue sur un petit échantillon de cellules,
- elle est non destructrice pour les organismes impliqués (l'analyse est pratiquée sur un échantillon de sang, et de ce fait l'organisme peut être utilisé pour d'autres manipulations).

En complément, les réactifs utilisés sont faciles à se procurer et peu onéreux, le seul matériel analytique indispensable est un microscope, et une série d'analyses peut être réalisée dans un délai bref, ce qui est en adéquation avec le contexte de l'urgence accidentelle.

Les lysosomes sont des organelles qui répondent à de nombreux facteurs de stress, tant chez les vertébrés que chez les invertébrés. À l'exception des hématies chez les mammifères, toutes les cellules possèdent plusieurs centaines de lysosomes, dont les dimensions varient de 1 à 20 nm. Ils sont synthétisés au niveau des dictyosomes par bourgeonnement. Leur structure générale est simple : ils sont constitués d'une membrane renfermant de nombreuses enzymes (hydrolases acides d'activité maximale à pH = 5), dont la nature varie d'une cellule à l'autre. Leur fonction essentielle consiste à dégrader les macromolécules extracellulaires ingérées par la cellule (hétérophagie), les organites âgés ou défectueux qui ont perdu leur raison d'être présents dans la cellule ainsi que des composés intracellulaires dont l'accumulation deviendrait cytotoxique s'ils n'étaient pas éliminés (autophagie). Ils contribuent par ailleurs à la défense de l'organisme en participant à la destruction de nombreux agents pathogènes (bactéries, virus) et en détoxifiant certaines substances médicamenteuses ou dangereuses.

Divers facteurs environnementaux, biotiques ou abiotiques, peuvent affecter l'intégrité de la membrane lysosomale en déstabilisant la matrice lipoprotéique. La fragilité lysosomale peut être considérée, tout comme les autres biomarqueurs disponibles au niveau cellulaire, physiologique ou biochimique, comme un indicateur significatif des réponses des êtres vivants aux facteurs de stress. Le terme de stress sera employé pour désigner la conséquence de l'action de facteurs, abiotiques ou autres, au niveau individuel ou de la population, conséquence qui dépasse les limites des capacités adaptatives des organismes concernés ou qui perturbe leur fonctionnement physiologique à tel point que leurs chances de survie sont diminuées (Lagadic *et al.*, 1998).

La technique retenue est celle de la stabilité membranaire lysosomale ou temps de rétention du Rouge Neutre. Le rouge neutre est un colorant d'inclusion spécifique des lysosomes et permet d'estimer l'intégrité de la membrane. Cette expérience permet donc d'évaluer la santé d'une cellule en mesurant le temps de rétention du colorant par les membranes lysosomales. Ce test robuste permet de réaliser plusieurs mesures sur le même organisme à des intervalles de temps plus ou moins longs et après différents traitements comme une période de contamination suivie d'une période de décontamination.

La méthode de stabilité membranaire consiste à perméabiliser la membrane avec de l'acide. La destruction de la membrane sera d'autant plus rapide si elle est auparavant altérée par les polluants du milieu marin. La technique de la stabilité membranaire par le rouge neutre est basée sur la capacité des cellules à incorporer ce rouge neutre. Le rouge neutre est un colorant faiblement cationique qui pénètre aisément à travers les membranes cellulaires par diffusion non ionique, s'accumulant intra-cellulairement dans les lysosomes, où il se lie avec des emplacements anioniques dans la matrice lysosomale. Lorsque les cellules sont exposées à des xénobiotiques, leurs membranes lysosomales sont fragilisées, ce qui provoque une diminution de l'attachement du rouge neutre, c'est donc ainsi que sont repérées les cellules viables des cellules endommagées ou mortes. Ce test permet de détecter l'exposition aux métaux inorganiques, aux organométaux, aux agents tensio-actifs, aux pesticides, au toluène, au benzène, aux anilines, aux composés phénoliques, aux HAP, PCB, et une variété d'agents chimiques divers (Regoli, 1992). Ce test permet de prédire des pathologies éventuelles et peut être effectué sur de petits échantillons de cellules sans nuire à l'animal tout en répondant à une quantité de xénobiotiques.

3.3. Présentation de l'espèce bioindicatrice retenue

Le choix de l'espèce sentinelle est issu d'un compromis entre les exigences scientifiques et les critères de faisabilité sur le terrain. Une espèce bioindicatrice doit avant tout être ubiquitaire, en très grand nombre, sensible aux contaminants, non migratrice (pour refléter au mieux les conditions du milieu) et facile à prélever.

Mytilus edulis ou moule bleue appartenant à la classe des *Bivalvia*, à l'ordre des *Mytiloidea* et à la famille des *Mytilidea* souscrit à tous ces critères. Elle présente une large répartition géographique : dans les zones polaires et tempérées, dans les océans Arctique, Atlantique et Pacifique Nord. Elle occupe des zones étendues allant de la zone médiolittorale à la zone sublittorale (< 99 m) et colonise aussi bien les milieux à forte salinité que les eaux estuariennes saumâtres. C'est une espèce sédentaire, filtreuse, et représente correctement les conditions du milieu de prélèvement. La moule présente un grand intérêt économique. La robustesse et la viabilité de cette espèce facilitent son utilisation en conditions expérimentales.

De plus, les systèmes de biotransformation et les mécanismes de toxicité des contaminants sont connus chez les mollusques bivalves. Ces différentes caractéristiques font de la moule un excellent bioindicateur, qui a été choisi pour des programmes de surveillance tel que RNO (Réseau Nationale d'Observation) et RINBIO (Réseau Intégrateurs Biologiques). Ils se basent sur les capacités biointégratrices de la moule, en utilisant la technique de transplants (uniquement RINBIO) qui combine le contrôle expérimental réalisable en laboratoire avec le réalisme des expériences pratiquées sur le terrain. La moule commune (*Mytilus edulis*) a été l'objet de nombreuses études, essentiellement pour sa grande disponibilité sur le littoral et son coût d'échantillonnage faible. C'est pourquoi notre choix s'est porté sur cet organisme, la moule commune *Mytilus edulis*.

La forme de la coquille de *Mytilus edulis* est approximativement allongée et triangulaire et de longueur maximale comprise entre 7 et 10 cm. Le côté externe de la coquille est de couleur bleu noir à noire et présente de fines stries concentriques. L'intérieur est lui nacré avec un bord violet. Les moules bleues sont des organismes épi-benthiques semi-sessiles accrochés à un substrat solide ou à d'autres individus grâce à des filaments bissaux sécrétés par la glande byssogène contenue dans le pied de l'animal (Figure 1.11).

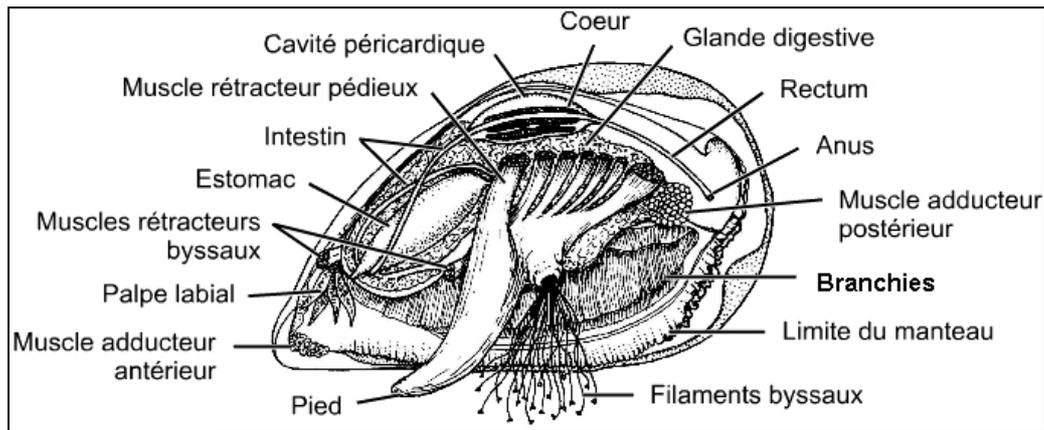


Figure 1.11 : Anatomie générale de *Mytilus edulis* (Newell, 1989).

La moule peut opérer de légers déplacements en sécrétant de nouveaux filaments byssaux et en ajustant la longueur des autres. Cette mobilité réduite permet à l'animal de se repositionner en fonction des courants d'eau ou pour éviter d'être enfoui sous les sédiments.

L'anatomie interne présente des caractéristiques distinctes. Le muscle adducteur postérieur, qui permet de fermer les valves, est bien plus large que le muscle adducteur antérieur (anisomyaire). Au centre de la masse viscérale, on trouve le pied, pigmenté brun, qui peut être déployé afin de sécréter de nouveaux filaments byssaux. Le manteau, qui recouvre chaque côté de la masse viscérale, est attaché le long de la périphérie de chaque valve. Le manteau assure la croissance de la coquille. En deux endroits, au niveau postérieur, les deux lobes du manteau se séparent (au niveau de points de suture) pour former un siphon inhalant et un siphon exhalant, permettant à l'eau de circuler dans la cavité palléale. Les sexes sont habituellement distincts (dioïques), mais certains individus ont parfois les deux sexes (hermaphrodites). Sa croissance est périodique et de type Von Bertalanffy (Newell, 1989). La moule bleue est un suspensivore actif qui filtre les particules organiques présentes dans la colonne d'eau. Les cellules phytoplanctoniques sont la source majoritaire de nourriture et ceci à tous les stades de développement (Figure 1.12). La couronne ciliée génère un courant d'eau qui entraîne les particules alimentaires au voisinage du siphon inhalant. Le flux d'eau gagne la cavité palléale et les particules sont captées par des filaments ciliés situés sur les branchies. La structure branchiale, composée de 2x2 lames, chacune comprenant un feuillet direct et un feuillet réfléchi, assure à la fois le tri des particules alimentaires et l'échange des gaz via l'hémolymphe pompée par le cœur. En fonction de la concentration en particules alimentaires

en suspension, le taux de filtration est croissant jusqu'à atteindre un plateau pour des concentrations supérieures à 5 mg.L^{-1} et décline jusqu'à atteindre une valeur nulle pour des concentrations supérieures à 200 mg.L^{-1} (Widdows *et al.*, 1979a).

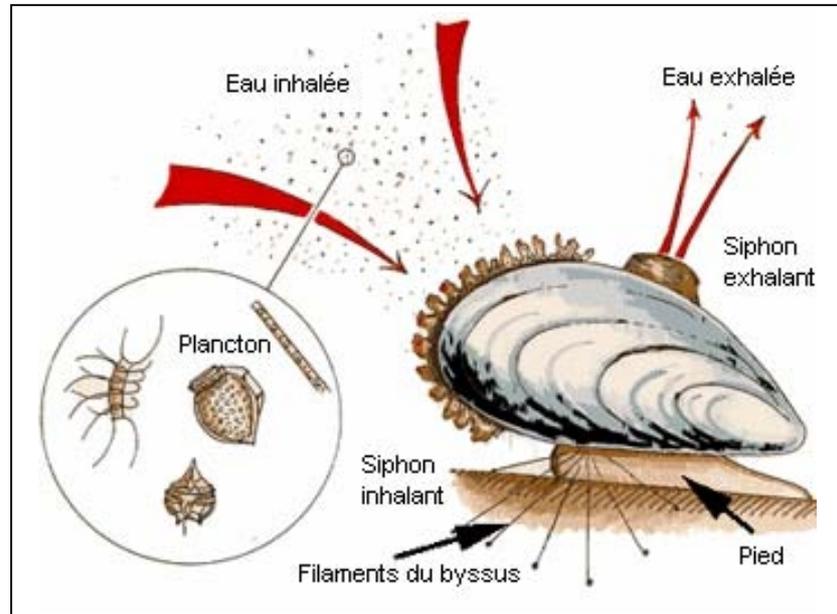


Figure 1.12 : Schéma de l'activité de filtration de *Mytilus edulis*.

M. edulis est un organisme ectotherme, pour lequel la température des tissus dépend des conditions environnementales. La moule bleue résiste à une limite haute de température létale comprise entre 27 et 29°C (Bayne *et al.*, 1977), cette limite dépendant aussi des traits d'histoire de vie de l'organisme testé. La moule bleue tolère une longue période de basses températures et résiste à des températures de -10 , -15°C (Williams *et al.*, 1970). *Mytilus edulis* est un organisme euryhalin qui est présent depuis les plus fortes salinités océaniques (34 ‰) jusqu'aux conditions mésohalines estuariennes ($5 - 18 \text{ ‰}$).

4. Les produits chimiques retenus pour l'étude

4.1. Critères de sélection

Les produits chimiques retenus dans le cadre de ce travail de thèse, ont été sélectionnés à partir de critères bien précis ; ils doivent être connus d'un point de vue comportemental via SEBC comme ayant un caractère flottant, ils doivent être transportés de façon intensive aussi bien en terme de fréquence qu'en terme de tonnage, doivent déjà avoir fait l'objet de déversements accidentels en milieu marin et doivent être reconnus comme pouvant avoir un impact sur l'écosystème aquatique.

Les produits ont été choisis en fonction des résultats du paragraphe 1 auquel nous avons ajoutés un recoupement avec la liste officielle des produits les plus transportés dans le monde définie par le GESAMP. Cette liste, appelée liste des « big movers », présente les 50 substances chimiques les plus transportées en quantité et en fréquence dans le monde.

A ces critères, il faut aussi ajouter des contraintes plus pratiques, comme la facilité de s'approvisionner en produits, la facilité de manipulation en terme de précaution pour les opérateurs...

Les cinq produits suivants ont ainsi pu être sélectionnés (huile de ricin, huile de soja, acide oléique, dioctylphtalate et styrène) auxquels nous avons ajouté le benzène car, bien qu'il soit évaporant selon SEBC, il est transporté en grandes quantités et il est connu comme étant toxique (Marpol C).

4.2. Les caractéristiques des produits chimiques retenus pour l'étude

4.2.1. L'huile de ricin

L'huile de ricin est obtenue par la pression des graines de ricin. Elle est composée d'acide ricinoléique (87%), d'acide oléique (7%), linoléique et palmitique. Initialement utilisée en homéopathie et en cosmétique, l'huile de ricin intervient également dans la fabrication des plastiques (utilisée pour préparer la mousse de polyuréthane) et des élastomères. De même, elle intervient dans la fabrication du Nylon et de certaines fibres de synthèse, notamment le

Rilsan. Cette large utilisation fait de l'huile de ricin un produit très transporté, notamment par voie maritime. Ses caractéristiques sont données dans le tableau 1.14, elle est classée Fp (Flottant persistant) par le code SEBC et D par MARPOL.

4.2.2. L'huile de soja

Le soja, *Glycine*, est une plante de la famille des légumineuses, sous-famille des Papilionoidées, espèce des Phaseolées. Le soja destiné à l'alimentation, et plus particulièrement les produits dérivés de sa transformation (flocons, huiles, tourteaux, protéines), entrent pour presque 60% dans la composition de préparations alimentaires. Outre ses propriétés culinaires, l'huile de soja est également utilisée dans l'industrie chimique pour la fabrication de résines, de savons et de crèmes solaires ou pour la réalisation d'encres, de peintures et de vernis : l'huile favorise leur pouvoir siccatif, c'est-à-dire qu'elle permet d'accélérer leur séchage. Cette huile est classée Fp (Flottant persistant) par le système européen de classification, D par la convention MARPOL et les principales caractéristiques physico-chimiques sont présentées dans le tableau 1.14.

4.2.3. Le dioctylphtalate (DOP)

Ce composé entre dans la composition de nombreux plastifiants (au-delà de 50% des plastifiants de type phtalate), dans les revêtements de plancher et dans certains caoutchoucs ainsi que dans de nombreux produits à base de vinyle. Sa production mondiale est estimée à 1000 kt par an. Ses caractéristiques sont données dans le tableau 1.14, elle est classée F par le code SEBC et fait partie des produits chimiques non classés par MARPOL (annexe III de Marpol).

4.2.4. L'acide oléique

L'acide oléique est une molécule très utilisée dans des domaines très variés tels que la synthèse de carburants, de lubrifiants, de tensioactifs, de solvants... Tout comme l'huile de ricin, elle est beaucoup transportée par voie maritime. Ses caractéristiques sont données dans le tableau 1.14. L'acide oléique est classée Fp par le SEBC code et D par MARPOL.

4.2.5. Le styrène

L'utilisation du styrène est très largement répandue. Il entre notamment dans la synthèse du polystyrène, du latex, du caoutchouc... De plus, il est classé FE selon la classification européenne et B par MARPOL (Tableau 1.14). Enfin, le tableau montre qu'il fait partie des

produits qui sont le plus fréquemment déversés en mer (par exemple le naufrage du *Ievoli Sun* au large de Cherbourg, en octobre 2000).

4.2.6. Le benzène

Le benzène est un composé utilisé comme matière première dans la synthèse du styrène (plastiques polystyrènes et caoutchoucs synthétiques), du phénol (résines phénoliques), du cyclohexane (nylon), des alkylbenzènes (détergents), et de bien d'autres produits utilisés dans la production de drogues, de teintures, d'insecticides et de plastiques. Il est également utilisé comme solvant. Il a été choisi pour cette étude car il est très transporté en Manche et il apparaît régulièrement dans les ports français. De plus, il est classé E selon la classification européenne et C par MARPOL (Tableau 1.14).

Tableau 1.14 : Principales caractéristiques des produits chimiques choisis ; L = état liquide
(source : [http : www.cdc.gov](http://www.cdc.gov)).

<i>Produit chimique</i>	<i>MARPOL</i>	<i>Code SEBC</i>	<i>Point de fusion °C</i>	<i>Point d'ébullition °C</i>	<i>Point éclair °C</i>	<i>Etat physique</i>	<i>Densité</i>	<i>Solubilité à 20°C (g.L⁻¹)</i>
<i>Huile de ricin</i>	D	Fp	-12,0	313,0	229	L	0,959	<1
<i>Huile de soja</i>	D	Fp	-10,0	élevé	540	L	0,927	< 0,10
<i>Acide oléique</i>	D	Fp	-13,4	286,0	189	L	0,891	Insoluble
<i>Dioctylphtalate (DOP)</i>	III	F	-55	386,9	199	L	0,986	0,00034
<i>Styrène</i>	B	FE	-31,0	145,0	32	L	0,904	0 ,30
<i>Benzène</i>	C	E	5,5	80,1	-11	L	0,870	1,80

CHAPITRE 2 : MATERIEL ET METHODES

Introduction

A ce jour, très peu de connaissances sur le comportement des produits chimiques après déversement en mer sont accessibles dans la littérature. La classification européenne qui regroupe les produits en fonction de leurs propriétés physico-chimiques en eau douce, ne permet pas de prédire leur devenir en mer.

Pour répondre à cette problématique, nous nous sommes proposés :

1. de concevoir une méthodologie au laboratoire susceptible d'apporter des données sur la dispersion naturelle du ou des produits chimiques déversés.
2. de développer l'outil cellules flottantes utilisées pour les hydrocarbures afin de permettre l'étude du comportement des produits chimiques en milieu semi-ouvert, et notamment des processus d'évaporation et de dispersion naturelle dans la colonne d'eau ;
3. de procéder à une expérimentation en mer ouverte ayant pour objectif de valider les résultats obtenus lors des deux phases précédentes.

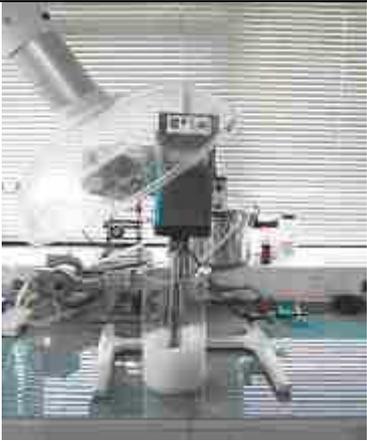
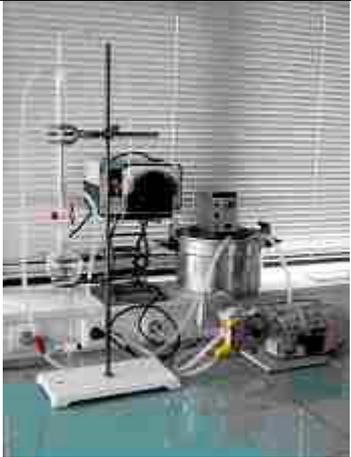
1. Les trois échelles expérimentales

1.1. Méthodologie au laboratoire

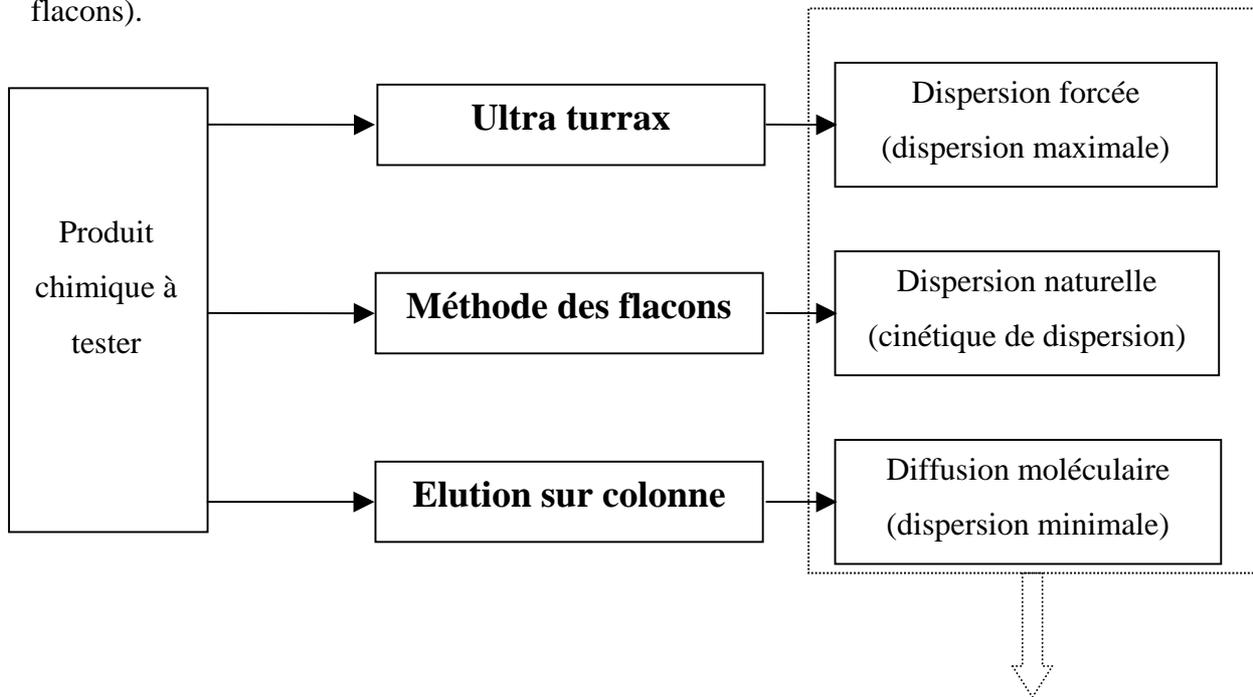
A l'échelle du laboratoire, une méthodologie permettant de caractériser la dispersion naturelle d'une substance chimique a été définie, développée puis installée. Cette méthodologie résulte de l'adaptation à l'eau de mer, des normes AFNOR T20-046, T20-045 et EPA OPPTS 830.7840, OPPTS 830.7860. Elle a pour finalité la définition des propriétés présentées dans le tableau 2.1 : la dispersion maximale, la cinétique de dispersion naturelle et la diffusion moléculaire. Les différentes normes utilisées ne s'appliquant qu'à l'eau douce, et pour une température de 20°C, il a fallu modifier les protocoles afin de répondre aux besoins de cette étude. Cette partie expérimentale qui englobe trois tests complémentaires permet d'obtenir des informations sur les processus de dispersion naturelle des produits chimiques dans la colonne d'eau, processus qui sont constitués des phénomènes d'émulsification directe et de solubilisation. Le premier test, l'ultra turrax, de part l'agitation vigoureuse qu'il produit, permet d'obtenir la dispersion naturelle maximale d'un composé (prise en compte de la partie dissoute et émulsionnée du produit). Ce test, rapide et simple d'utilisation, permet de prédire si le composé sera très, peu ou pas soluble. Le second test, la méthode des flacons (shake

flask), permet de caractériser la cinétique de dispersion naturelle du produit. Cette méthode permet de suivre l'évolution de la concentration d'un produit au cours du temps en tenant compte des processus de dissolution et d'émulsification. Elle est tout à fait adaptée pour les substances de solubilité supérieure à 10^{-2}g.L^{-1} comme le styrène. Le troisième test, l'élution sur colonne, permet de définir la diffusion moléculaire du produit. Seule la partie dissoute est mesurée car les échanges se font en douceur minimisant le risque de formation de colloïdes. Cette méthode est particulièrement adaptée aux composés faiblement solubles dans l'eau (solubilité inférieure à 10^{-2}g.L^{-1} comme l'acide oleique).

Tableau 2.1 : Appareillage et avantages des méthodes utilisées

	<p><u>Dispersion maximale</u></p> <p>L'Ultra Turrax</p> <ul style="list-style-type: none"> • Pour tous produits, indépendant de la solubilité. • Rapide et simple d'utilisation.
	<p><u>Cinétique de dispersion naturelle</u></p> <p>Le Shake Flask</p> <ul style="list-style-type: none"> • Produits solubles. • Possibilité de mettre une forte quantité de produit, d'où expérience adaptée au produit très soluble.
	<p><u>Diffusion moléculaire</u></p> <p>L'Élution sur Colonne</p> <ul style="list-style-type: none"> • Produits peu solubles dans l'eau. • Peu de produit chimique utilisé. • Augmentation de la surface d'échange. • Echange en douceur. • D'où une diminution du risque de formation de colloïdes.

En combinant les 3 tests (Figure 2.1), il a été possible de définir une méthodologie capable de déterminer les limites inférieure (via l'éluion sur colonne) et supérieure (via l'ultra turrax) de dispersion naturelle d'un produit chimique ainsi que sa cinétique de dispersion (méthode des flacons).



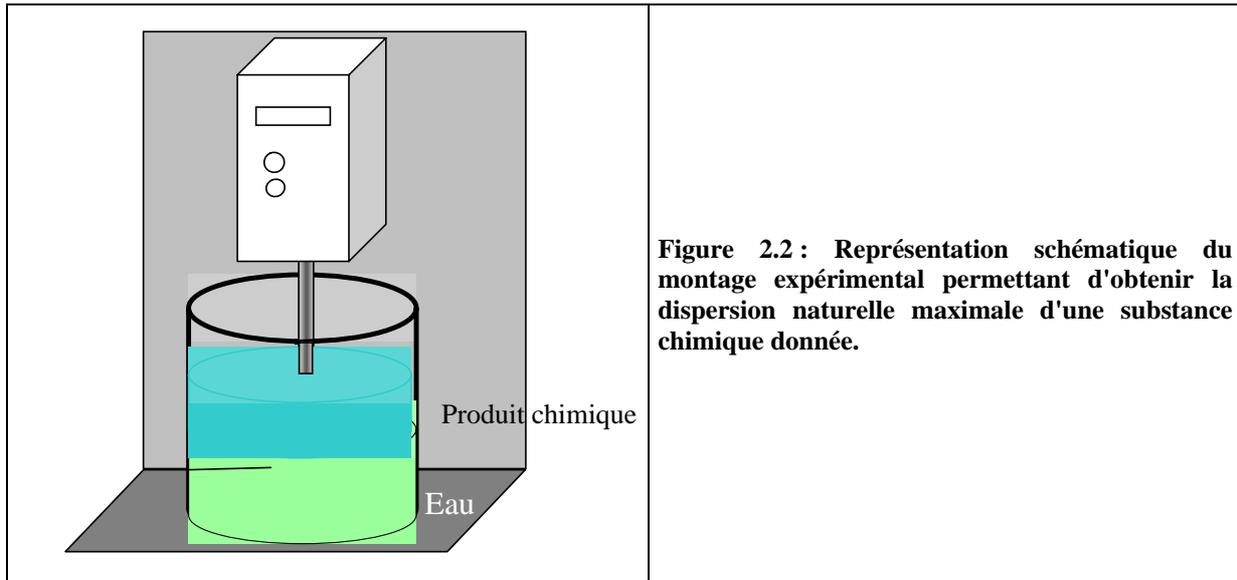
Caractérisation de la dispersion

Figure 2.1 : Méthodologie pour caractériser la dispersion naturelle d'un produit en phase aqueuse.

1.1.1. Dispersion maximale

L'Ultra-turrax est un pré-test qui permet d'avoir la dispersion naturelle maximale d'un composé (Figure 2.2). L'expérimentation est destinée à mettre en contact, dans un bécher en verre, 100 ml d'eau et un excès du produit chimique étudié (5 g). Une agitation violente correspondant à 10000 rpm (tr/min) est générée à l'aide de l'Ultra Turrax pendant une période de 5 minutes. La suite de ce protocole d'extraction est identique pour les trois méthodes utilisées (dispersion maximale, dispersion naturelle et diffusion moléculaire) à l'exception de la filtration qui n'est pas effectuée dans le cadre de la diffusion moléculaire. La solution obtenue est alors filtrée sur un filtre plissé (Whatman de type 2V, grammage de 103g.m⁻²) afin d'éliminer les particules dispersées. Le filtrat est transvasé dans une ampoule à décanter de 250 ml, après l'avoir pesée, afin de pouvoir déterminer le volume exact d'eau. Une extraction liquide-liquide est réalisée par 3x30mL de dichlorométhane (CH₂Cl₂, pestipur®) (agiter 2 min. à chaque fois). Le mélange est laissé à décanter puis les deux phases sont séparées. Les

phases organiques récupérées sont séchées sur du sulfate de sodium (Na_2SO_4) anhydre. Cette phase organique est concentrée à l'aide d'un évaporateur rotatif sans évaporer à sec. Le concentré est transvasé dans une fiole jaugée de 10 ml et complété jusqu'au trait de jauge avec du dichlorométhane (pestipur®). Une partie de cette solution est transvasée dans un vial de 2 ml et l'analyse en GC/MS est réalisée avec une méthode adéquate. La concentration en substance dissoute est déterminée à l'aide de la courbe d'étalonnage préalablement établie. L'étalon interne est introduit avant l'extraction

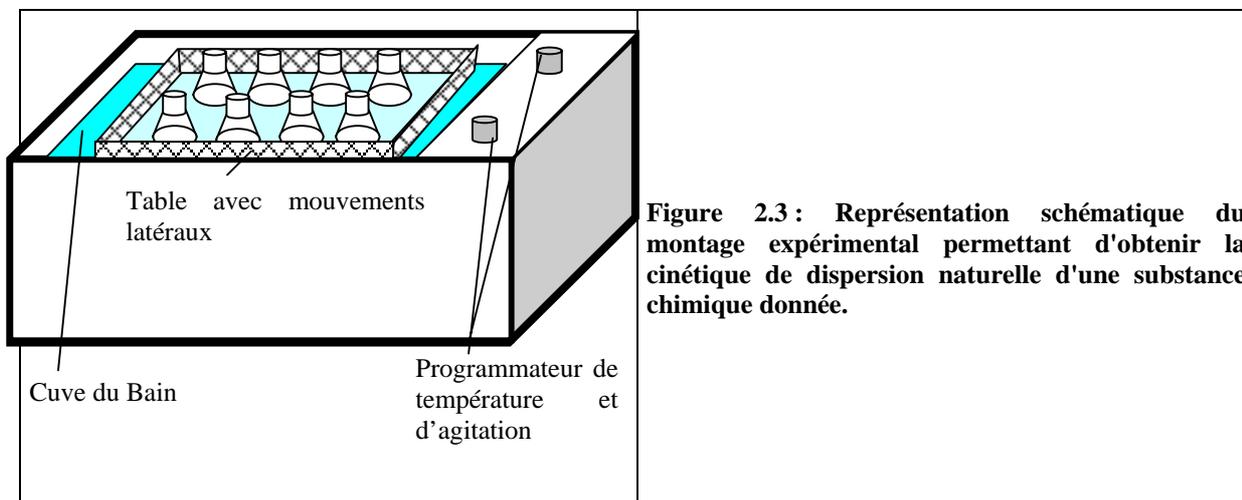


1.1.2. Dispersion naturelle

Ce test (Figure 2.3) permet de suivre la cinétique de dispersion naturelle d'un produit chimique. En fonction des conditions d'essai choisies, il peut également prendre en compte les processus d'émulsification. En effet, avec une agitation nulle, seule la cinétique de solubilisation est déterminée, alors que avec une agitation élevée, la concentration obtenue est le résultat des processus de solubilisation et d'émulsification directe (dispersion naturelle).

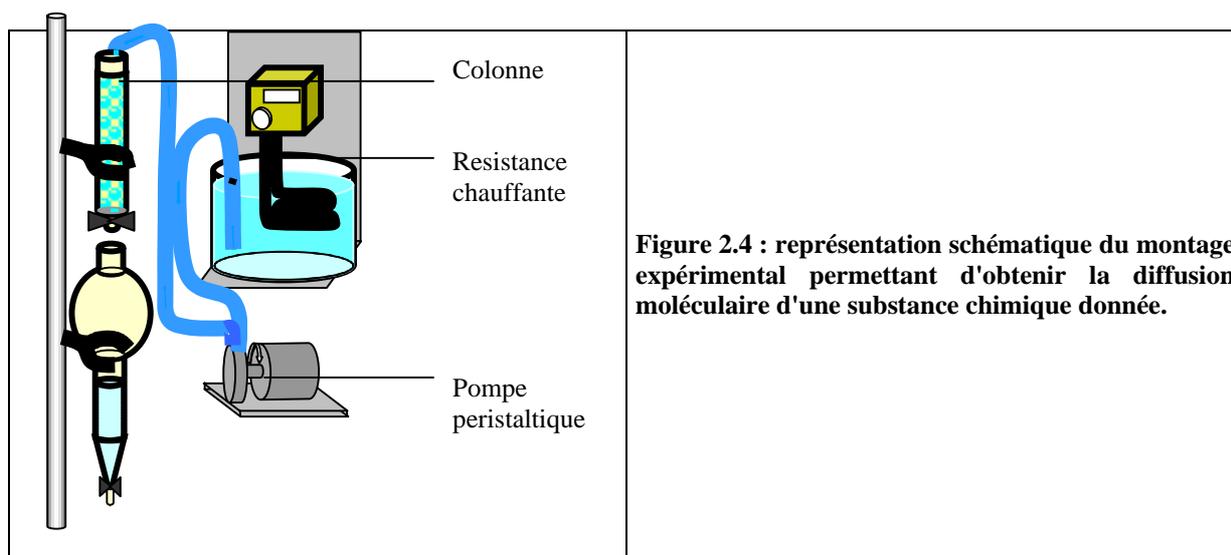
L'expérimentation consiste à mettre en contact, dans un erlenmeyer rodé en verre et muni de son bouchon, 100 ml d'eau et 5 g du produit chimique étudié. Onze erlenmeyers sont remplis de volumes identiques d'eau et de substance chimique et placés sur une table d'agitation horizontale. Cette table d'agitation effectue des mouvements latéraux (200 rpm (tr/min), 35 mm d'amplitude). Elle possède un bain-marie thermostaté pouvant s'adapter aux besoins de l'expérimentation. Un triplicat est prélevé toutes les 15 minutes. L'expérimentation est répétée autant de fois que la cinétique étudiée l'impose. Le mélange contenu dans l'erlenmeyer est transvasé dans une ampoule à décanter de 250 ml et laissé au repos pendant

5 min. Le protocole d'extraction est le même que celui utilisé lors de la détermination de la dispersion maximale (cf 1.1.1).



1.1.3. Diffusion moléculaire

L'expérimentation est destinée à mettre en contact des microbilles de verre contaminées à un courant d'eau à débit fixe (Figure 2.4). Les billes de verre de 0,2 mm de diamètre sont nettoyées dans un four à 400°C pendant quatre heures. Une masse de 25 g est placée dans un ballon de 100 ml contenant 5% en masse (des billes) de produit chimique et 50 ml de dichlorométhane pestipur®. Après l'obtention d'un mélange homogène, le solvant est évaporé à l'évaporateur rotatif. Une colonne à chromatographie (de 25 cm x 1 cm) équipée d'un morceau de coton de verre et préalablement remplie d'eau est disposée à recevoir ces billes de verre. Le système est laissé à l'équilibre pendant une nuit. Cette colonne est reliée à une pompe péristaltique permettant le passage d'un courant d'eau à un débit de 25 ml.h⁻¹ pour générer la solution saturée. L'eau en sortie de colonne est récupérée dans une ampoule à décanter de 250 ml. Toutes les quatre heures, soit tous les 100 ml, cette ampoule est remplacée par une nouvelle ampoule, tarée, correspondant à un nouveau prélèvement. L'ampoule à décanter pleine est pesée et l'étalon interne y est introduit. La suite du protocole de l'extraction liquide-liquide est identique à celui utilisé précédemment.



1.1.4. Validation de la méthodologie

La méthodologie définie a été validée en caractérisant la dispersion naturelle du nonylphénol, produit chimique largement documentée dans la littérature scientifique (Handbook, www.cdc.gov). Le nonylphénol (NP) est un produit de dégradation naturelle des éthoxylates de nonylphénol (NPE), ces derniers étant produits en grandes quantités par l'industrie chimique. Les NPE sont utilisés comme détergents, émulsifiants, agents de mouillage et agents dispersants. Ils sont présents dans différents secteurs industriels dont le textile, la papeterie, la fabrication d'acier ou encore la production d'énergie. Ces produits sont relargués dans l'environnement via les effluents industriels, les effluents des stations d'épurations, et surtout par rejet direct. Le NP est un produit très toxique, facilement bioaccumulable par les poissons ainsi que la majorité des organismes marins. Il se présente sous la forme d'un liquide visqueux jaune pâle qui a une légère odeur phénolique. Ses principales caractéristiques physico-chimiques sont présentées dans le tableau 2.2. Les résultats de la validation ont permis de mettre en évidence que la méthodologie est

Tableau 2.2 : Caractéristiques physico-chimiques du nonylphénol (www.cdc.gov)

Formule brute	$C_{15}H_{24}O$
Masse moléculaire	220.35 g/mol
Point d'ébullition	293-297°C
Point de fusion	2°C
Point éclair	140°C
Densité	0.950 (à 20°C)
log K_{ow}	3.28 à 4.48
Pression de vapeur	0.01 kPa (à 20°C)
Viscosité	563 cP (à 20°C)
Solubilité (eau douce)	4.9 – 5.3 mg.L ⁻¹

1.2. Etude du comportement des produits chimiques en cellules flottantes



Figure 2.5 : Photographie du dispositif expérimental complet en rade abri de Brest.

Le *Cedre* dispose d'un outil expérimental unique que sont les cellules flottantes et qui permet d'étudier le devenir des produits pétroliers et chimiques une fois déversés dans l'environnement marin. Les tests *in situ* sont réalisés dans six cellules flottantes disposées en rade abri de Brest, dans l'enceinte du port militaire (Figure 2.5).

Chacune de ces cellules flottantes couvre une surface de 9 m^2 , confinée par une jupe en polyéthylène de 3 m de hauteur fixée sur une structure métallique (Figure 2.6). Les parois des cellules sont souples afin de permettre le transfert de l'énergie de l'extérieure vers l'intérieure des cellules. De plus, n'étant pas couvertes, les nappes de produits sont soumises à l'influence des conditions météo, notamment du vent, de la pluie et de l'ensoleillement. Cet outil permet de réaliser l'étude du vieillissement de produits chimiques en fonction de paramètres environnementaux non contrôlés. La solubilité, la viscosité, l'émulsification et la densité sont des paramètres suivis au cours de leur vieillissement. Les produits déversés subissent à la fois l'influence des facteurs hydrodynamiques (houle, vagues, marées...) et l'influence de changements météorologiques (ensoleillement, pluie, vent...). Les produits chimiques déversés dans le cadre de cette étude sont l'huile de ricin (Fp), l'huile de soja (Fp), l'acide oléique (Fp), la DOP (F), le styrène (FE) et le benzène (E).

Le comportement des produits chimiques est étudié sur une période de 5 jours : à T_0 , 50 litres du produit sont déversés et l'échantillonnage débute à T_{+3h} jusqu'à T_{+96h} (Tableau 2.3).

La plate-forme expérimentale se compose de six de ces cellules disposées selon une orientation Nord-Sud, dans le port militaire de Brest (Figure 2.7).

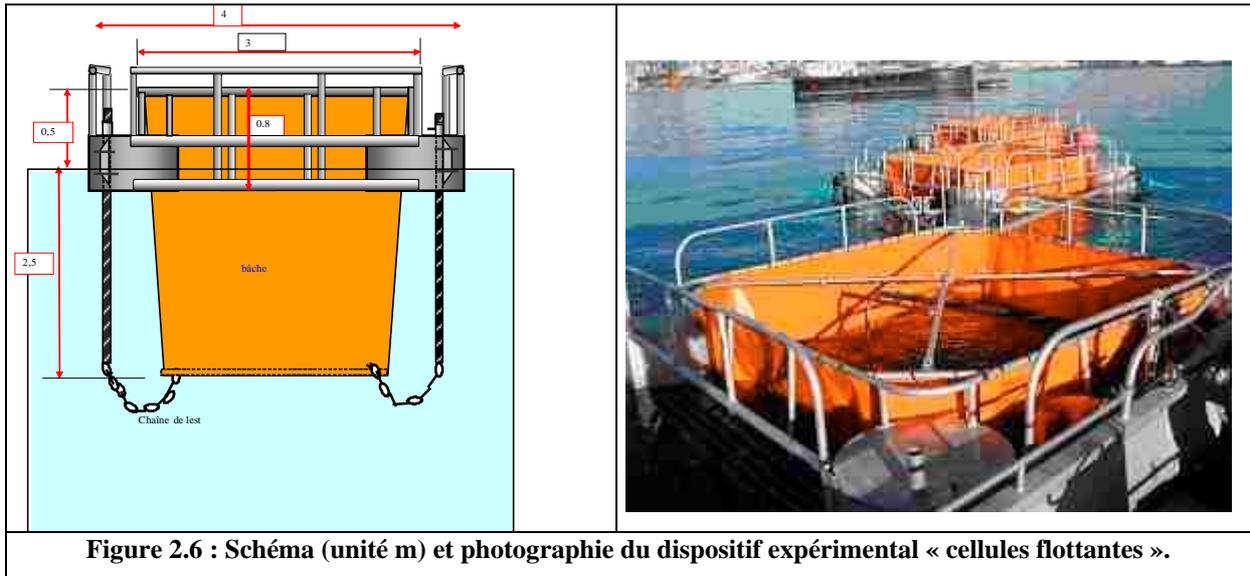


Figure 2.6 : Schéma (unité m) et photographie du dispositif expérimental « cellules flottantes ».

Tableau 2.3 : Planning des échantillonnages.

	1 ^{er} jour		2 nd jour	3 ^{ième} jour	4 ^{ième} jour	5 ^{ième} jour
	T ₀	T _{+3h}	T _{+24h}	T _{+48h}	T _{+72h}	T _{+96h}
Déversement des produits	X					
Prélèvements dans la nappe en surface	X	X	X	X	X	X
Prélèvements dans la colonne d'eau		X	X	X	X	X
Analyses en SF-UV		X	X	X	X	X
Nettoyage des cellules						X

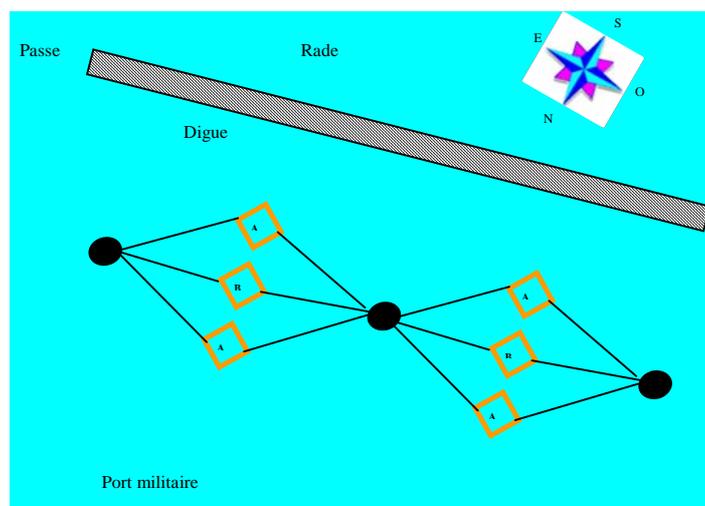


Figure 2.7 : Disposition de la plate forme expérimentale en rade abri.

Lors de chaque expérimentation, deux produits chimiques sont testés simultanément chacun dans deux cellules flottantes (A) selon le dispositif expérimental présenté sur la figure 2.7. Les deux cellules non utilisées (B) ont permis de contrôler la dispersion des produits hors de leurs cellules flottantes. Les deux produits chimiques étudiés présentaient un profil de danger différent permettant un vieillissement et des mesures en parallèle.

1.3. Validation en mer ouverte : expérimentation RAPSODI II

RAPSODI (Remote sensing Anti Pollution System for geOgraphic Data Integration) est un projet européen qui porte sur la télédétection de polluants flottants et auquel participent plusieurs organismes et sociétés européennes (Thales, France ; l'« European Commission Joint Research Centre »,Grèce ; l'Institut de Geomatique, Espagne et le *Cedre*, France).L'expérimentation en mer RAPSODI II est réalisée en liaison avec ce projet européen et a fait suite à une première campagne RAPSODI I au cours de laquelle seuls des déversements d'hydrocarbures ont été effectués. Le but était alors d'étudier leur comportement en mer (objectif lié à la programmation du *Cedre*) et leur détection (objectif lié au projet Rapsodi).

RAPSODI II a été planifiée sur une durée de cinq jours afin d'adapter le déroulement des expérimentations aux conditions météo-océaniques sur zone et de respecter au mieux le programme initialement défini en collaboration avec la Marine Nationale et, plus particulièrement la CEPPOL.

Les objectifs de cette expérimentation sont d'étudier :

- la précision d'outils de télédétection, embarqués à bord d'aéronefs, pour déterminer leur efficacité dans le cadre d'un déversement de produits chimiques en mer par Thales, l'« European Commission Joint Research Centre » et l'Institut de Geomatique.
- le vieillissement et le devenir à court terme des produits flottants par le laboratoire du *Cedre*; pour cela un échantillonnage de surface est réalisé, afin de suivre les variations de viscosité, de densité et les processus d'émulsification. En parallèle, une analyse en continu de la colonne d'eau est effectuée afin de suivre la dispersion naturelle des produits déversés ;

Les produits étudiés sont choisis selon des critères de non toxicité vis-à-vis des expérimentateurs et de l'écosystème marin (faible toxicité, pas explosif, faible évaporation, etc). C'est pourquoi le styrène et le benzène sont exclus et deux huiles végétales (huile de soja et huile de ricin), un acide (acide oléique ou AO) et un phtalate (dioctylphtalate ou DOP) sont retenus. Au total, 1600 l de chaque produit sont déversés après ajout de colorant (rouge organol) afin de repérer et de suivre plus facilement l'évolution des nappes dans l'environnement marin.

1.3.1. Localisation de la zone d'expérimentation

La zone d'expérimentation retenue se situe au large de la pointe de Penmarc'h dans un cercle de 2 milles de rayon autour du point ayant pour coordonnées $47^{\circ} 50' N$, $05^{\circ} 10' W$ (Figure 2.8). Ce point est à 36 nautiques dans le 258 de la pointe de Penmarc'h, en zone Iroise (Pointe Finistère). Il a été choisi suffisamment éloigné des côtes pour limiter au maximum le risque d'arrivage à terre d'une partie des produits déversés.

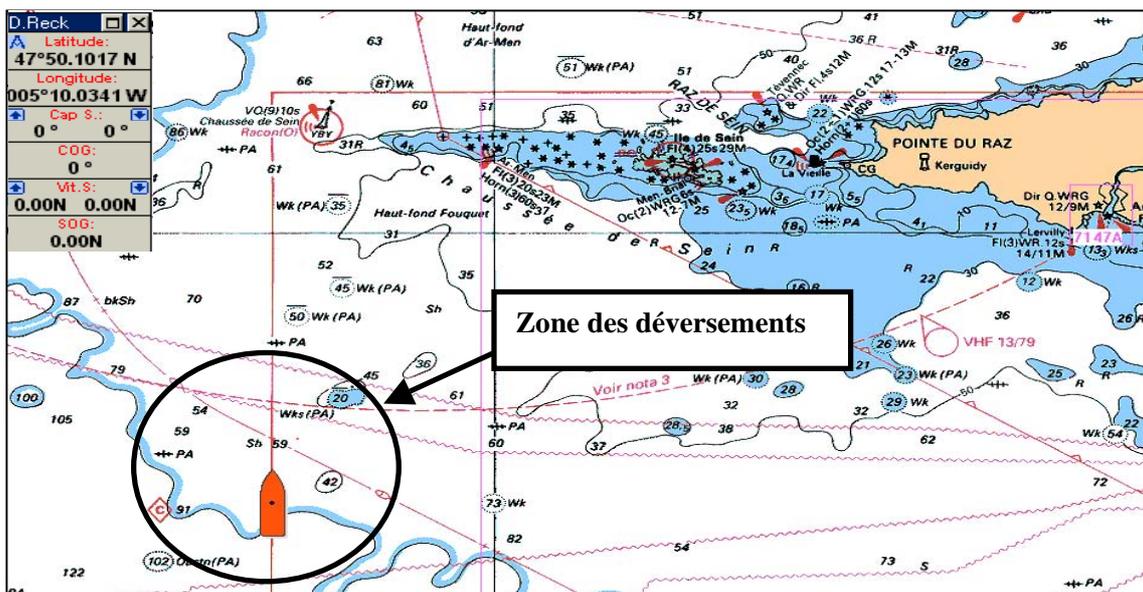
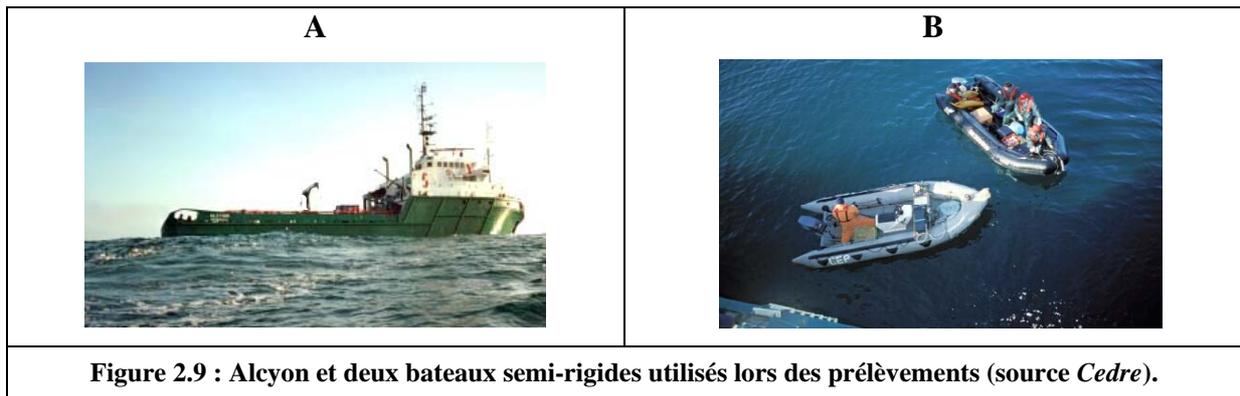


Figure 2.8 : Localisation de la zone d'expérimentation RAPSODI II.

1.3.2. Moyens nautiques et aériens

Le navire qui a servi de support pour l'expérimentation RAPSODI II est l'Alcyon affrété par la marine nationale (Figure 2.9A). Un laboratoire mobile est installé sur le pont du navire pour une analyse immédiate des échantillons prélevés en surface.



L'échantillonnage dans la colonne d'eau et en surface a été réalisé par deux bateaux (zodiac) semi-rigides (Figure 2.9B) : le Palmor du *Cedre* (pneumatique n°1) et un bateau de la Cellule antipollution, la CEPPOL (pneumatique n°2).

Des bouées dérivantes ont également été embarquées :

- Une bouée Marisonde (Météo France) pour recueillir les paramètres environnementaux (température de l'eau et de l'air, direction et force du vent) ;
- Cinq bouées Norda (CEPPOL et *Cedre*) pour localiser et suivre les nappes. Pour les repérer plus facilement en cas de visibilité réduite, ces bouées numérotées sont équipées de « flash-light » (lampes à éclats) et d'adhésifs réflecteurs.

Les moyens aériens sont conséquents car cette expérimentation a aussi pour but, d'approfondir les connaissances en détectabilité des produits par différents outils de télédétection. Des avions de télédétection de plusieurs pays européens (Allemagne, Belgique, Hollande et France) devaient participer à cette expérimentation. Toutefois en raison des mauvaises conditions météo, seul les avions français (POLMAR II) et allemand ont pu effectuer leurs survols (Figure 2.10).



Figure 2.10 : Avion français POLMAR II et avion de télédétection allemand (source Cedre).

Ces avions ont effectué des survols successifs sur zone immédiatement après le déversement des produits. Ces deux appareils sont équipés de moyens de télédétection de type Side Looking Airbone Radar (SLAR) et Ultra Violet - Infra Rouge (UV-IR). En complément, un hélicoptère LYNX de la Marine Nationale a participé aux survols afin de positionner les embarcations pneumatiques en charge des échantillonnages sur les nappes, de réaliser des prises de vue et de schématiser l'étalement des nappes au cours du temps.

1.3.3. Planning des opérations

Du fait de l'absence de vent, les quatre déversements ont été réalisés en un seul jour selon une direction perpendiculaire au courant, cap au 280 (Figure 2.11).

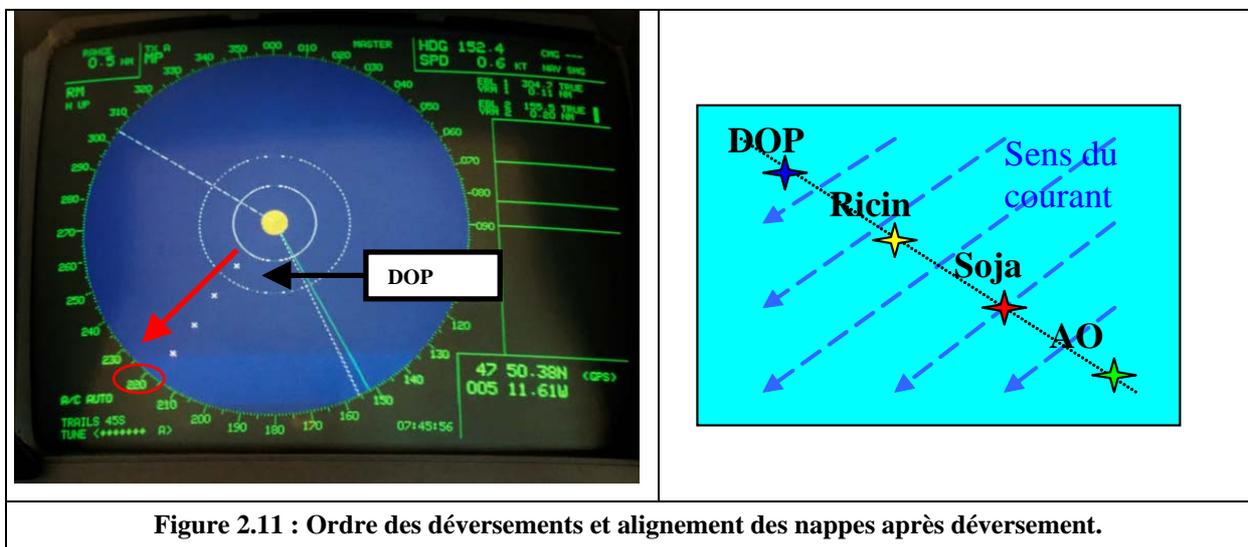


Figure 2.11 : Ordre des déversements et alignement des nappes après déversement.

Ces déversements ont été effectués à partir de cuves cylindriques larguées dans l'eau l'une après l'autre (Figure 2.12), cuves accompagnées des bouées Norda qui les marquent et espacées de 200 à 250 mètres.

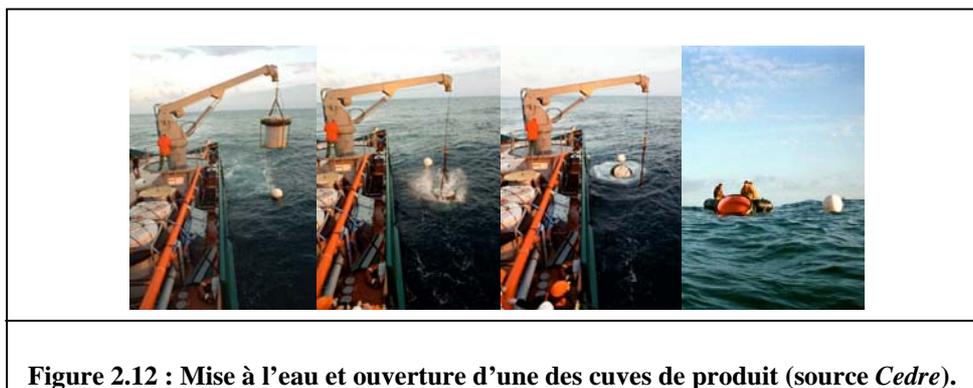


Figure 2.12 : Mise à l'eau et ouverture d'une des cuves de produit (source Cedre).

Dans la nappe de produit le bateau n°1 a effectué des prélèvements de surface et le n°2 des mesures, en profondeur à l'aide d'un spectrofluorimètre de terrain (SF-UV), en continu et la moyennant toutes les 3 s.

Chaque nappe a fait l'objet de 3 échantillonnages de surface à chaque temps de prélèvement (3 temps : T1, T2, T3), ce qui représente au total 9 échantillons par nappe (T1A/T1B/T1C, T2A/T2B/T2C et T3A/T3B/T3C). Pour chaque échantillon, la densité (Norme Française NF T 66-107, 1957) et la viscosité ont été directement déterminées à bord du laboratoire embarqué et un aliquote a été conservé afin de mesurer sa teneur en eau au laboratoire du *Cedre* selon la norme française NF T 60-113 de 1970.

Les différentes phases de l'échantillonnage et des survols aériens se sont déroulées selon le protocole présenté sur la figure 2.13.

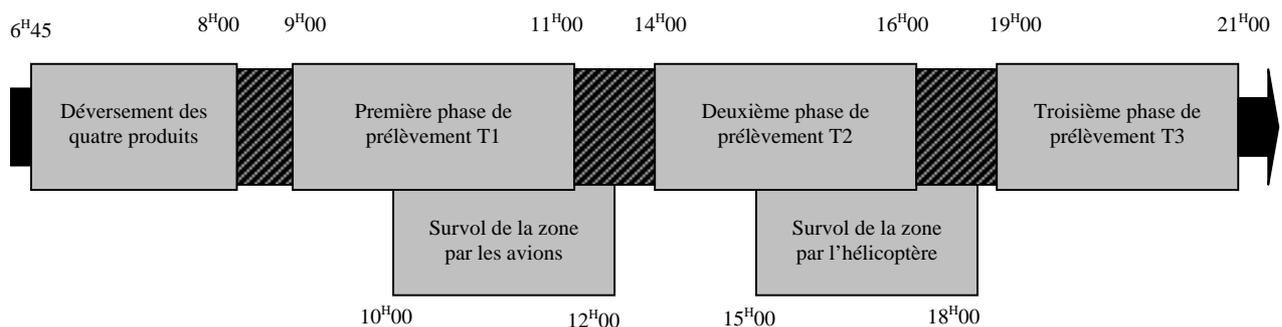


Figure 2.13 : Chronologie des opérations.

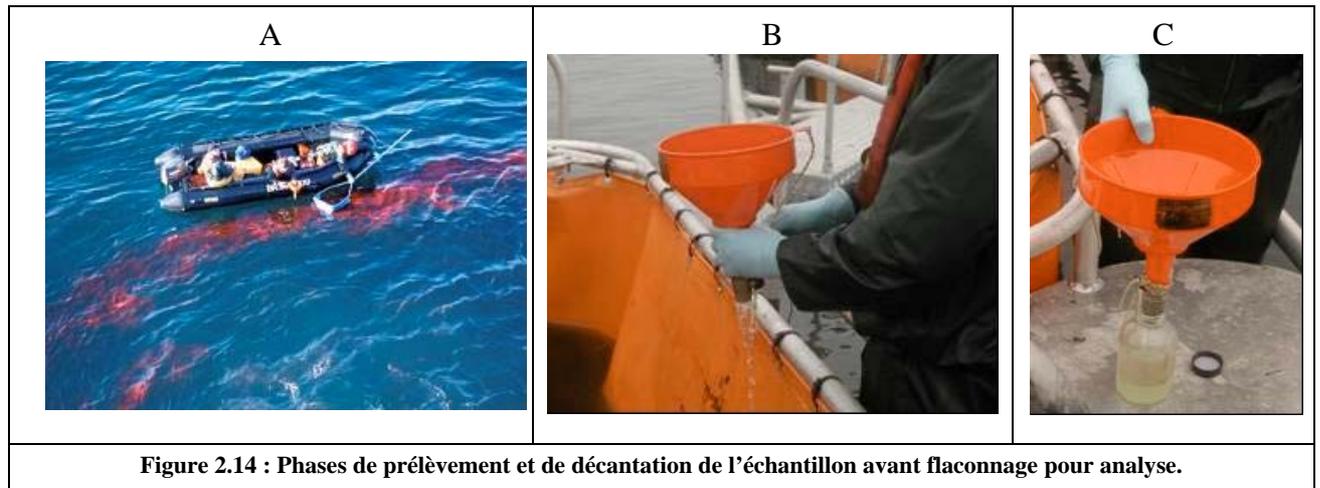
2. Techniques de prélèvement des échantillons

2.1. Échantillonnage des nappes de produits ; la surface

Le suivi du vieillissement des nappes à la surface de l'eau est réalisé à l'aide d'échantillonnages systématiques de ces nappes selon un échancier bien précis. Pour l'expérimentation en mer, l'échantillonnage de la nappe est réalisé après confinement de la quantité de produit nécessaire aux analyses (Figure 2.14A).

Cet échantillonnage s'effectue à l'aide d'un entonnoir à robinet. L'échantillon est laissé à décanter dans l'entonnoir environ 5 min, puis l'eau prélevée est éliminée en ouvrant le robinet de façon à ne garder que le polluant qui est alors transféré dans un flacon en verre

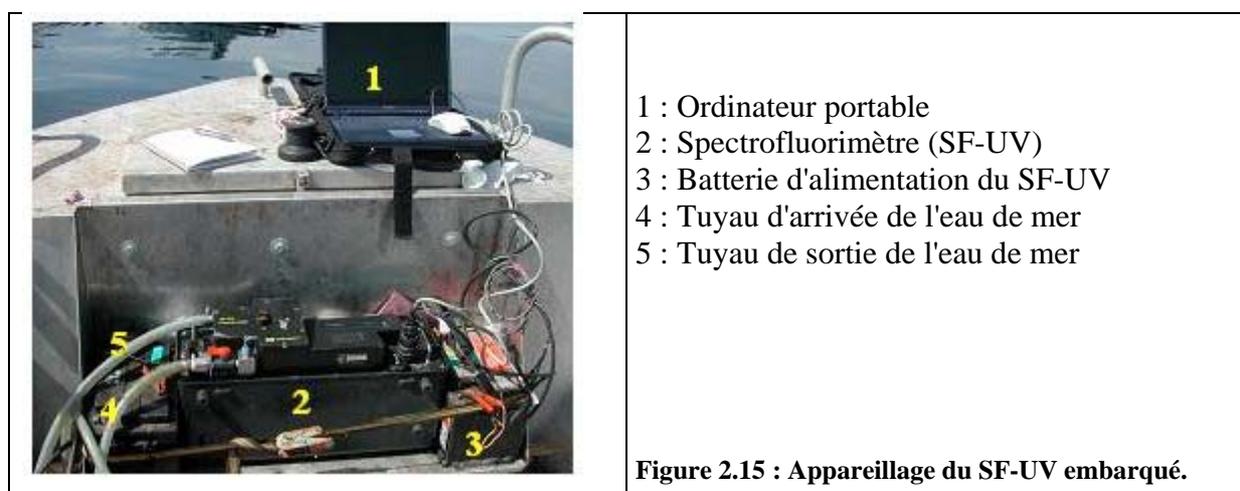
(Figures 2.14B et C). Cet échantillon permet une analyse au laboratoire de la densité, la teneur en eau et de la viscosité.



2.2. Echantillonnage et analyse ; la colonne d'eau

Le transfert du produit de la surface vers la colonne d'eau selon des processus de dispersion naturelle (solubilisation et émulsification directe) est étudié à l'aide d'un spectrofluorimètre embarqué de type Turner Design 10 AU (SF-UV).

Les analyses en SF-UV sont réalisées en continu : l'eau est pompée, puis elle passe dans la cellule du spectrofluorimètre pour détection et analyse qualitative des produits dissous, avant d'être rejetée en mer. La réponse en fluorescence est directement envoyée sur un ordinateur portable pour un enregistrement en continu (Figure 2.15).



Lors des essais en cellules flottantes et pour chaque cellule expérimentale, les mesures en SF-UV sont réalisées en quatre points distincts, toujours les mêmes afin d'être reproductible (Figure 2.16). A chacun de ces points, l'échantillonnage est réalisé à quatre profondeurs différentes (2m, 1,5m, 1m et 0,5m) en procédant à une mesure en continu sur 1 min par profondeur, en sachant que le SF-UV détermine une concentration toutes les 3 secondes. Cette procédure a permis d'obtenir 20 mesures par profondeur, soit 80 mesures par point de prélèvement et au total 320 mesures par cellule à chaque date d'échantillonnage.

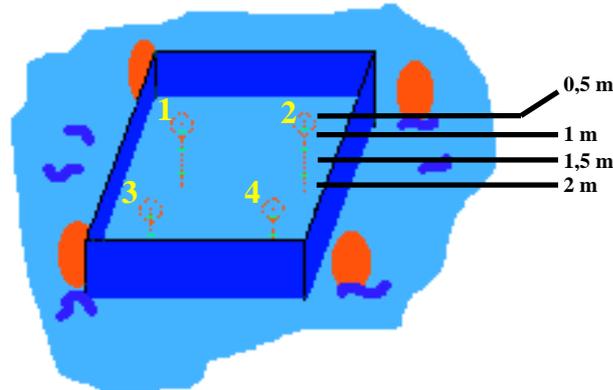


Figure 2.16 : Points de prélèvement selon la localisation dans la cellule et la profondeur.

Les concentrations obtenues selon cette technique ne sont que relatives et doivent être corrigées à l'aide de concentrations mesurées sur des échantillons prélevés à 0,50 m de profondeur simultanément aux mesures en SF-UV. Ces échantillons sont traités et analysés au laboratoire en GC-MS après extraction liquide – liquide (cf 3.3).

Pour l'expérimentation en mer RAPSODI II, la colonne d'eau se trouvant sous chaque nappe est analysée en SF-UV (1 mesure toutes les 3 secondes) à chaque temps d'échantillonnage. 3 échantillonnages à 1 m de profondeur sous chaque nappe sont pris et ceci pour chaque temps de prélèvement (3 temps : T1, T2, T3), ce qui représente au total 9 échantillons par nappe (T1A/T1B/T1C, T2A/T2B/T2C et T3A/T3B/T3C) afin de corriger les résultats obtenus en SF-UV. Ces échantillons sont traités et analysés au laboratoire selon le même procédé que ceux issus des cellules flottantes (extraction liquide – liquide puis analyse en GC-MS).

3. Techniques analytiques utilisées

3.1. Détection et quantification des produits chimiques dans l'atmosphère

Lors des expérimentations en cellules flottantes les cinétiques d'évaporation des produits testés sont étudiées. La détection des vapeurs dans l'air est basée sur la ionisation des molécules organiques à l'aide d'un rayonnement ultraviolet. Le détecteur à photoionisation (ou PID) permet de détecter la présence d'un polluant donné en faible concentration. La limite de détection est de l'ordre du ppm. Le PID utilisé est un PID MiniRAE 2000 (RAE systems) équipé d'une lampe UV de 10,6 eV. Ce détecteur pompe de l'air en continu à un débit de $500 \text{ cm}^3 \cdot \text{min}^{-1}$, a été programmé de façon à moyennner, toutes les 30 secondes, les mesures recueillies. Il permet également d'obtenir les valeurs minimales et maximales du nuage gazeux sur cette période.

Les mesures commencent tout de suite après le déversement des produits chimiques, le PID étant positionné sous le vent de façon à détecter et quantifier le nuage gazeux là où il est maximal (Figure 2.17).

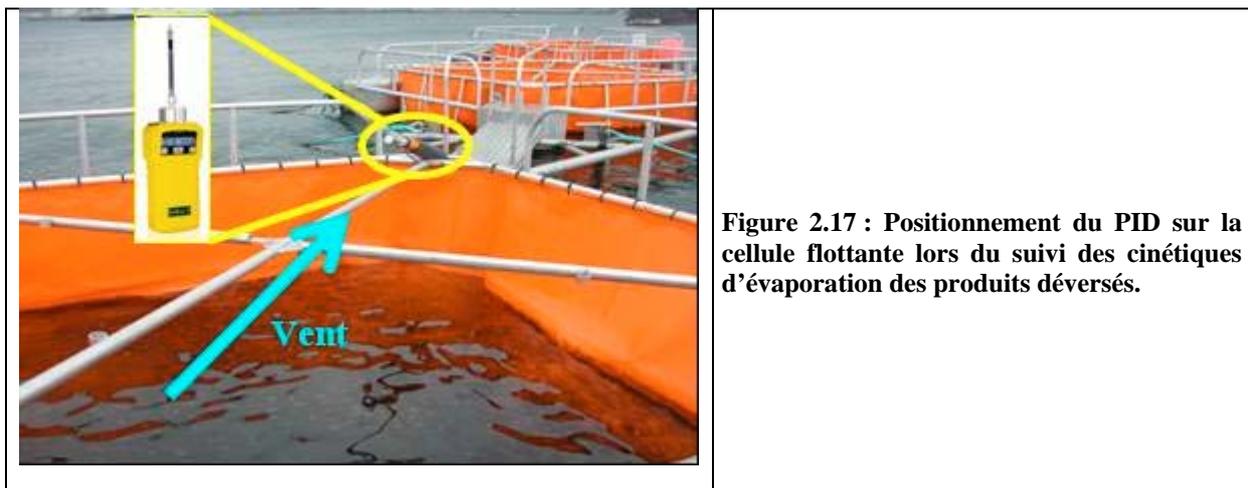


Figure 2.17 : Positionnement du PID sur la cellule flottante lors du suivi des cinétiques d'évaporation des produits déversés.

3.2. Caractérisation et analyse des échantillons de produits prélevés dans les nappes

Le principal vieillissement de surface est l'émulsification. Une émulsion est un système constitué par un liquide se trouvant dispersé sous la forme de fines gouttelettes dans un autre liquide, les deux liquides étant insolubles ou très peu solubles l'un dans l'autre (Hunter, 1993). Les produits déversés en mer sont soumis à une agitation naturelle conduisant à la formation d'émulsion dites aqueuses (le milieu dispersant étant l'eau) affectant les propriétés physiques du produit de départ et transformant parfois ce produit en matériau semi-solide. Ce dernier complique les opérations de pompage ou de dispersion des nappes. La caractérisation de l'émulsion est à la base de la description du comportement des produits testés.

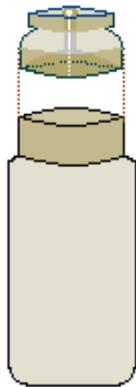
Enfin, une émulsion est un système instable qui finit toujours par se séparer en deux ou trois phases. Toutefois, l'augmentation de la viscosité de l'une des phases (par diminution de la température par exemple) augmente la durée de vie de l'émulsion en ralentissant sa séparation. Il existe trois types d'émulsion : stable (ne se casse pas pendant plusieurs jours), instable (se casse très rapidement) et mésostable (se casse partiellement au bout de deux jours) (Fingas *et al.*, 1996).

Lors des expérimentations *in situ* (cellules flottantes et RAPSODI II), les échantillons prélevés sont analysés au laboratoire pour suivre l'évolution de la densité, de la viscosité et de la teneur en eau des nappes en surface.

3.2.1. Densité

La densité relative des produits est donnée par le rapport de la masse d'un volume de produit avec la masse du même volume d'eau. C'est un nombre sans dimension.

Les mesures de densité sont réalisées à l'aide d'un pycnomètre selon la méthode décrite par la norme NF T 66-007 (1957). Il s'agit d'un récipient cylindrique ou conique en verre, soigneusement rodé pour recevoir un bouchon de verre et percé d'un orifice permettant aux bulles d'air de s'échapper plus facilement. La capacité du pycnomètre bouché est de 24 à 30 ml (Figure 2.18).



Le pycnomètre, vide, propre, sec et muni de son bouchon est pesé (a = masse vide). Il est ensuite rempli d'eau distillée puis, le bouchon étant solidement fixé, immergé complètement pendant une durée de trente minutes dans un bain d'eau portée à 10°C . Le pycnomètre est ensuite retiré du bain et, une fois séché, pesé sans délai (b = masse eau). La même opération est répétée avec le pycnomètre rempli du produit chimique (c = masse produit). La densité relative est donnée par la relation suivante :

$$d = (c-a)/(b-a)$$

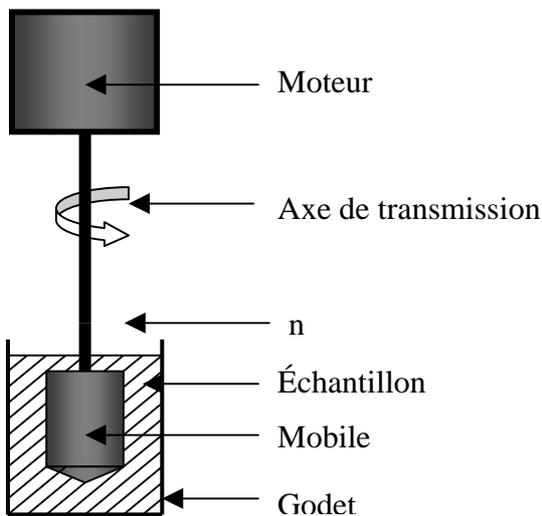
Figure 2.18 : Schéma d'un pycnomètre.

3.2.2. Viscosité

La viscosité et sa mesure relèvent du domaine de la rhéologie, étude de la déformation et de l'écoulement de la matière. La viscosité de cisaillement, plus couramment appelée « viscosité », caractérise la résistance au glissement opposé par deux couches de substance,

proches l'une de l'autre, lorsqu'elles sont soumises à une contrainte appliquée dans leur plan (Ramade, 1999). La viscosité est déterminée par un viscosimètre de type viscotester VT 550® de marque Haake (Figure 2.19).

Il s'agit d'un viscosimètre à effet de couple. Le corps tournant est amené, par un moteur, à une vitesse de rotation prédéfinie (n).



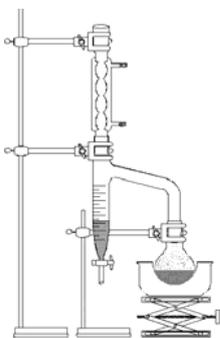
L'échantillon, du fait de sa viscosité, oppose une certaine résistance à ce mouvement qui agit sous forme de couple résistant (Md). L'incidence de ce couple est mesurée et représente la viscosité. Après avoir choisi le mobile adapté et l'avoir fixé sur l'axe tournant, le godet est rempli avec le produit étudié. Puis, l'ordinateur est programmé en prenant en compte les différents facteurs qui influencent l'analyse, à savoir la température, la durée de l'analyse et le taux de cisaillement (50 s^{-1} , 100 s^{-1} , 200 s^{-1} ou 300 s^{-1}).

Figure 2.19 : Schéma du viscosimètre.

3.2.3. Teneur en eau - Emulsion

Une émulsion ou un mélange d'eau et de produit se caractérise chimiquement en exprimant le pourcentage d'eau (en masse ou en volume) selon la relation suivante :

$$\% \text{ eau} = \frac{\text{Volume d'eau dans le tube de recette} \times 100}{\text{Masse ou volume de la prise d'essai}}$$



La teneur en eau d'une émulsion est déterminée à l'aide d'un montage de distillation à reflux (Figure 2.20), muni d'un tube de recette ("Dean Stark") selon la norme AFNOR T 60-113 (1970). L'eau contenue dans l'échantillon est entraînée par distillation à reflux d'un solvant non miscible à l'eau. Après condensation, l'eau se sépare du solvant et s'accumule dans un tube de recette gradué tandis que, par différence de densité, le liquide d'entraînement retourne dans le récipient de distillation.

Figure 2.20 : Montage de distillation à reflux

L'échantillon est pesé précisément puis il est transvasé dans le ballon additionné de solvant (xylène) et de pierres ponce afin de réguler l'ébullition.

Le mélange est porté à ébullition et le distillat, qui se condense dans le réfrigérant, est recueilli dans le Dean Stark. La distillation se poursuit jusqu'à ce que le volume d'eau recueilli dans le Dean Stark reste constant et qu'il n'y ait plus d'eau visible en aucun point du montage. On arrête alors le chauffage et on lit le volume d'eau récupéré dans le Dean Stark, à la division de l'échelle la plus voisine de l'interface eau / solvant afin d'obtenir la teneur en eau de l'échantillon.

3.3. Analyse des échantillons prélevés dans la colonne d'eau

Les mesures en SF-UV (cf 2.2) sont doublées d'échantillonnages de la colonne d'eau qui après extraction liquide – liquide sont analysés en GC-MS.

3.3.1. Extraction liquide - liquide

Afin de connaître le volume exact extrait, il est nécessaire de peser le flacon de prélèvement plein puis de le transvaser dans une ampoule à décanter de 2L. Ce flacon est ensuite rincé à l'hexane pour les huiles, et au dichlorométhane pour l'acide oléique et la DOP, puis ce solvant est transvasé dans l'ampoule.

La pesée du flacon de prélèvement vide permet ainsi de déterminer le volume exact extrait. Puis ce volume d'eau, contenant l'étalon interne, est extrait trois fois de rang avec un ajout de 50 mL de dichlorométhane ou d'hexane selon le produit chimique concerné. Pour cela une agitation est effectuée pendant deux minutes (chronométrée) puis on laisse la solution décanter. La récupération de la phase organique par passage de la phase décantée sur sulfate de sodium anhydre (entonnoir avec coton de verre) est réalisée. Le sulfate de sodium anhydre est rincé avec 10 mL de dichlorométhane ou d'hexane selon le produit chimique extrait. Et enfin l'évaporation du solvant à l'évaporateur rotatif est effectuée.

La méthode de quantification utilisée par la suite est dépendante du produit chimique étudié. Ainsi après évaporation, l'acide oléique et la DOP sont repris dans 1 mL de dichlorométhane pestipur puis analysés en chromatographie en phase gazeuse couplée à un spectrophotomètre de masse (GC-MS).

3.3.2. Analyse des échantillons de nonylphénol

La quantification est effectuée par chromatographie en phase gazeuse couplée à un spectromètre de masse (GC-MS). Le chromatographe en phase gazeuse est un HP 6890N (Hewlett-Packard, Palo Alto, CA, U.S.A) équipé d'un injecteur « split/splitless » utilisé en mode « Pulsed Splitless » (temps de Splitless : 1 minute, débit : 50 ml.min⁻¹). La température de l'injecteur est maintenue à 270°C ; celle de l'interface est de 300°C. Le programme de température est le suivant : de 50°C (pendant 1 min) jusqu'à 300°C (pendant 4 min) par pas de 10°C.min⁻¹. Le gaz vecteur est de l'hélium à débit constant (1 ml.min⁻¹). La colonne capillaire est une HP 5 MS (Hewlett-Packard, Palo Alto, CA, U.S.A) : 60 m x 0,25 mm ID x 0,25 µm. Le chromatographe est couplé à un détecteur par spectrométrie de masse (HP MSD 5973) (Impact électronique : 70 eV, voltage 1200 V). Le volume d'échantillon injecté est de 1 µl (Brix *et al*, 2000 ; Isobe *et al*, 2001).

3.3.3. Analyse des échantillons d'acide oléique et de dioctylphtalate (DOP)

La quantification est effectuée par chromatographie en phase gazeuse couplée à un spectromètre de masse (GC-MS) ayant les mêmes caractéristiques que précédemment (Mudge, 1993).

Le programme de température utilisé pour l'acide oléique et la DOP est le suivant : la température initiale est de 50°C puis une montée à 200°C par pas de 20°C.min⁻¹ a lieu et est maintenue pendant quatre minutes. Une deuxième montée en température a lieu par pas de 10°C.min⁻¹ jusqu'à 310°C.

3.3.4. Analyses des échantillons d'huile de soja et d'huile de ricin

Une ou deux étapes préliminaires, selon le type d'huile végétale sont indispensables avant quantification. La préparation d'esters méthyliques à partir d'un corps gras neutre pour l'huile de soja et de ricin (Kaeleskind, 1992, Afnor, 2000) est nécessaire puis une syllilation est effectuée pour l'huile de ricin.

Sur l'extrait de produit après extraction liquide - liquide, il faut ajouter 1 mL d'hexane, agiter 2 secondes, introduire 0.2 mL de NaOH méthanolique 2M et agiter vigoureusement pendant 10 secondes. Puis il faut porter au bain marie à 50°C pendant 20 secondes, agiter 10 secondes et ajouter 0.2 mL de HCl méthanolique 2M. Le passage sur sulfate de sodium est effectué afin d'éliminer la phase aqueuse puis évaporé pour obtenir 1ml d'extrait.

Après la transestérification, la syllilation est effectuée pour l'huile de ricin. L'extrait obtenu est séché sous flux d'azote dans un bain marie à 65 °C. Puis 200 µL de BSTFA

(bistrifluoroacétamide / TMCS (triméthylchlorosilane) (80/20)) sont ajoutés sur l'extrait sec d'ester et chauffés pendant ½ heure à 65°C. Un mL de solvant est introduit et l'extrait est prêt à être injecté en GC-MS (Jonsson *et al*, 2003).

La quantification est effectuée par chromatographie en phase gazeuse couplée à un spectromètre de masse (GC-MS). Le dispositif est le même que celui utilisé lors de la quantification de l'acide oléique et de la DOP. Le programme de température utilisé pour les huiles est : la température initiale est de 100°C puis elle est augmentée jusqu'à 300 °C par pas de 7 °C.min⁻¹, où elle est maintenue pendant quatre minutes.

3.3.5. Analyse des échantillons de styrène et de benzène

La quantification du styrène et du benzène est effectuée par chromatographie en phase gazeuse couplée à « un purge and trap », directement dans l'échantillon d'eau de mer prélevé. Le chromatographe en phase gazeuse est un chrompack CP-9003 équipé d'une colonne capillaire chrompack CP-sil 5 CB (CP7862 : 30 m x 0,25 mm ID x 1 µm). Le « purge and trap » est un « tekmar dohmann 3100 sample concentrator » équipé d'un piège carbopack C&B (Periago 1996).

Le programme de température utilisé est : la température initiale de la GC est de 40°C (1 minute) puis elle est montée à 80 °C par pas de 3°C.min⁻¹ puis elle est montée à 200°C par pas de 5 °Cmin⁻¹ puis elle est montée à 270 °C par pas de 7 °C .min⁻¹. La température du détecteur est de 300 °C. Pour la partie « purge and trap », le cryofocus est à -50°C, la température de désorption est de 250 °C, le temps de désorption est de 3 minutes, le purge time est de 11 minutes et le dry purge time est de 2 minutes.

**CHAPITRE 3 : CARACTERISATION DE LA DISPERSION
NATURELLE DES PRODUITS CHIMIQUES
AU LABORATOIRE**

Introduction

En cas d'accident, selon le lieu où se produit le naufrage, les conditions du milieu seront différentes, en particulier en terme de température et de salinité. En effet, selon la localisation aux pôles ou à l'équateur, en surface ou au fond, la température de l'eau de mer varie fortement. Il en est de même pour la salinité qui, à titre d'exemple, est de l'ordre de 34,5 dans l'océan Atlantique et de l'ordre de 38,5 en Méditerranée. C'est pourquoi il a été décidé de faire varier ces 2 paramètres au cours de la mise au point de la méthodologie qui a été réalisée sur du nonylphénol. Cette méthodologie s'articule sur 3 techniques analytiques qui sont :

- l'ultra turrax qui permet de connaître la dispersion maximale
- le shake flask qui permet de suivre la cinétique de dispersion naturelle
- et l'élution sur colonne permettant de définir la diffusion moléculaire.

1. Mise au point des méthodes analytiques utilisées : cas du Nonylphénol

1.1. Dispersion naturelle maximale

Le test de l'ultra turrax est tout d'abord réalisé pour le nonylphénol sur une gamme de température comprise entre 5°C et 35°C, dans l'eau de mer naturelle (32) et dans l'eau douce (0) (Figure 3.1).

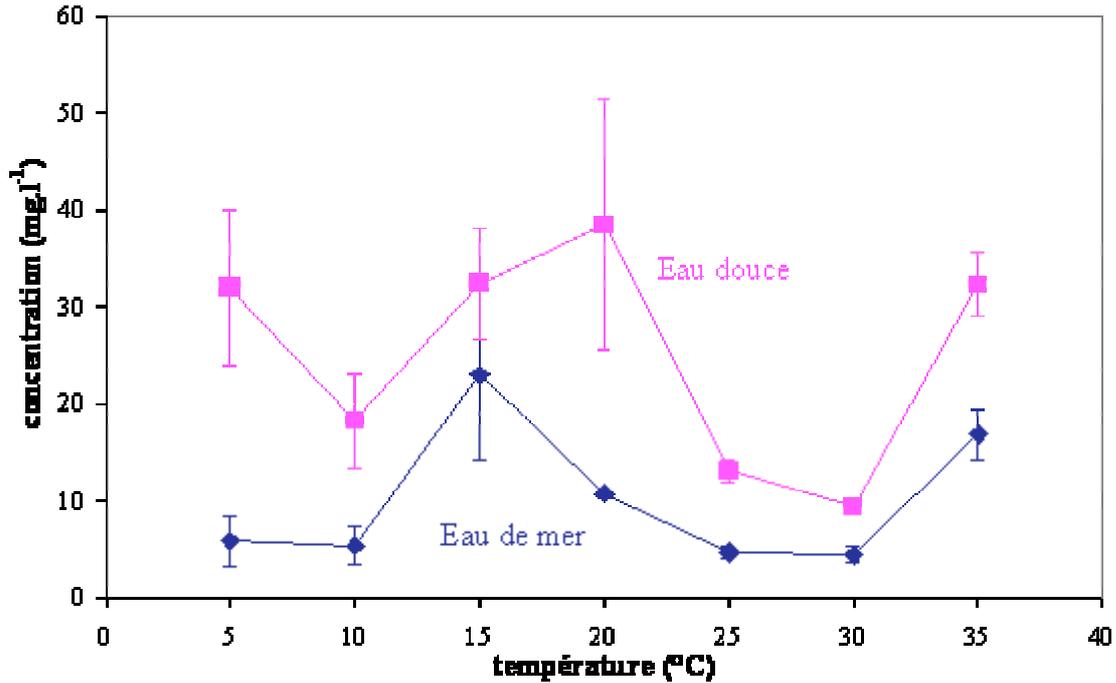


Figure 3.1 : Evolution de la concentration (mg.l⁻¹) en nonylphénol dans l'eau de mer et l'eau douce en fonction de la température (°C) par la méthode de l'ultra turrax (moyenne ± écart type).

Dans l'eau de mer, la concentration du nonylphénol varie entre 4,45 mg.l⁻¹ et 23,0 mg.l⁻¹. A 5°C, 10°C, 25°C et 30°C les concentrations sont du même ordre de grandeur (de 4,5 mg.l⁻¹ à 5,9 mg.l⁻¹) alors qu'à 15°C, 20°C et 35°C, elles varient de façon significative. De façon générale, les écarts-types sont relativement faibles sauf à 15°C où la concentration est plus importante. D'après les tests statistiques effectués (ANOVA, $p = 0,0008$), la température a une influence significative sur la concentration du nonylphénol dans l'eau de mer. Les concentrations en eau douce sont cette fois comprises entre 9,37 mg.l⁻¹ et 38,47 mg.l⁻¹. La dispersion maximale du nonylphenol est élevée à 5°C, 15°C, 20°C et 35°C. La concentration est très importante sauf à 25°C et 30°C où les écarts-types sont très faibles. De la même manière que dans l'eau de mer les tests statistiques (ANOVA, $p = 0,003$) font apparaître une influence significative de la température sur la concentration du nonylphénol dans l'eau douce.

De façon générale, la dispersion du nonylphénol varie de façon semblable dans l'eau de mer et dans l'eau douce en fonction de la température, avec, cependant une dispersion significativement plus importante dans l'eau douce. Ce phénomène est généralement reporté dans la littérature sous le nom de «salting out» (Gorgenyi *et al*, 2006). Cette méthode à l'aide de l'ultra turrax est rapide et simple d'utilisation. Elle est suffisamment précise pour faire apparaître les effets de la salinité et de la température sur la dispersion.

1.2. Diffusion moléculaire ou dispersion naturelle minimale

Cette mesure est effectuée à l'aide de la méthode de l'élution sur colonne. Elle permet d'estimer, par exemple, les concentrations de produits susceptibles de se disperser dans l'eau de mer en s'échappant des cuves d'une épave reposant sur le fond. La figure 3.2 représente la diffusion moléculaire du nonylphénol, par la méthode de l'élution sur colonne, à 20°C, dans l'eau douce et l'eau de mer (32‰).

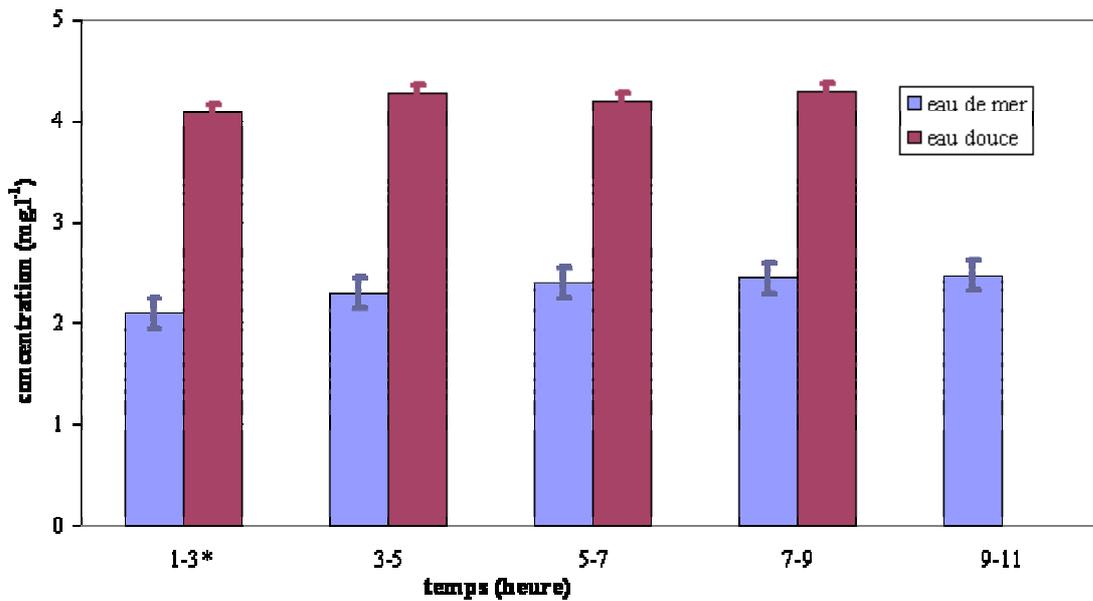


Figure 3.2 : Evolution de la concentration (mg.l⁻¹) en nonylphénol dans l'eau de mer et l'eau douce en fonction du temps (heure) par la méthode de l'élution sur colonne (moyenne ± écart type).* : 1-3 correspond au volume d'eau échantillonné entre t+1heure et t+3heures.

Dans l'eau de mer la concentration moyenne est de 2,34 mg.l⁻¹ alors que dans l'eau douce elle est de 4,22 mg.l⁻¹. La concentration dans l'eau de mer est une nouvelle fois inférieure à celle obtenue dans l'eau douce (effet de « salting out ») et l'écart-type des valeurs obtenues dans l'eau de mer est légèrement supérieur à celui de l'eau douce. La méthode de l'élution sur colonne, qui permet d'obtenir la diffusion moléculaire du produit, apparaît comme étant une méthode très répétable.

1.3. Cinétique de dispersion naturelle

La mesure de la concentration d'un produit en fonction du temps est réalisée par la méthode des flacons. Cette méthode permet de quantifier la dispersion naturelle. Ces

données sont utiles afin d'évaluer la cinétique de transfert d'un produit se trouvant à la surface de l'eau, sous forme de nappe, vers la colonne d'eau. Des cinétiques de 90 minutes sont réalisées pour le nonylphénol dans des eaux de différentes salinités. Le temps d'expérimentation est assez court afin d'obtenir, dans le cadre de l'accidentel, une réponse rapide. L'influence de la température sur la dispersion naturelle du nonylphénol dans l'eau de mer a été étudiée (Figure 3.3).

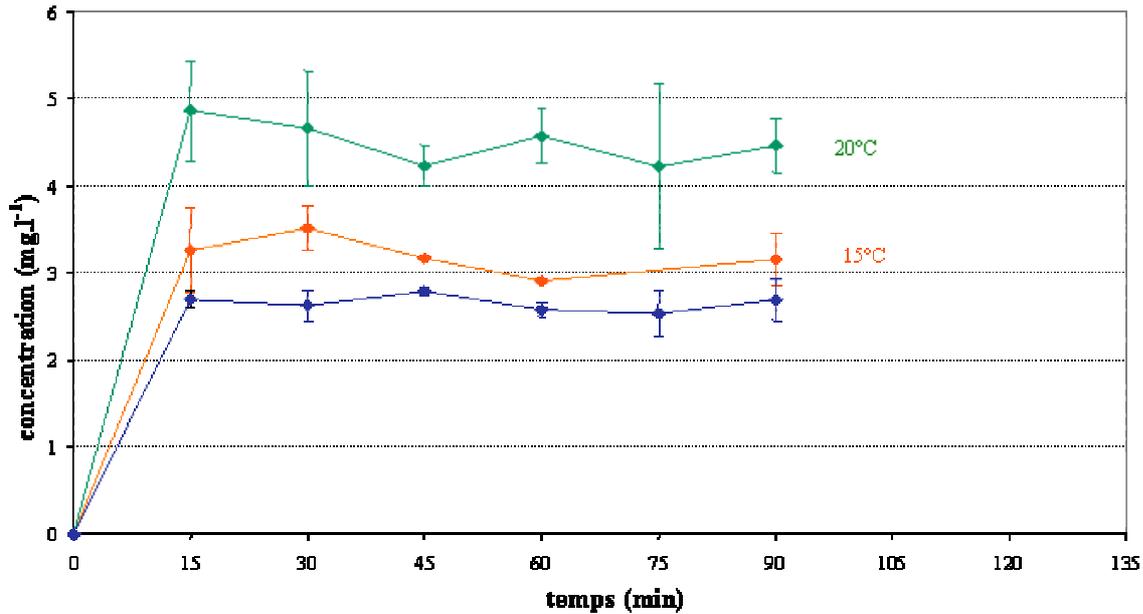


Figure 3.3 : Evolution de la concentration (mg.l⁻¹) du nonylphénol dans l'eau de mer (32) à 10, 15 et 20°C en fonction du temps (min) par la méthode des flacons (moyenne ± écart type).

A 20°C, les concentrations obtenues sont comprises entre 4,2 mg.l⁻¹ et 4,9 mg.l⁻¹. La concentration est stable à ± 0.3 mg.l⁻¹ au cours du temps et décroît de 4,9 mg.l⁻¹ après 15 minutes d'agitation à 4,2 mg.l⁻¹ après 45 minutes : il y a donc une diminution de la concentration, diminution non significative au vu des écarts-types. Il apparaît que le temps d'agitation a peu d'influence sur la cinétique de dispersion naturelle du nonylphénol dans l'eau de mer à 20°C : un plateau est atteint au bout d'un quart d'heure. La concentration du nonylphénol pour la cinétique à 15°C est comprise entre 2,9 mg.l⁻¹ et 3,5 mg.l⁻¹ avec des écarts-types relativement faibles. Le temps d'agitation n'a pas d'influence sur la concentration du nonylphénol : elle est de 3,3 mg.l⁻¹ au bout de 15 minutes et de 3,2 mg.l⁻¹ au bout de 90 minutes. A 10°C, la concentration varie entre 2,7 mg.l⁻¹ (à t = 15 minutes) et 2,5 mg.l⁻¹ (à t = 90 minutes) et passe par un maximum de 2,8 mg.l⁻¹ après 45 minutes. En conclusion, plus la température augmente,

plus la concentration du nonylphénol augmente, et ce quelque soit le temps d'agitation. Un autre facteur important à prendre en compte dans l'étude de la dispersion naturelle d'un produit chimique dans l'eau de mer est la salinité. Ainsi, la cinétique de dispersion naturelle du nonylphénol a été étudiée à différentes salinités : 0, 6, 18, 32 et 44 à une température de 20°C (Figure 3.4).

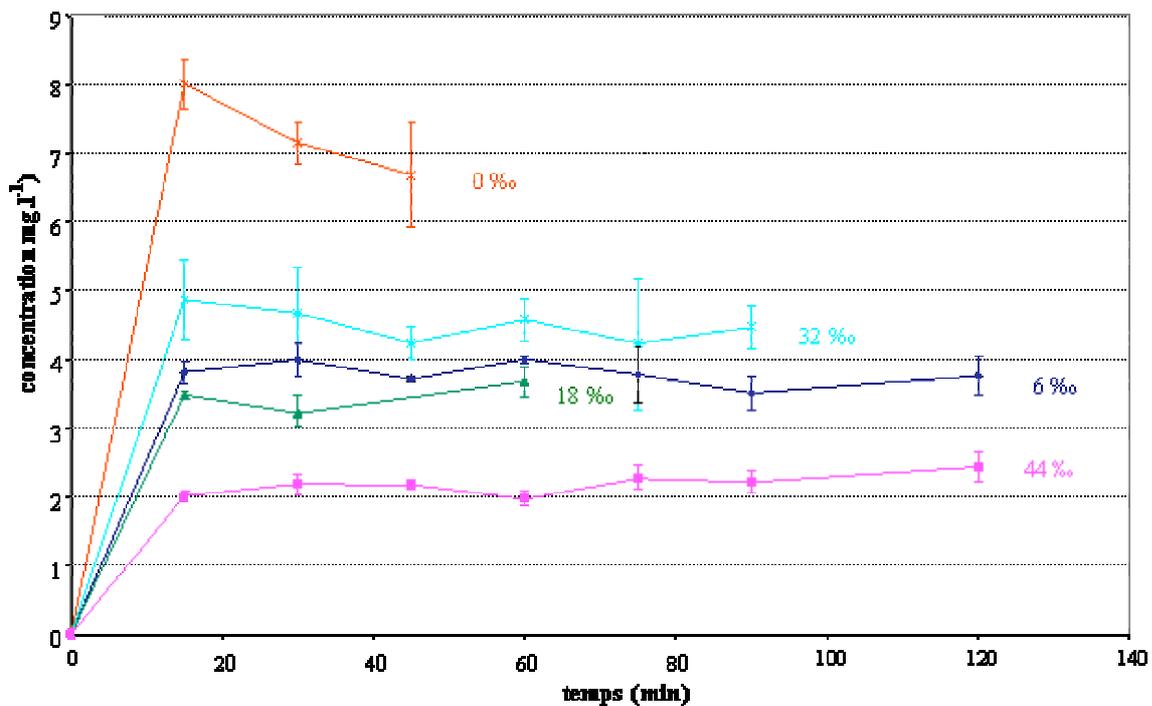


Figure 3.4 : Evolution de la concentration (mg.l⁻¹) du nonylphénol dans l'eau de mer (0, 6, 18, 32 et 44) à 20°C en fonction du temps (min) par la méthode des flacons (moyenne ± écart type).

Dans l'eau douce la concentration varie de 8,0 mg.l⁻¹ après 15 minutes d'agitation à 6,7 mg.l⁻¹ après 45 minutes d'agitation. Dans l'eau de mer artificielle, à une salinité de 6, la concentration du nonylphénol varie entre 3,5 mg.l⁻¹ et 4,0 mg.l⁻¹ au cours du temps avec les écarts-types relativement faibles. A cette salinité, comme à 32, il semble que le temps d'agitation a peu d'influence sur la dispersion naturelle du nonylphénol. Ceci se vérifie également dans l'eau à 18 où la concentration est comprise entre 3,2 mg.l⁻¹ et 3,7 mg.l⁻¹. et à 44 pour des valeurs comprises entre 2,0 mg.l⁻¹ et 2,4 mg.l⁻¹.

Comme lors de la quantification de la dispersion maximale, les concentrations sont supérieures dans l'eau douce et plus la salinité augmente plus la concentration diminue. Après 15 minutes d'agitation, la concentration passe de 2,0 mg.l⁻¹, pour une eau de mer à 44, à 8,0 mg.l⁻¹ pour une eau à 0. La concentration est donc quatre fois plus

importante dans l'eau douce que dans l'eau de mer. Ceci est donc en accord avec le phénomène de « salting out » et cette influence de la salinité est confirmée par les tests statistiques (ANOVA, $p = 0,000$). Seules les mesures réalisées dans une eau à 32 ne sont pas corrélées avec cette explication ; en effet, la solubilité à 32 est supérieure à celles obtenue à 6 et 18. Ce résultat s'explique par la nature même de l'eau employée : eau de mer naturelle (pompée directement en rade de Brest) à la salinité de 32 et eau de mer artificielle pour les autres salinités synthétisées au laboratoire.

Le test des flacons, qui permet de suivre la cinétique de dispersion naturelle d'un produit, est un test suffisamment sensible pour mettre en évidence une influence de la température et de la salinité sur la dispersion naturelle du produit. De plus ce test est répétable au vue des faibles écarts-types obtenus.

1.4. Discussion

Sur les figures 3.5 et 3.6 sont rassemblées les données obtenues sur la dispersion naturelle et la diffusion moléculaire du nonylphénol par les 3 méthodes, dans l'eau de mer et dans l'eau douce, à 20°C.

Les valeurs déterminées expérimentalement sont, pour certaines, du même ordre de grandeur que celles calculées par les méthodes théoriques dans la littérature : 4,9 mg.l⁻¹ à 25°C pour Brix et al. (2000) et 5,43 mg.l⁻¹ à 20°C pour Ahel et Giger (1993 dans Ying *et al*, 2002). En utilisant la méthode AQUAFAC, la solubilité estimée est de 1,85 mg.l⁻¹, valeur qui est faible par rapport aux résultats expérimentaux. Ceci tient au fait que la méthode AQUAFAC est uniquement basée sur la structure moléculaire du produit étudié et ne tient pas compte des conditions environnementales (température et salinité de l'eau de mer). La solubilité déterminée en utilisant le coefficient de partage octanol/eau donne pour l'équation 2-5, réservée aux alcools, une valeur de 19,0 mg.l⁻¹. Cette valeur est surestimée par rapport aux valeurs déterminées expérimentalement ou relevées dans la littérature. Ce résultat est également calculé avec l'équation générale de solubilité qui donne une valeur de 23,0 mg.l⁻¹. Cependant ces deux valeurs restent inférieures à celles obtenues expérimentalement à l'aide de l'ultra turrax (solubilité maximale). Avec les équations 2-14 et 2-15, les solubilités calculées sont respectivement de 5,7 et 2,1 mg.l⁻¹. L'équation 2-5 donne une valeur plus faible que celles obtenues expérimentalement par l'élution sur colonne, ceci s'explique par le fait que cette équation a été établie pour calculer la solubilité d'une large gamme de produits chimiques. L'ensemble de ces résultats est rassemblé dans le tableau 3.1.

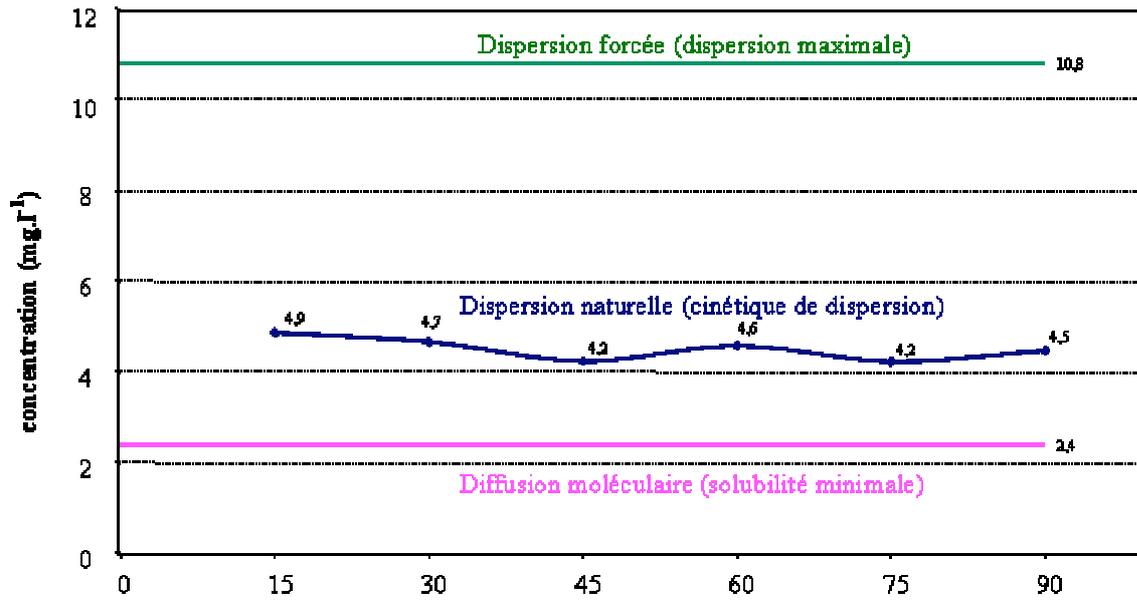


Figure 3.5 : Evolution de la concentration moyenne (mg.l⁻¹) du nonylphénol dans l'eau de mer (32) à 20°C par les 3 méthodes et représentant la dispersion maximale, naturelle et la diffusion moléculaire.

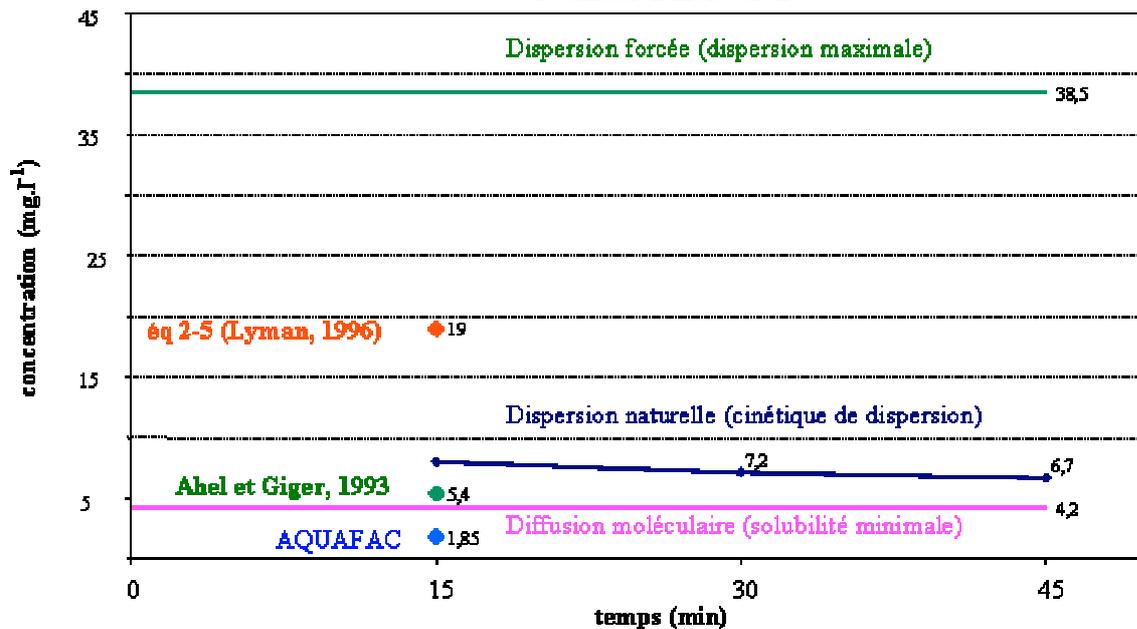


Figure 3.6 : Evolution de la concentration moyenne (mg.l⁻¹) du nonylphénol dans l'eau douce à 20°C par les 3 méthodes et représentant la dispersion maximale, naturelle et la diffusion moléculaire. Les valeurs obtenues par les méthodes théoriques sont également représentées.

Tableau 3.1 : Solubilité (mg.l⁻¹) du nonylphénol donnée dans la littérature, calculée avec les méthodes estimatives et mesurée avec les 3 méthodes expérimentales au laboratoire.

		T°C	Salinité (‰)	Solubilité (mg.l ⁻¹)
Littérature	Brix et al.	25	0	4,9
	Ahel et Giger	20	0	5,3
Méthodes estimatives	AQUAFAC			1,85
	éq. 2-5	~ 25		19,0
	éq. 2-14	~ 25		5,7
	éq. 2-15	~ 25		2,1
	Équation générale de solubilité	25		23,0
Ce travail	Dispersion maximale	20	0	38,5
		25	0	13,1
		20	32	10,8
		25	32	4,7
	Dispersion naturelle	20	0	6,7 – 8,0
		20	32	4,2 - 4,9
	Diffusion moléculaire	20	0	4,2
		20	32	2,3

Il apparaît donc que la méthode de l'ultra turrax donne bien la limite supérieure de solubilité car la valeur déterminée dans l'eau douce dépasse largement toutes les autres (presque 2 fois plus grande que la valeur obtenue par l'équation générale de solubilité). Concernant la limite inférieure obtenue par la méthode de l'élution sur colonne, les données estimées sont très légèrement plus faibles que les valeurs expérimentales, mais l'une est basée uniquement sur des considérations atomiques (AQUAFAC) et l'autre utilise la valeur de K_{OW} (eq 2-5). Enfin, les cinétiques de dissolution obtenues à l'aide de la méthode des flacons sont bien corrélées avec les données de la littérature.

L'ensemble de ces résultats montre que la méthodologie définie pour caractériser la solubilité des produits chimiques en milieu marin permet d'obtenir et de fournir rapidement, aux autorités en charge de la lutte, une fourchette estimative de la quantité de produit susceptible de passer dans la colonne d'eau (concentrations maximale et minimale) ainsi que des données plus précises sur les fractions à se dissoudre et à se disperser.

2. Application de la méthodologie aux produits chimiques retenus

Afin d'utiliser la méthodologie mise en place avec le nonylphénol, celle-ci a été testée sur 3 produits différents d'un point de vue purement chimique : l'acide oléique, le benzène et le styrène.

2.1. L'acide oléique

2.1.1. Dispersion maximale

Comme pour le nonylphénol, le test préliminaire de l'ultra turrax est réalisé dans l'eau de mer et l'eau douce à 20°C. Lors de l'expérience dans l'eau de mer, et de façon moindre dans l'eau douce, des agglomérats d'acide oléique très stables se sont formés. Ces agglomérats sont dus à la fonction COOH de l'acide oléique qui réagit avec tous les cations présents dans l'eau pour former des oléates (de sodium, de potassium...); c'est pour cette raison qu'ils sont en quantité plus importante dans l'eau de mer que dans l'eau douce. De plus, dans l'eau douce et après agitation, la phase aqueuse est devenue laiteuse entraînant ainsi de longs temps de filtration. Ce phénomène reflète une solubilisation importante de l'acide oléique, confirmée par les résultats obtenus (valeurs comprises entre 727,3 mg.l⁻¹ et 1221,4 mg.l⁻¹). Dans l'eau de mer, les valeurs obtenues sont plus faibles (25,0±2,8 mg.l⁻¹) que celles obtenues dans l'eau douce (953,3±203,9 mg.l⁻¹). Ce manque de précision, pour une salinité de 0, s'explique par une dispersion importante de l'acide oléique.

2.1.2. Diffusion moléculaire

Lors du test de l'élution sur colonne, il n'a pas été possible de mettre en évidence la présence d'acide oléique, que ce soit dans l'eau de mer ou dans l'eau douce. D'autres conditions opératoires comme l'augmentation du débit d'eau ou de la masse de produit à enduire les billes, ou encore des temps d'échantillonnage plus longs ont été testés mais aucun de ces changements n'a eu d'effet sur les concentrations recherchées.

2.1.3. Dispersion naturelle

De même que pour le nonylphénol, des cinétiques de dispersion naturelle de l'acide oléique sont réalisées, à 20°C, dans l'eau de mer (Figure 3.7) et dans l'eau douce (Figure 3.8), puis à des salinités intermédiaires (Figure 3.9).

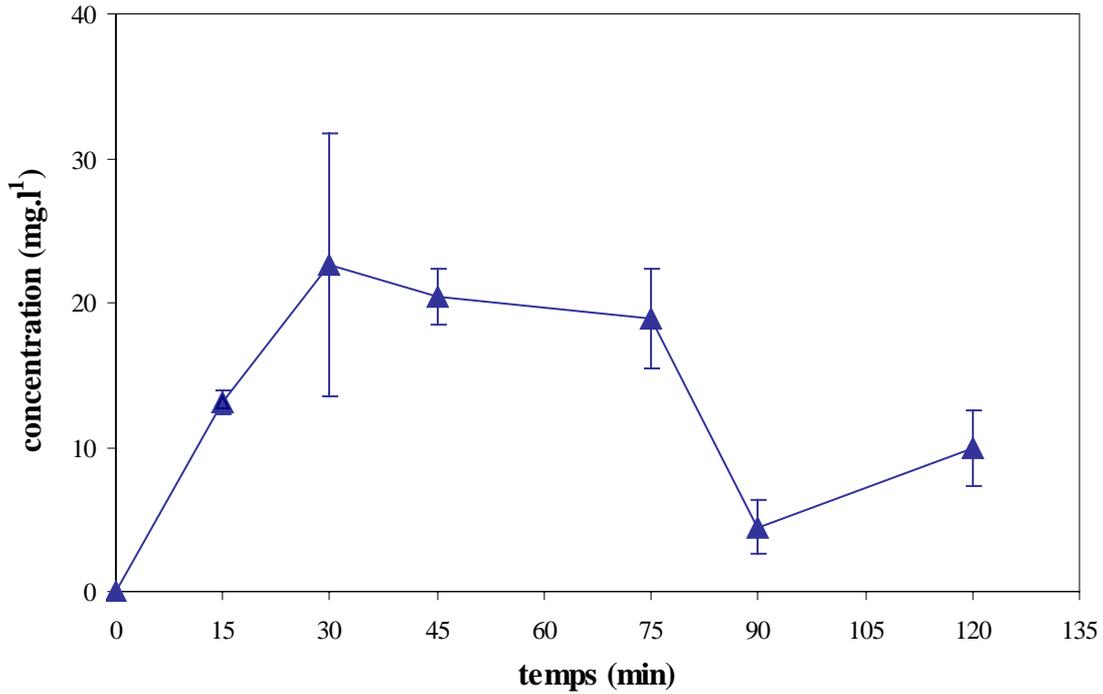


Figure 3.7 : Evolution de la concentration (mg.l⁻¹) de l'acide oléique dans l'eau de mer (32) à 20°C en fonction du temps (min) par la méthode des flacons (moyenne ± écart type).

L'étude de la dispersion naturelle de l'acide oléique par la méthode des flacons dans l'eau de mer (32) à 20°C donne des valeurs qui varient de 4,5 mg.l⁻¹ à 22,6 mg.l⁻¹. L'incertitude sur la mesure est relativement élevée lors de l'échantillonnage à 30 minutes comparé aux autres. La cinétique croît alors jusqu'à 30 min d'agitation puis ne cesse de décroître.

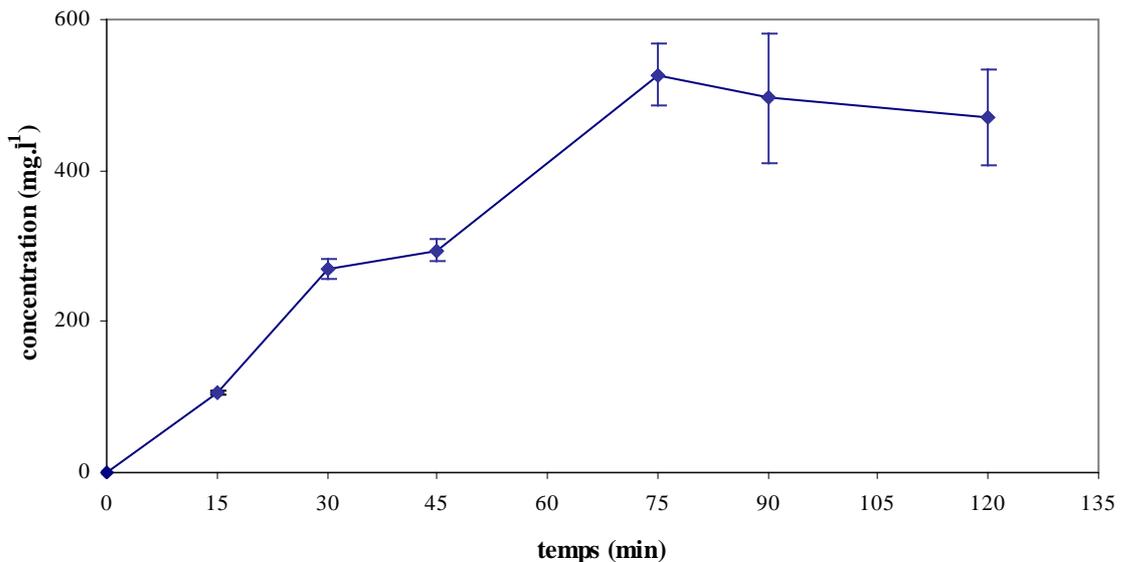


Figure 3.8 : Evolution de la concentration (mg.l⁻¹) de l'acide oléique dans l'eau douce à 20°C en fonction du temps (min) par la méthode des flacons (moyenne ± écart type).

La figure 3.8 représente l'évolution de la concentration de l'acide oléique dans l'eau douce à 20°C. Les concentrations varient de $105,2 \pm 15,2$ à $527,2 \pm 51,2$ mg.l⁻¹ avec des écarts type relativement élevés, surtout entre 75 et 120 minutes où la dispersion n'est plus significativement différente. La cinétique de dispersion naturelle augmente progressivement entre 0 et 75 minutes d'agitation.

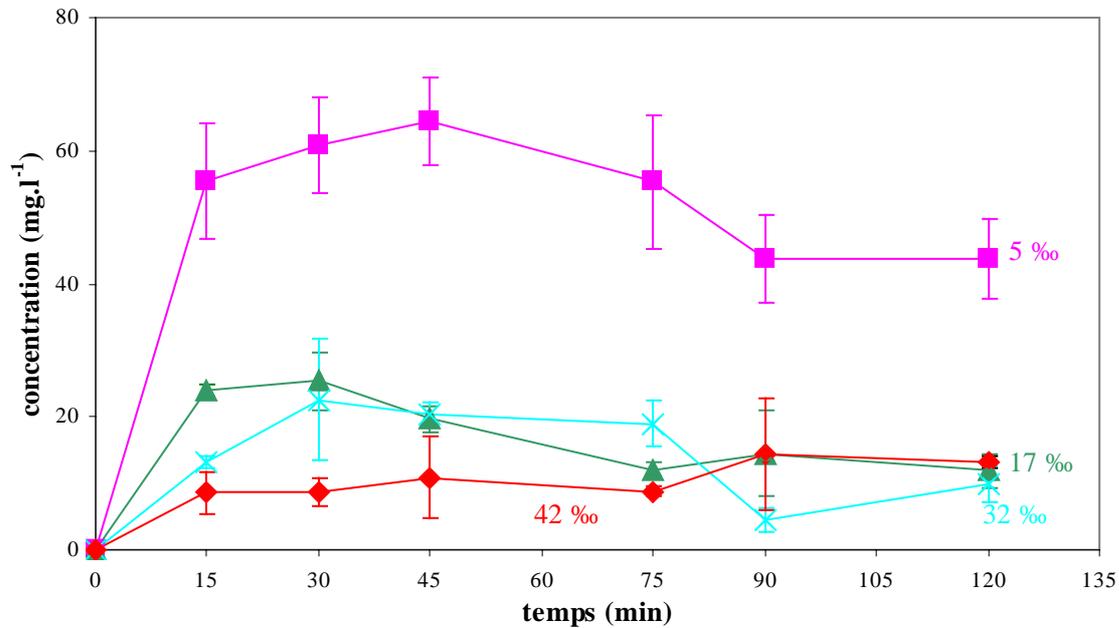


Figure 3.9 : Evolution de la concentration (mg.l⁻¹) de l'acide oléique dans l'eau de mer (5, 17, 32 et 44) à 20°C en fonction du temps (min) par la méthode des flacons (moyenne ± écart type).

La figure 3.9 représente l'évolution de la concentration de l'acide oléique dans de l'eau de mer à différentes salinités (de 5 à 42). Quelle que soit la salinité, les écarts-types sont relativement importants.

Dans une eau de salinité 5, les concentrations en acide oléique varient entre 43,8 et 64,4 mg.l⁻¹. A 17, les valeurs sont comprises entre 11,9 et 25,4 mg.l⁻¹ et, à 42, entre 8,6 et 14,5 mg.l⁻¹. Ainsi, plus la salinité augmente et plus la solubilité diminue, à l'exception de l'eau de mer à 32 (interférences avec les éléments naturellement présents dans l'eau de mer). Ce résultat confirme que l'acide oléique subit également le phénomène de "salting out".

La méthode des flacons permet donc de suivre la cinétique de dispersion naturelle de l'acide oléique et met en évidence l'influence de la salinité sur les processus de dispersion.

2.1.4. Discussion

Les résultats obtenus avec les méthodes de l'ultra turrax et du flacon confirment que ces

deux méthodes sont complémentaires. En effet, les valeurs obtenues par l’ultra turrax, aussi bien en eau douce qu’en eau de mer, sont toujours supérieures à celles obtenues lors de la cinétique de dispersion naturelle par la méthode des flacons. De même, étant donné l’absence de trace d’acide oléique dans l’eau générée par la méthode de l’élution sur colonne, cette méthode apparaît être adaptée à la caractérisation de la limite inférieure de solubilisation.

En se basant sur la méthode des coefficients de partage octanol/eau, les équations 2-11, 2-14 et 2-15 (cf tableau 1.8) donnent respectivement 0,05, 0,8 et $4,10^{-4}$ $\mu\text{g.l}^{-1}$. De même l’équation générale donne une solubilité de 0,02 mg.l^{-1} . Ces calculs indiquent que l’acide oléique est un composé totalement hydrophobe par les méthodes théoriques. Par la méthode AQUAFAC, la solubilité calculée est sensiblement supérieure tout en restant très faible (0,06 mg.l^{-1}). De plus, l’acide oléique est décrit dans la littérature comme un composé insoluble. Ces données confirment donc les résultats obtenus avec la méthode de l’élution sur colonne (Tableau 3.2) mais pas celles obtenues avec la méthode de l’ultra turrax et celle des flacons.

Tableau 3.2 : Solubilité (mg.l^{-1}) de l’acide oléique donnée dans la littérature, calculée avec les méthodes estimatives et mesurée avec les 3 méthodes expérimentales au laboratoire.

		T°C	Salinité (‰)	Solubilité (mg.l^{-1})
Littérature	Fiche internationale de sécurité chimique		0	insoluble
	IBC code		0	insoluble
Méthodes estimatives	AQUAFAC			0.06
	éq. 2-11	~ 25		$0.05 \cdot 10^{-3}$
	éq. 2-14	~ 25		$0.8 \cdot 10^{-3}$
	éq. 2-15	~ 25		$4 \cdot 10^{-7}$
	Equation générale de solubilité	25		0.02
Ce travail	Ultra turrax	20	0	1221
		20	32	27.5
	Méthode des flacons	20	0	105.2 – 527.2
		20	32	4.5 – 22.6
	Elution sur colonne	20	0	0
		20	32	0

Comme dans le cas du nonylphénol des figures 3.10 et 3.11 regroupent les résultats des trois tests dans l'eau de mer et dans l'eau douce.

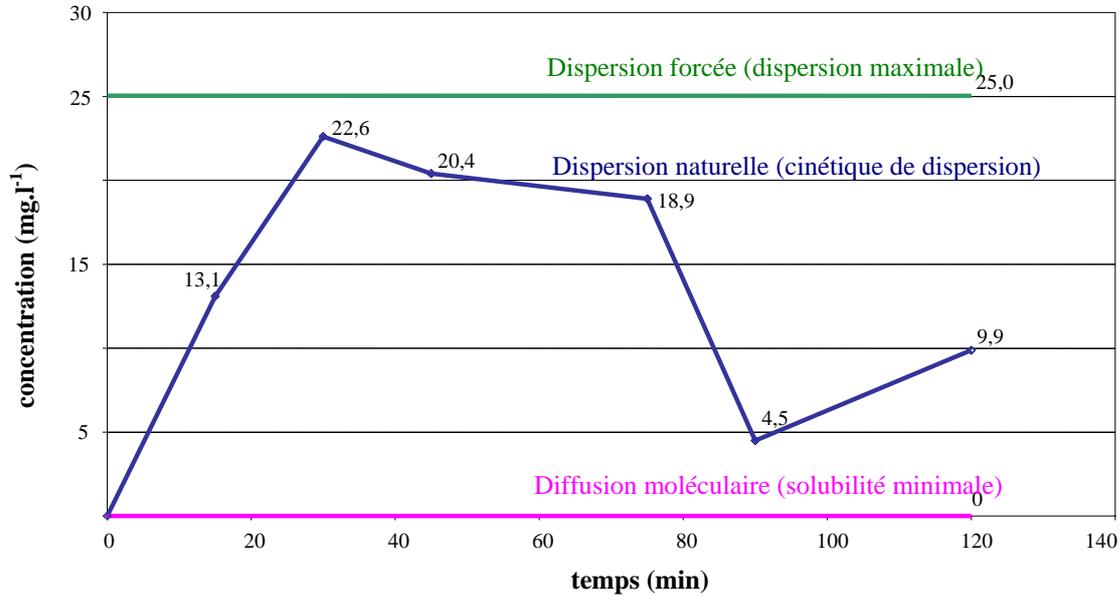


Figure 3.10 : Evolution de la concentration moyenne (mg.l⁻¹) de l'acide oléique dans l'eau de mer (32‰) à 20°C par les 3 méthodes et représentant la dispersion maximale, naturelle et la diffusion moléculaire.

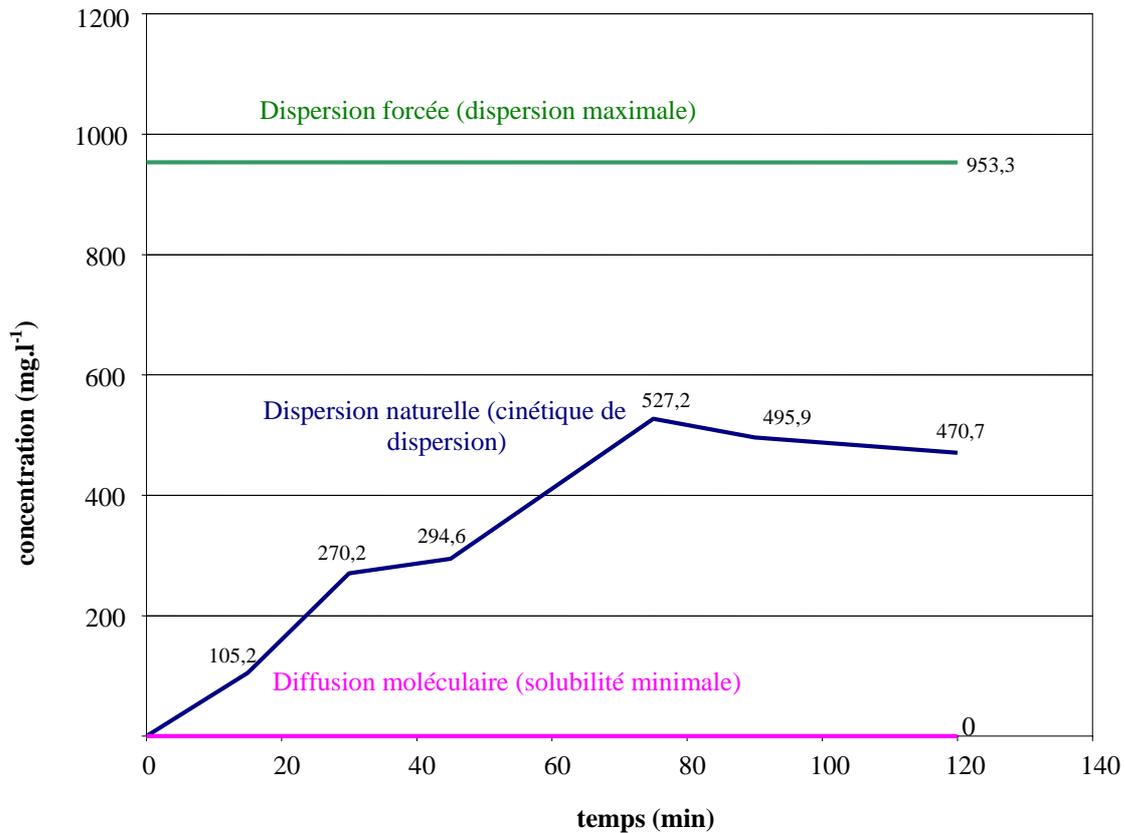


Figure 3.11 : Evolution de la concentration moyenne (mg.l⁻¹) de l'acide oléique dans l'eau douce à 20°C par les 3 méthodes et représentant la dispersion maximale, naturelle et la diffusion moléculaire. Les valeurs obtenues par les méthodes théoriques sont trop faibles pour être prises en compte sur cette figure.

Ces deux figures présentent les limites de solubilité de l'acide oléique ainsi que sa cinétique de dispersion. Les valeurs données dans la littérature (www.cdc.gov) classent ce produit en tant que produit insoluble. Ce travail expérimental réalisé au laboratoire met en évidence un résultat différent de celui de la littérature car ce produit est soluble dans l'eau de mer et dans l'eau douce dans certaines conditions.

2.2. Le benzène

2.2.1. Dispersion maximale

La concentration en benzène obtenue par cette méthode est de $319,5 \pm 9,8$ mg.l⁻¹ dans l'eau de mer à 10°C. Les valeurs obtenues sont plus faibles que celles données dans la littérature (1.3 g.l⁻¹). Cette différence s'explique par la méthodologie en elle même : le mélange eau - produit à tester se fait « à l'air libre », or l'énergie dégagée par l'ultra turrax entraîne une élévation de la température de la solution, et comme le benzène est un produit très volatil, les processus d'évaporation sont favorisés.

2.2.2. Diffusion moléculaire

La figure 3.12 représente la concentration en benzène, dans l'eau de mer à 10°C, obtenue par la méthode de l'élution sur colonne.

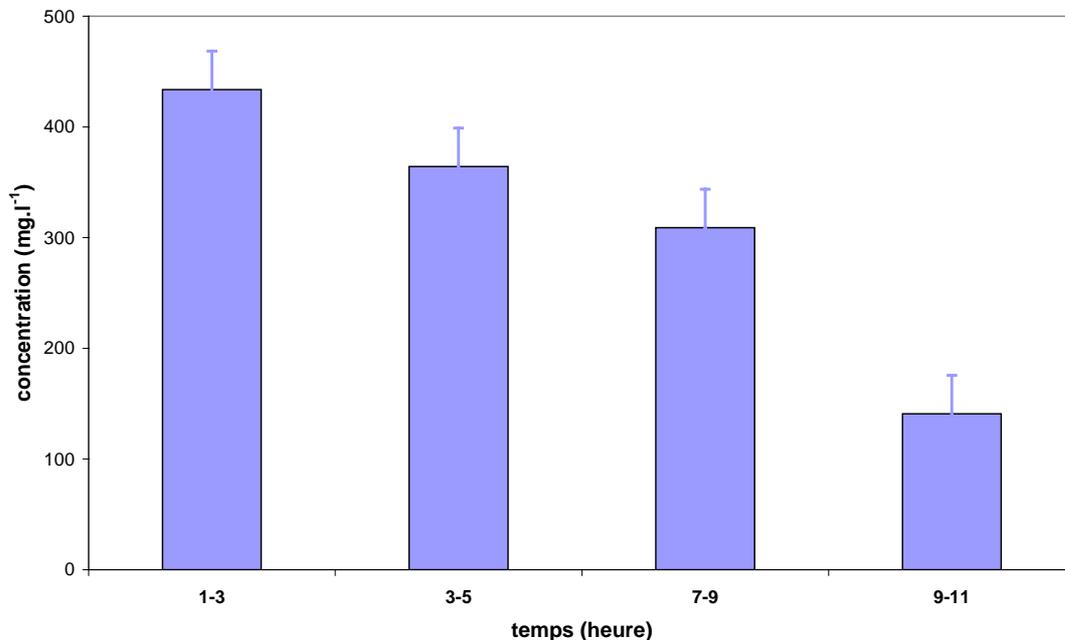


Figure 3.12 : Evolution de la concentration (mg.l⁻¹) du benzène dans l'eau de mer à 10°C en fonction du temps (heure) par la méthode de l'élution sur colonne (moyenne \pm écart type).* : 1-3 correspond au volume d'eau échantillonné entre t+1heure et t+3heures.

La concentration en benzène décroît progressivement de $433,8 \text{ mg.l}^{-1}$ à $140,8 \text{ mg.l}^{-1}$ entre le premier échantillon et le dernier. Il apparaît donc que, au fur et à mesure que l'eau passe sur les billes, de moins en moins de benzène se retrouve en phase aqueuse. Cette méthode est adaptée aux composés peu solubles, or le benzène étant un composé soluble, une explication possible est qu'une grande quantité de produit s'est décroché des billes dès le premier échantillonnage. Puis, au fur et à mesure, les billes ont été lavées, diminuant la quantité de produit disponible.

2.2.3. Dispersion naturelle

La figure 3.13 représente la concentration en benzène, dans l'eau de mer à 10°C , obtenue par la méthode des flacons. Les concentrations en benzène sont comprises entre $756,9 \text{ mg.l}^{-1}$ (à $t = 75$ minutes) et $943,7 \text{ mg.l}^{-1}$ (à $t = 15$ minutes). Les écarts-types sur les mesures ne permettent pas d'observer des concentrations significativement différentes.

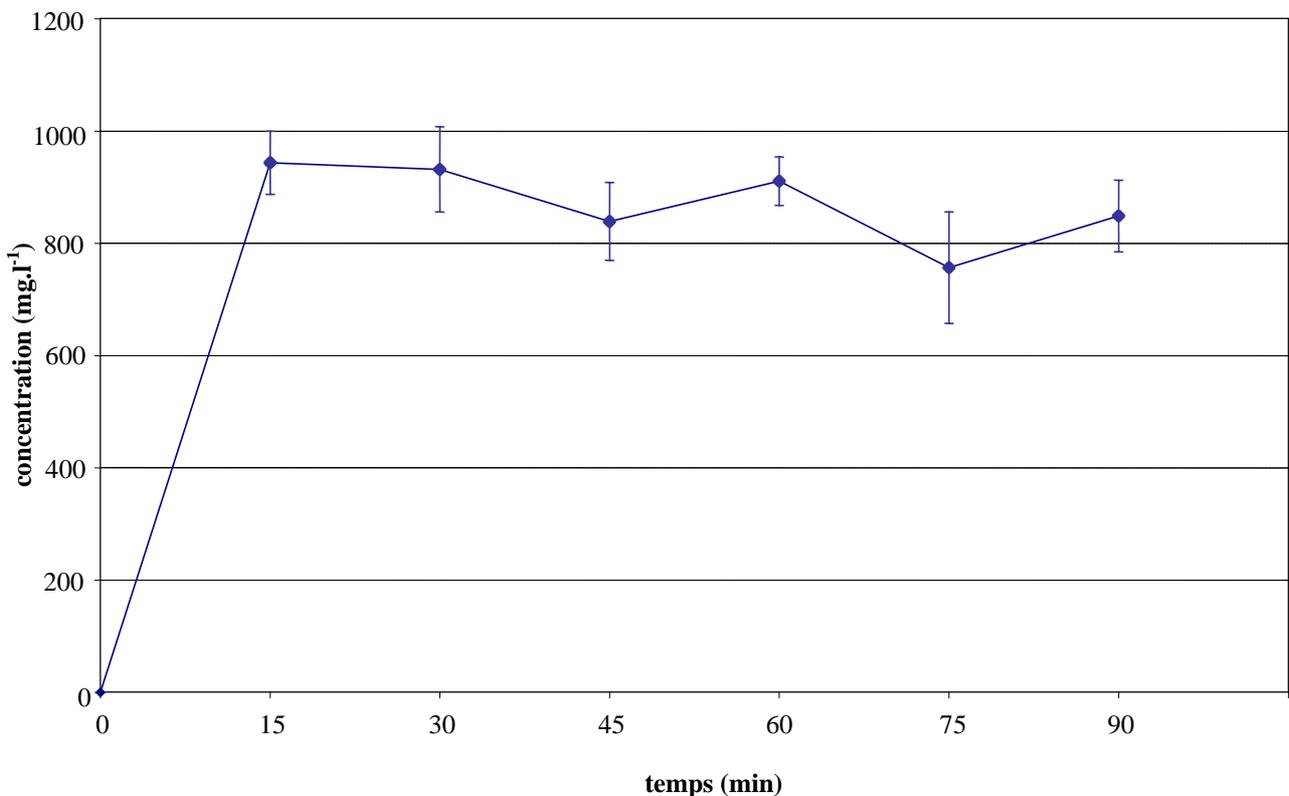


Figure 3.13 : Evolution de la concentration (mg.l^{-1}) du benzène dans l'eau douce à 20°C en fonction du temps (min) par la méthode des flacons (moyenne \pm écart type).

Cette figure met en évidence un plateau qui signifie que la saturation est rapidement

atteinte : le benzène a une cinétique de dissolution rapide. Dès les 15 premières minutes d'agitation, la solution est saturée.

2.2.4. Discussion

Pour le benzène, les équations 2-2 et 2-12 (cf tableau 1.8) donnent des valeurs de solubilité de 1,7 et 1,3 g.l⁻¹. Ces équations prédisent bien la solubilité du benzène (valeur admise de 1,8 g.l⁻¹). L'équation générale de solubilité donne elle aussi une valeur de 1,8 g.l⁻¹. La méthode d'estimation de Irmann donne 1,9 g.l⁻¹ et la méthode AQUAFAC 0,93 g.l⁻¹. Le benzène ayant été très étudié, un nombre important de données sont disponibles dans la littérature. Brown et Wasik (1974) ont déterminé par exemple que, dans une eau de mer artificielle à une salinité de 34,42 à 0,2 ; 5,3 ; 10; 15 et 20°C elle serait respectivement de 1,323 ; 1,376 ; 1,347 ; 1,318 et 1,296 g.l⁻¹. Toutes ces données sont rassemblées dans le tableau 3.3.

Les valeurs obtenues expérimentalement lors de ce travail sont plus faibles que celles données dans la littérature. Cet écart est dû au caractère très volatil de ce composé.

Tableau 3.3 : Solubilité (g.L⁻¹) du benzène donnée dans la littérature, calculée avec les méthodes estimatives et mesurée avec les 3 méthodes expérimentales au laboratoire.

		T°C	Salinité (%)	Solubilité (g.L ⁻¹)
Littérature	Brown et wasik	0,2	34,42	1,323
		5,3	34,42	1,376
		10	34,42	1,347
		15	34,42	1,318
		20	34,42	1,296
Méthodes estimatives	AQUAFAC			0,93
	Irmann			1,9
	éq. 2-2	~ 25		1,7
	éq. 2-12	~ 25		1,3
	Equation générale de solubilité	25		1,8
Ce travail	Ultra turrax	10	32	0,3
	Méthode des flacons	10	32	0,7-0,9
	Elution sur colonne	10	32	0,3

2.3. Le styrène

2.3.1. Dispersion maximale

La concentration en styrène obtenue par cette méthode est de 840,5±90 mg.L⁻¹ dans l'eau de mer (32) à 10°C. Les valeurs obtenues ont permis de déterminer une dispersion maximale dans l'eau indépendante de la salinité mais dépendante de la température.

Cette valeur moyenne est supérieure aux données de la littérature.

2.3.2. Diffusion moléculaire

La méthode de l'élution sur colonne a permis de déterminer la diffusion moléculaire du styrène dans une eau à 10°C et une salinité de 32. Cette valeur moyenne est de 205 ± 15 mg.l⁻¹, elle est inférieure aux données de la littérature.

2.3.3. Dispersion naturelle

Cette méthode, réalisée à l'aide du test des flacons, a montré que la vitesse de dispersion naturelle atteint, après 15 minutes d'agitation, une valeur asymptotique. Cette valeur est de 470 ± 50 mg.l⁻¹ pour une eau de mer à 10°C et une salinité de 32.

2.3.4. Discussion

Dans le cas du styrène, les valeurs déterminées expérimentalement sont du même ordre de grandeur que celles relevées dans la littérature (300 mg.l⁻¹ à 20°C selon le Handbook, 300 mg.l⁻¹ selon Li et Andren, 320 mg.l⁻¹ à 25°C selon la fiche FDS, 347 mg.l⁻¹ selon la méthode estimative de Irmann et 369 mg.l⁻¹ selon l'équation générale de solubilité). En utilisant la méthode AQUAFAC, la solubilité estimée est de 591 mg.l⁻¹, valeur qui est légèrement élevée par rapport aux résultats expérimentaux. Ceci tient au fait que la méthode AQUAFAC est uniquement basée sur la structure moléculaire du produit étudié et ne tient pas compte des conditions environnementales, alors que les faibles températures et la présence de sels réduisent significativement la concentration du styrène. Cependant, cette valeur théorique reste inférieure à la dispersion maximale déterminée par le test de l'ultra turrax. Ceci s'explique par la forte énergie mécanique mise en jeu lors du test, qui a pour conséquence de majorer la dispersion des produits chimiques : ils se retrouvent en phase aqueuse selon des processus de dispersion et d'émulsification. En considérant la limite inférieure, obtenue par l'élution sur colonne, on retrouve 2 valeurs estimées plus basses que les valeurs expérimentales (équation 2-2 : 172 mg.l⁻¹ et équation 2-11: 28 mg.l⁻¹). Ce constat est dû au fait que ces équations sont basées sur le coefficient de partage octanol / eau du produit chimique considéré et de la famille chimique à laquelle il appartient. Or, pour l'équation 2-11, la solubilité est calculée en considérant le styrène comme un alcène et pour l'équation 2-2, il est assimilé à un hydrocarbure aromatique. Le résultat obtenu avec l'équation 2-12 qui assimile le styrène à un dérivé benzénique, corrobore parfaitement la solubilité minimale déterminée expérimentalement (205 mg.L⁻¹).

3. Conclusion

Les résultats obtenus pour le nonylphenol sont en accord avec les données de la littérature ce qui nous permet d'affirmer que la méthodologie développée au *Cedre* est tout à fait appropriée à la détermination de la dispersion naturelle d'un produit chimique. La validation de la méthodologie mise au point avec le nonylphénol a été réalisée sur 3 produits chimiques différents : l'acide oléique, le benzène et le styrène. Pour ces 3 produits, elle a permis de définir les limites inférieure et supérieure de solubilité, ainsi que la cinétique de dispersion naturelle des composés et de les comparer avec les résultats obtenus par les méthodes estimatives ainsi que celles données dans la littérature. Nos résultats ont mis en évidence un décalage entre les méthodes théoriques existantes et les expérimentations menées dans cette étude.

Cette méthodologie permet d'obtenir des valeurs de solubilité pour des conditions de températures et de salinités rarement documentées : les équations de la littérature ne sont applicables que pour des conditions de température et de salinité fixes (25°C et 0), et les solubilités expérimentales ne sont bien souvent documentées que pour les températures de 20 et 25°C. Ainsi, par cette méthodologie, il est possible d'obtenir rapidement des informations sur la dispersion naturelle d'un produit chimique pour des conditions d'essais réalistes, c'est-à-dire proches des conditions environnementales.

Elle est basée sur trois tests complémentaires qui permettent de caractériser la dispersion naturelle des produits (dispersion maximale, dispersion naturelle et diffusion moléculaire), et ceci pour des conditions d'essais représentatives de situations très précises (fuite d'un produit à partir d'une épave reposant sur le fond, ou à partir d'un navire pris dans une tempête...); situations qui ne sont pas documentées dans la littérature et pour lesquelles les équations mathématiques ne sont pas applicables.

**CHAPITRE 4 : ESSAIS *IN SITU* EN CELLULES
FLOTTANTES**

Introduction

Les cellules flottantes permettent de suivre le vieillissement des produits à trois niveaux :

- dans la partie atmosphérique, les produits évaporant sont mesurés à l'aide du PID (détecteur à photoionisation)
- à la surface, la densité, la teneur en eau et la viscosité des produits sont réalisées
- et dans la colonne d'eau, la dispersion naturelle est suivie à l'aide d'un spectrofluorimètre de terrain (SF-UV).

1. Compartiment atmosphérique

Sur les six produits étudiés seulement deux ont pu faire l'objet du suivi de leur cinétique d'évaporation. La très faible pression de vapeur des produits flottants persistants (huile de ricin, huile de soja, acide oléique et dioctylphtalate) n'a pas permis de détecter leur présence dans le compartiment atmosphérique défini par la colonne d'air se trouvant juste au-dessus de la nappe. Le traitement des résultats obtenus à l'aide du PID n'a pas mis en évidence la présence de composés organiques volatiles. L'évaporation peut de ce fait être considérée comme nulle ou en deçà du seuil de détection de l'appareil. Le processus d'évaporation peut dès lors être négligé dans le comportement de ces produits en mer.

1.1. Le styrène

1.1.1. Description de la nappe et conditions météo-océaniques

Les conditions météo-océaniques sur zone sont résumées dans le tableau 4.1.

Tableau 4.1 : Données météorologiques lors de l'expérimentation sur le styrène en cellules flottantes en rade de Brest.

	T° air (°C)	T° eau (°C)	Vent (km.h⁻¹)	Force Beaufort	Temps
T₀	10	8	SE-E 2-5	1	Soleil mais couvert
T₀+24h	10	8	S 5-10	2	Couvert, pas de soleil

Cette période a été marquée par des conditions météorologiques constantes correspondant à une mer belle selon l'échelle de Douglas (mer 2) : direction du vent légèrement changeante, et de force Beaufort 1 à 2, sans variation de température.

1.1.2. Suivi de la cinétique d'évaporation

Le déversement du styrène est réalisé le matin à $T_0 = 10 \text{ h } 15$. Consécutivement au déversement, l'évaporation est suivie en continu à l'aide d'un PID et les mesures sont réalisées en continu sur deux périodes de temps (entre T_0 et $T_0 + 4\text{h}$ et entre $T_0 + 24\text{h}$ et $T_0 + 29\text{h}$) afin de suivre la cinétique d'évaporation sur les deux premiers jours de vieillissement *in situ*. Au-delà ($T_0 + 48\text{h}$), la nappe ayant complètement disparu de la surface de l'eau, aucune concentration de styrène n'a pu être détectée dans l'atmosphère. Les mesures sont réalisées selon le plan d'échantillonnage présenté sur la figure 4.1.

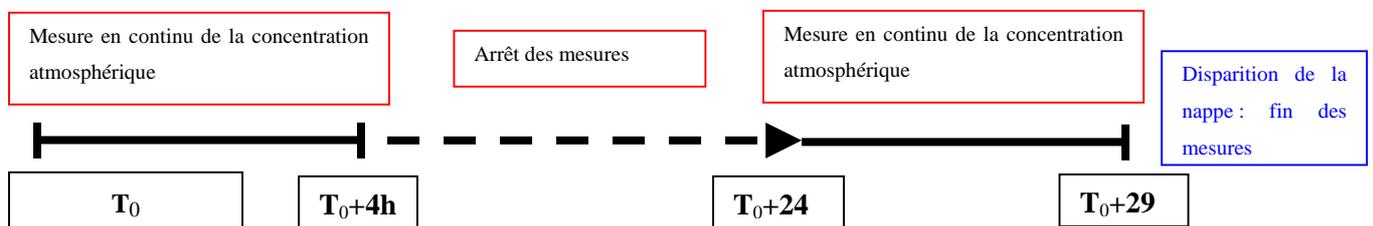
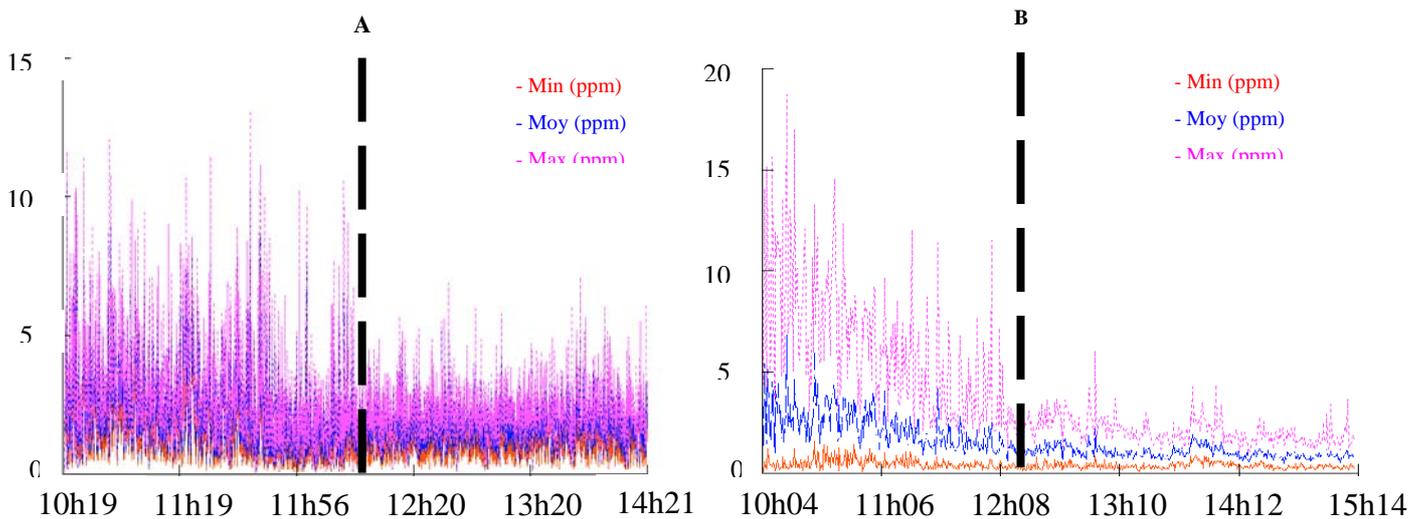


Figure 4.1 : Planning des mesures. (T_0 = déversement)

Les figures 4.2A et 4.2.B représentent les concentrations minimales, moyennes et maximales de styrène respectivement entre T_0 et $T_0 + 4\text{h}$ et entre $T_0 + 24\text{h}$ et $T_0 + 29\text{h}$.



Figures 4.2 : Evolution de la concentration (moyenne, mini et maxi) en styrène dans l'atmosphère au cours du temps : entre T_0 et $T_0 + 4\text{h}$ (A) et entre $T_0 + 24\text{h}$ et $T_0 + 29\text{h}$ (B).
 - - - = point correspond à environ deux heures après le début des mesures.

Les résultats mettent en évidence l'existence de deux zones, une première où les concentrations sont plus élevées, correspondant environ au laps de temps entre 10 h et 12 h, et une seconde zone où les concentrations atmosphériques en styrène diminuent, entre environ 12 h et 15 h. Ce phénomène est à rapprocher des conditions météorologiques (ensoleillement, intensité et direction du vent) sur zone au moment des mesures (Tableau 4.1) mais aussi au fait que la quantité de produit chimique en surface diminue. Lors des premières mesures, la moyenne horaire de la concentration est de 27 ppm pour la 1^{ère} heure puis elle diminue à environ 18 ppm pour les 3 heures suivantes. A $T_0 + 24$ h, la moyenne horaire de la concentration est toujours du même ordre de grandeur (29 ppm), puis elle continue de chuter au fur et à mesure de la disparition progressive de la nappe (moyenne de 9 ppm, au bout de 28 heures) jusqu'à devenir significativement plus faible. L'influence du vent sur les processus d'évaporation est soulignée par les écarts entre concentrations minimales et maximales : à $T_0 + 4$ h, pour un vent de 2-5 km.h⁻¹, l'écart des concentrations est d'environ 10 ppm alors qu'à $T_0 + 24$ h, pour un vent de 5-10 km.h⁻¹, il est supérieur à 20 ppm, pouvant atteindre 80 ppm en début de période de mesure, période où des rafales ont été observées.

1.2. Le benzène

1.2.1. Description de la nappe et conditions météo-océaniques

Les conditions météo-océaniques sur zone sont résumées dans le tableau 4.2.

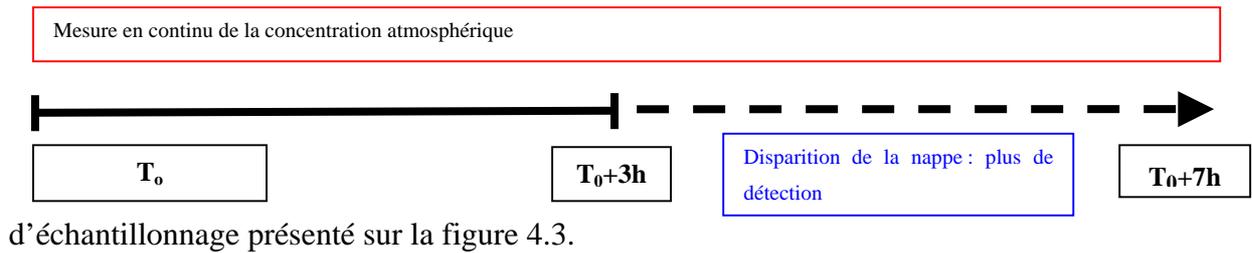
Tableau 4.2 : Données météorologiques lors de l'expérimentation sur le benzène en cellules flottantes en rade de Brest.

	T° air (°C)	T° eau (°C)	Vent (km.h⁻¹)	Force Beaufort	Temps
T₀	13	9,4	SE 25 30	4 à 5	Couvert, crachin
T₀ + 7 h	15	9,4	SE 30	4 à 5	Couvert, crachin

Cette période a été marquée par des conditions météorologiques défavorables correspondant à une mer agitée selon l'échelle de Douglas (mer 4) : direction du vent constante, et de force Beaufort de 4 à 5, avec des températures fraîches et pas d'ensoleillement, accompagné de pluie.

1.2.2. Suivi de la cinétique d'évaporation

Le déversement du benzène a été réalisé le matin à $T_0 = 10 \text{ h } 30$. Consécutivement au déversement, l'évaporation est suivie en continu à l'aide du PID et les mesures sont réalisées sur une période de temps (entre T_0 et $T_0 + 7 \text{ h}$) afin de suivre la cinétique d'évaporation sur les premières heures de vieillissement *in situ*. Au-delà de 3 h de présence, la nappe ayant complètement disparu de la surface de l'eau, aucune vapeur de benzène n'a pu être détectée. Les mesures ont été réalisées selon le plan



d'échantillonnage présenté sur la figure 4.3.

Figure 4.3 : Planning des mesures. (T_0 = déversement)

La figure 4.4 représente les concentrations minimale, moyenne et maximale entre T_0 et $T_0 + 7 \text{ h}$.

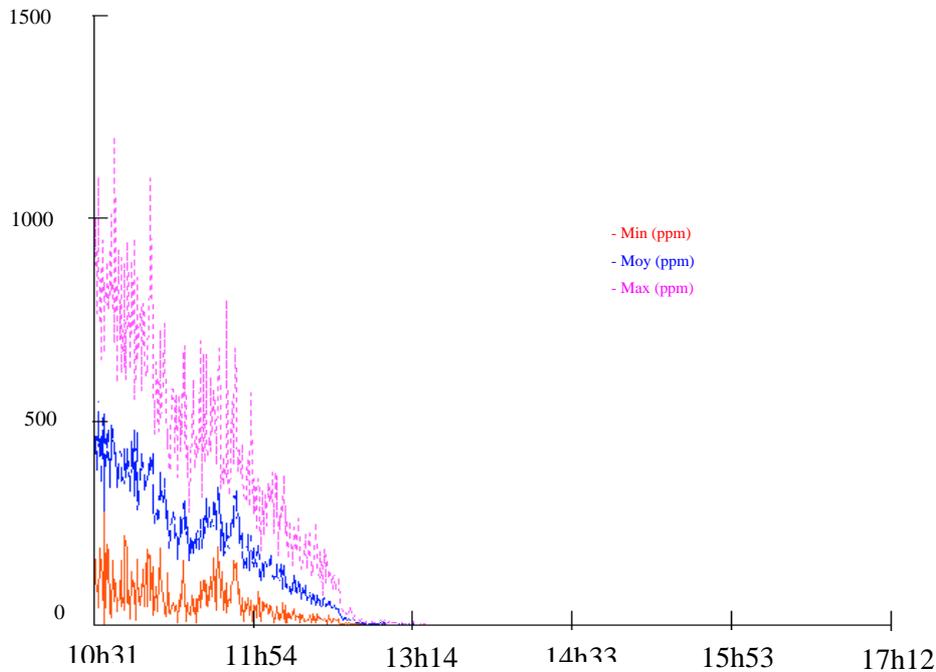


Figure 4.4 : Evolution de la concentration (moyenne, mini et maxi) en benzène dans l'atmosphère au cours du temps : entre T_0 et $T_0 + 7 \text{ h}$.

Les résultats montrent une nette et rapide décroissance de la concentration en benzène au cours des premières heures qui suivent le déversement. La moyenne horaire de la concentration est de 325 ppm pour la 1^{ère} heure puis elle diminue à 133 ppm pour l'heure suivante avant de devenir quasiment nulle. Il y a donc une diminution de plus de la moitié de la concentration en benzène en l'espace d'une heure. Il est important de rappeler que le benzène a une pression de vapeur très élevée, ce qui le rend très sensible aux phénomènes d'évaporation. L'influence du vent sur les processus d'évaporation est soulignée par les écarts entre concentrations minimale et maximale : à $T_0 + 1$ h, celui-ci est supérieur à 550 ppm du fait de la forte intensité du vent rencontrée sur zone ce jour là.

Les résultats obtenus dans cette partie sont relatifs au volume de styrène et de benzène déversé. La comparaison de leur cinétique d'évaporation permet d'en déduire que leurs propriétés physico-chimiques sont conservées, *i.e* : FE pour le styrène et E pour le benzène d'après le code SEBC. Pour ces produits, l'évaporation reste ainsi un processus majeur dans leur comportement lors de déversements accidentels en mer.

2. Comportement des nappes en surface

2.1. L'huile de ricin

Les conditions météo-océaniques sur zone sont résumées dans le tableau 4.3.

Tableau 4.3 : Données météorologiques lors de l'expérimentation sur l'huile de ricin en cellules flottantes en rade de Brest.

	T° air (°C)	T° eau (°C)	Vent (km.h ⁻¹)	Force Beaufort	Temps
T₀; T₀+3h	3-4	10	NE 25-30	4	Pluie éparse, temps couvert
T₀+24h	5-7	10	NE 5	1	Soleil
T₀+48h	9	10	N0 10, rafales à 15-20	3	Temps couvert, soleil par intermittence
T₀+72h	9	10	N0 1-2 voire inexistant	0	Grand soleil toute la journée
T₀+96h	7	10	S-S0 15, rafales à 20-25	2-3	Temps couvert

Cette semaine d'expérimentation est marquée par des conditions météorologiques variées, avec un début et une fin de période perturbés, des directions de vent changeantes et des variations de température de l'air de 2 à 6°C.

La figure 4.5 illustre le caractère flottant persistant du produit. En effet, celui-ci stagne en surface en prenant une teinte blanchâtre tout en s'émulsionnant.



Figure 4.5 : Photographie de l'huile de ricin à T_0 (A) et de la surface des cellules à T_0+72h (B)

Le phénomène d'émulsification est fortement lié aux conditions météo-océaniques où l'hydrodynamisme marin joue un rôle primordial (vague, houle, vent...).

La figure 4.6 représente l'évolution de la teneur en eau dans l'émulsion d'huile de ricin pendant 96 heures c'est-à-dire la capacité de l'huile de ricin à s'émulsionner en milieu marin. En effet, pour la première cellule et à $T_0 + 48$ h, l'huile a incorporé 18% d'eau. Cependant, ce processus est réversible puisqu'à $T_0 + 72$ h, il n'est alors plus que de 13% pour à nouveau augmenter jusqu'à 33%, à $T_0 + 96$ h. L'instabilité de l'émulsion de l'huile de ricin est confirmée par les résultats obtenus sur la nappe de la deuxième cellule : à $T_0 + 48$ h, elle est de 16%, à $T_0 + 72$ h de 12% et à $T_0 + 96$ h de 34%.

Les deux cellules se sont donc comportées de façon similaire : dans les deux cas, une augmentation de la teneur en eau est constatée jusqu'à 48 h, suivie d'une légère diminution à $T_0 + 72$ h, pour à nouveau se charger fortement en eau à $T_0 + 96$ h. Ces observations sont principalement à corrélérer aux données météorologiques. En effet, à $T_0 + 72$ h est intervenue une période ensoleillée, de calme (force Beaufort 0) qui a entraîné une cassure de l'émulsion. De plus, pendant la semaine d'expérimentation, les vents étaient principalement orientés Nord Est- Nord Ouest impliquant une exposition équivalente des deux cellules à leur influence. Cette émulsion est définie comme une émulsion instable.

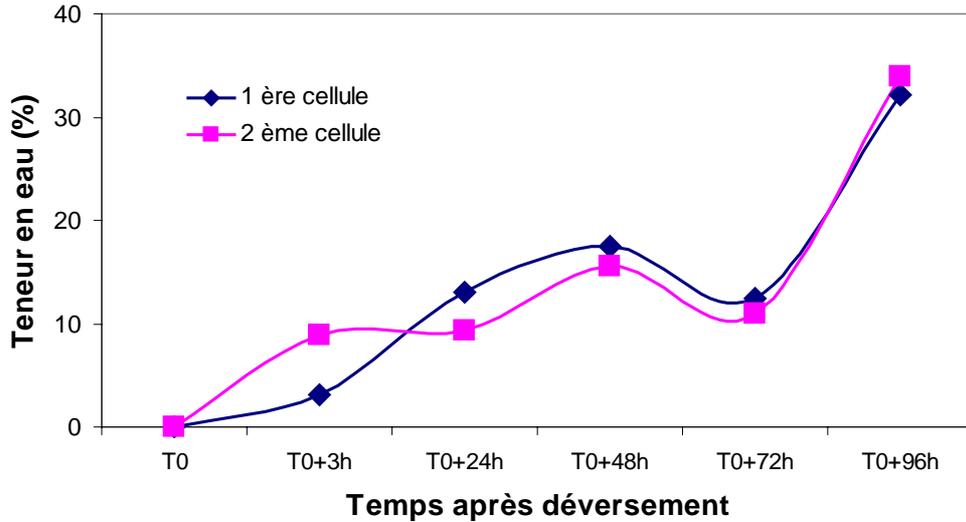


Figure 4.6 : Evolution de la teneur en eau dans l'émulsion d'huile de ricin, à la surface de deux cellules flottantes, durant la période expérimentale : T₀, T₀ + 3 h, T₀ + 24 h, T₀ + 48 h, T₀ + 72 h et T₀ + 96 h

Il est possible de s'affranchir du paramètre "temps" en représentant la viscosité et la densité en fonction de la teneur en eau (*i.e.* de l'importance du processus d'émulsification). Les données des deux cellules peuvent alors être regroupées. En se chargeant en eau, l'émulsion voit sa viscosité augmenter de façon logarithmique pour approcher les 3800 mPa.s⁻¹ (Figure 4.7). Ce seuil est trois fois plus élevé que la viscosité initiale du produit (à 10°C, 1017 mPa.s⁻¹).

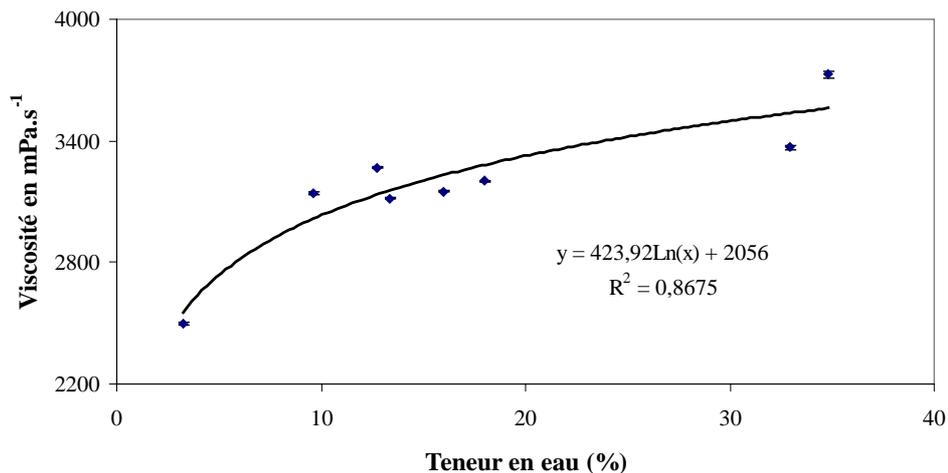


Figure 4.7 : Evolution de la viscosité (mPa.s⁻¹) de l'émulsion eau-huile de ricin en fonction de la teneur en eau (%).

En se chargeant en eau, l'émulsion voit sa densité augmenter également de façon logarithmique (Figure 4.8). L'équation de régression indique une densité de 0.963 pour

une teneur en eau nulle ce qui est en accord avec la littérature (densité de 0.96 pour le produit pur). Ainsi, en vieillissant à la surface de la mer, l'huile de ricin voit sa densité se rapprocher de celle de l'eau de mer tout en conservant un caractère flottant marqué.

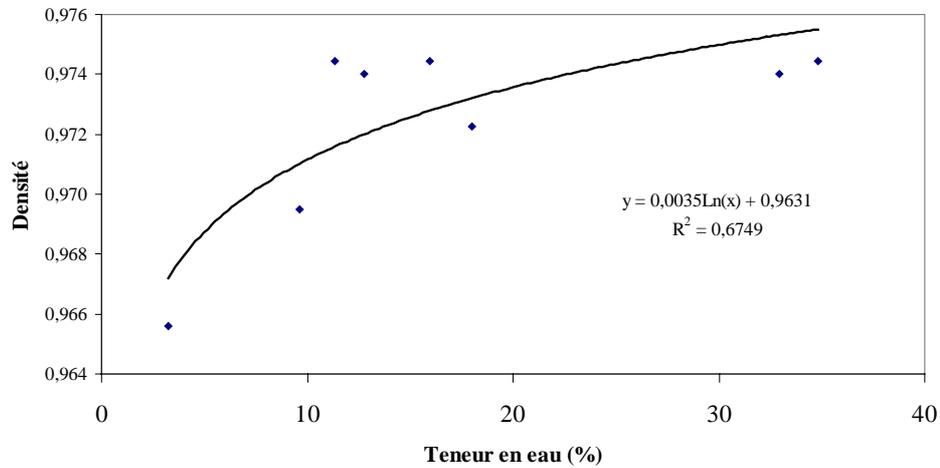


Figure 4.8 : Evolution de la densité de l'émulsion eau-huile de ricin en fonction de la teneur en eau (%).

2.2 L'huile de soja

Les conditions météo-océaniques sur zone sont résumées dans le tableau 4.4.

Tableau 4.4 : Données météorologiques lors de l'expérimentation sur l'huile de soja en cellules flottantes en rade de Brest.

	T° air (°C)	T° eau (°C)	Vent (km.h ⁻¹)	Force Beaufort	Temps
T₀ ; T₀+3h	6-8	10,0	SE très faible voire inexistant	0	Temps couvert avec qq rayons de soleil
T₀+24h	6-8	10,0	SE 5-10	2	Temps beau
T₀+48h	10	10,3	SE très faible voire inexistant	0	Grand soleil
T₀+72h	10	10,3	S-SE 15	3	Couvert, brume toute la journée
T₀+96h	9	10,3	S-SE 10-15	3	Couvert, brume toute la journée

Cette semaine d'expérimentation a été marquée par des conditions météorologiques variées, avec un début de période très calme et une fin de période un peu plus agitée, des

directions de vent de même orientation et des variations de température de l'air de 1 à 4°C.

- Observations sur le comportement du produit

Les figures 4.9A et 4.9B, de la surface des cellules en début et fin de période expérimentale, illustrent le caractère flottant persistant du produit. Après déversement, la nappe se présente sous forme d'un agglomérat de gouttes de tailles diverses (A) alors qu'en fin de période elle offre un aspect homogène et très faiblement blanchâtre (B).

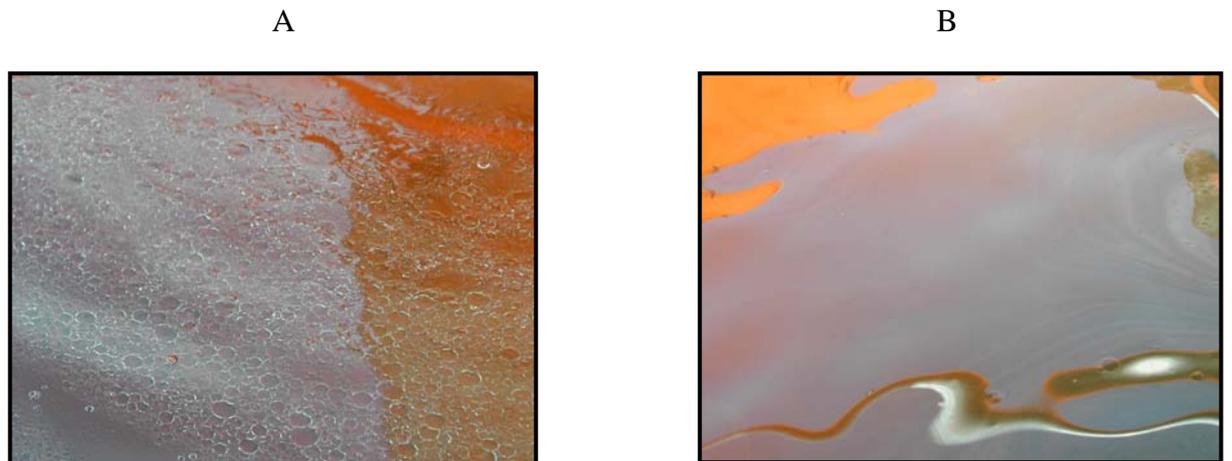


Figure 4.9 : Photographie de la surface des cellules de l'huile de soja à T_0 (A) et à T_0+72h (B)

- Suivi de l'émulsion

La figure 4.10 illustre la capacité de l'huile de soja à s'émulsionner en milieu marin. En effet, pour la première cellule et à $T_0 + 72$ h, l'huile a incorporé 7% d'eau. Cependant, ce processus est réversible puisqu'à $T_0 + 96$ h où cette teneur en eau n'est plus que de 2%. Pour la deuxième cellule, la cinétique d'émulsification est plus lente mais toujours croissante : à $T_0 + 48$ h, elle est légèrement inférieure à 2% et à $T_0 + 96$ h, elle est de 3%. Ces évolutions caractérisent une émulsion de type mésostable.

La différence observée entre les deux cellules est liée au fait que la deuxième cellule située la plus au Nord est la plus éloignée de la digue, la plus exposée au vent et donc présente une agitation de surface supérieure à celle de la première cellule.

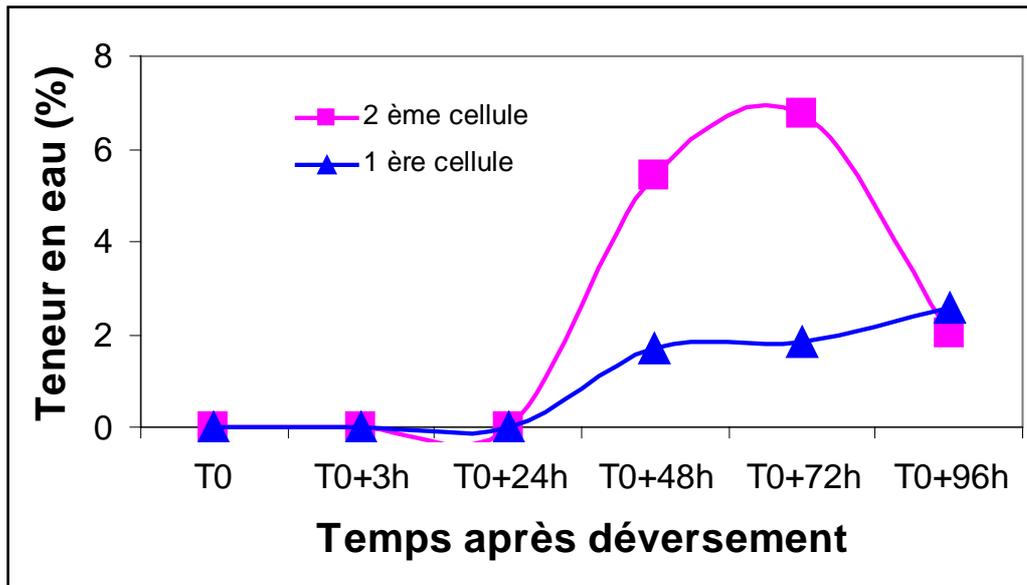


Figure 4.10 : Evolution de la teneur en eau (%) dans l'émulsion d'huile de soja à la surface de deux cellules flottantes durant la période expérimentale : T₀, T₀+3 h, T₀+24h, T₀+48h, T₀+72h et T₀+96h

Cette faible émulsification n'engendre pas de variation significative de la viscosité et de la densité des nappes en surface (Figure 4.11 et 4.12). Dans les deux cas, le modèle de régression donne des valeurs de viscosité et de densité voisines des valeurs initiales et ceci aux différents temps d'échantillonnage : respectivement 99 mPa.s-1 et 0,921 pour la viscosité et la densité.

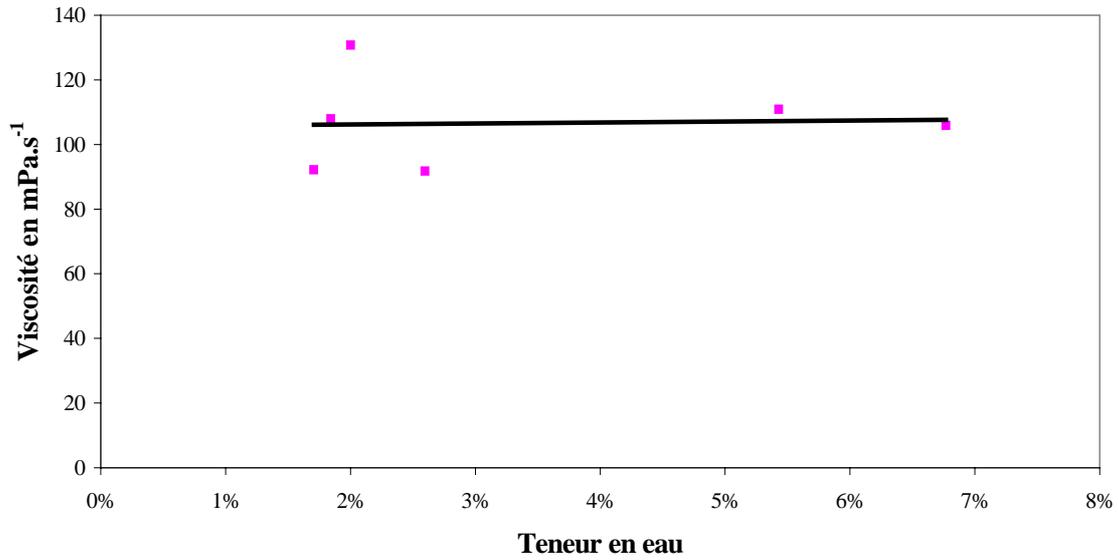


Figure 4.11 : Evolution de la viscosité (mPa.s⁻¹) de l'émulsion eau-huile de soja en fonction de la teneur en eau (%)

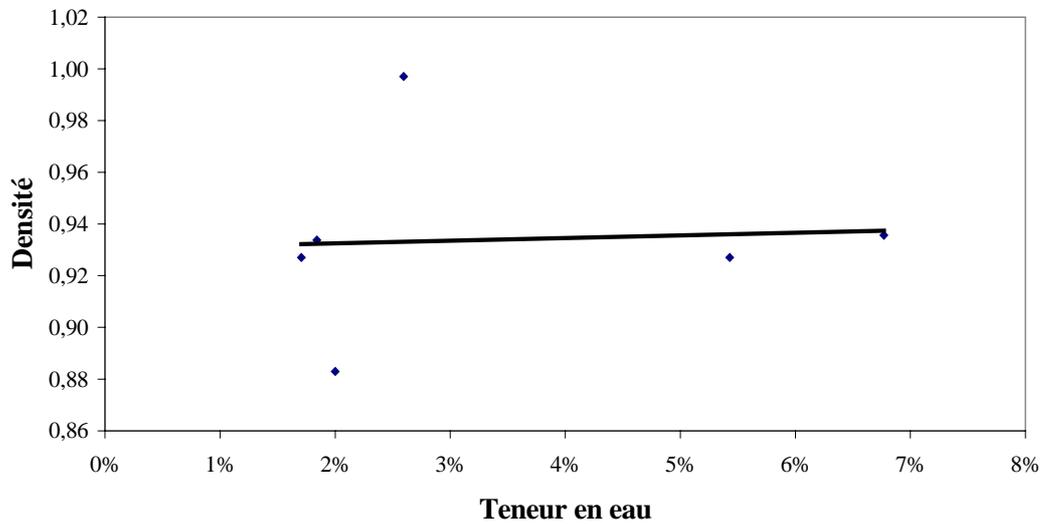


Figure 4.12 : Evolution de la densité de l'émulsion eau-huile de soja en fonction de la teneur en eau (%)

2.3 L'acide oléique

Les conditions météo-océaniques sur zone sont résumées dans le tableau 4.5.

Tableau 4.5 : Données météorologiques lors de l'expérimentation sur l'acide oléique en cellules flottantes en rade de Brest.

	<i>T° air (°C)</i>	<i>T° eau (°C)</i>	Vent (km.h ⁻¹)	Force Beaufort	<i>Temps</i>
T₀; T₀+3h	13	9,4	SO 25-30	4-5	couvert, crachin
T₀+24h	15	9,6	SO 0	0	soleil
T₀+48h	10	9,8	SO 1-2	0	couvert, brume, crachin
T₀+72h	12	10,0	SO-O 15-20	3	couvert puis soleil
T₀+96h	10	10,0	S-SO 40-55	6-7	couvert, crachin

Cette semaine d'expérimentation a été marquée par des conditions météorologiques variées, avec un début de période un peu agitée, un milieu de période très calme et une fin de période à nouveau agitée avec des directions de vent de même orientation et des variations de température de l'air de 2 à 5°C. Suite aux conditions météo-océaniques très fortes, le produit n'a pu être récupéré en fin d'expérimentation à T₀ + 96 h. C'est pourquoi il est resté deux jours supplémentaires correspondant à la période du week-end sous une tempête de force beaufort 8-9 et des vents de 80 à 90 km.h⁻¹.

- Observations sur le comportement du produit

La figure 4.13 illustre le caractère flottant du produit. La nappe couvre de façon homogène toute la surface de la cellule.

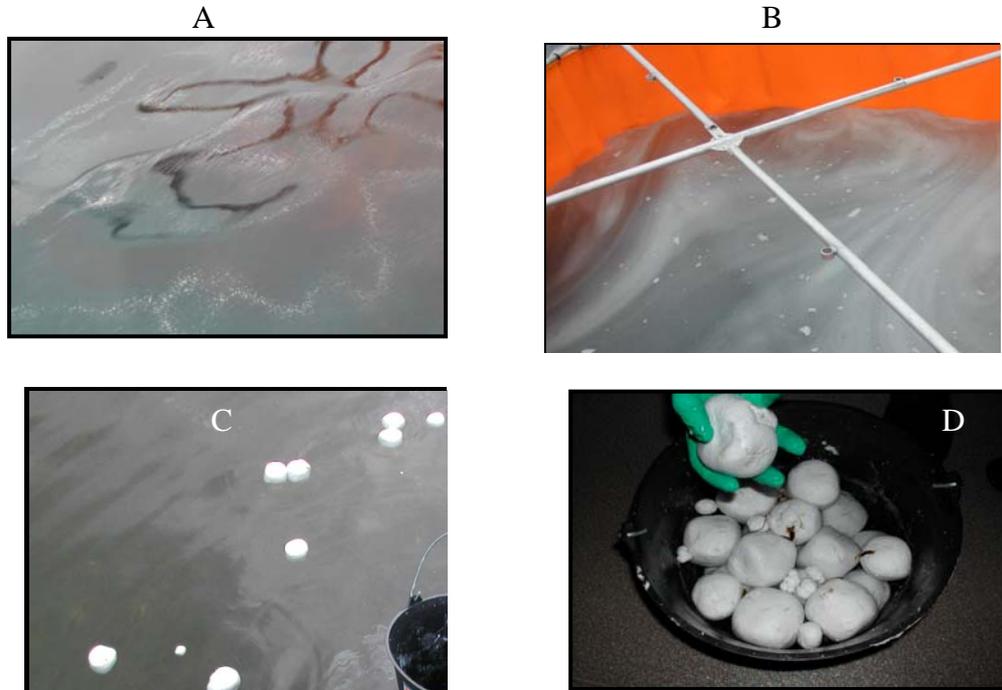


Figure 4.13 : Photographies de l'acide oléique à la surface de la cellule à T_0 (A), à $T_0 + 72$ h (B) et $T_0 + 150$ h (C&D)

La figure 4.13 C&D montre la singularité de ce produit qui, en fin de période expérimentale et après la tempête ($T_0 + 150$ heures), est récupéré sous forme de boules de tailles variées.

- Suivi de l'émulsification

La figure 4.14 illustre la capacité de l'acide oléique à s'émulsionner en milieu marin.

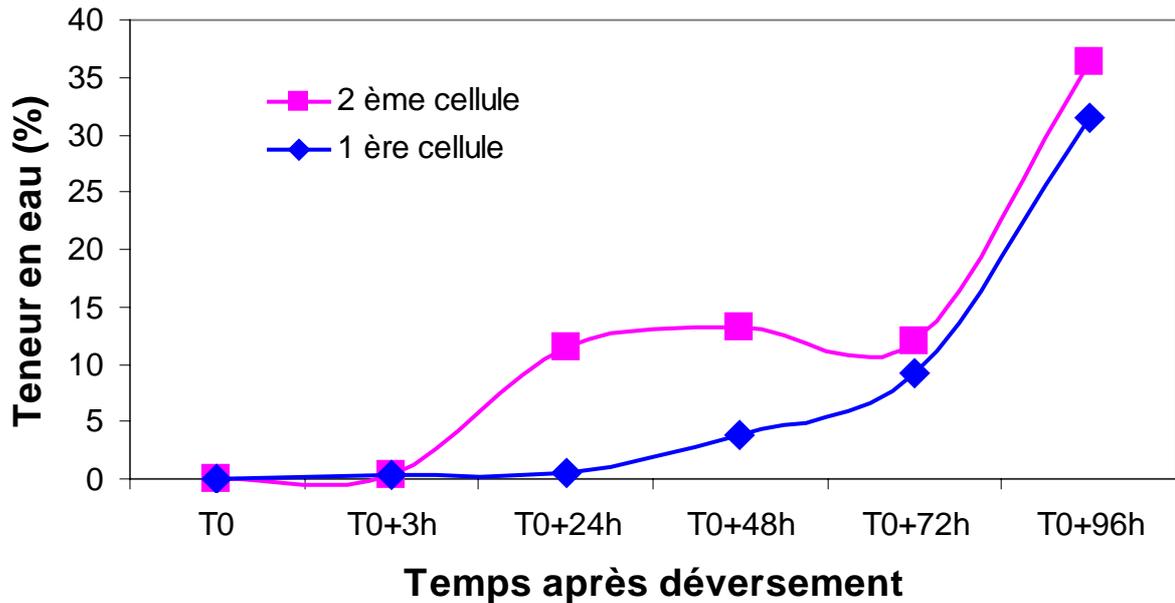


Figure 4.14 : Evolution de la teneur en eau (%) dans l'émulsion d'acide oléique à la surface de deux cellules flottantes durant la période expérimentale : T₀, T₀+ 3 h, T₀+ 24 h, T₀+ 48 h, T₀+ 72 h et T₀+ 96 h

Pour la deuxième cellule et à T₀ +24 h, l'acide oléique a incorporé 12% d'eau. Ce processus se confirme puisqu'à T₀ + 96 h, la teneur en eau est de 36%. Cette aptitude à s'émulsionner est confirmée par les résultats obtenus sur la nappe de la première cellule: à T₀ +24h, elle est de 2% et à T₀ +96h, elle est de 32%. La différence observée entre les deux cellules (stabilisation entre T₀ + 24 h et T₀ + 72 h de l'émulsion dans la deuxième cellule et émulsification croissante dans la première cellule) est liée au fait que la deuxième cellule située, la plus au Nord, est la plus exposée au vent et présente une agitation de surface supérieure à la première cellule. Par définition cette émulsion est une émulsion stable.

La figure 4.15 montre qu'il n'est pas possible de corréler l'évolution de la viscosité de la nappe en fonction des teneurs en eau. Cependant, la viscosité croît au cours de l'expérimentation ce qui caractérise le processus de solidification illustré sur la figure 4.13C&D. L'analyse chimique des « boules », de diamètre pouvant atteindre 10 cm, a confirmé qu'elles sont constituées d'oléate, ce qui permet de constater que la solidification de l'acide oléique est due à des phénomènes de cristallisation.

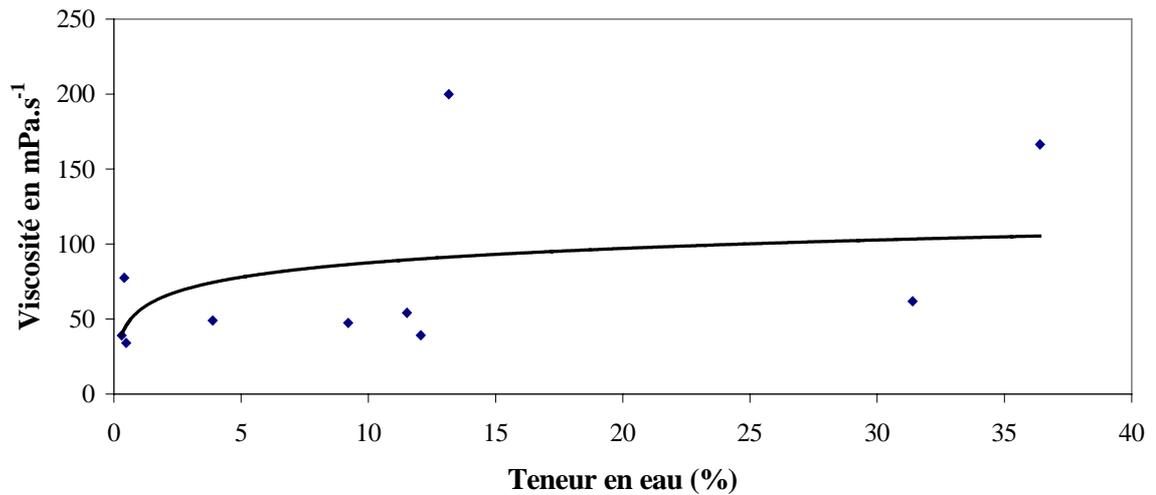


Figure 4.15 : Evolution de la viscosité (mPa.s⁻¹) de l'émulsion d'acide oléique en fonction de la teneur en eau (%)

Le caractère flottant de l'acide oléique est conservé tout au long de l'expérimentation : les émulsions prélevées à $T_0 + 96$ h ont une densité inférieure à celle de l'eau de mer, densité qui semble atteindre une valeur asymptotique de 0,95 (Figure 4.16). De plus, les boules observées à $T_0 + 150$ h flottent également dans les cellules. Ce caractère flottant est donc conservé lors du passage de l'état liquide à l'état solide.

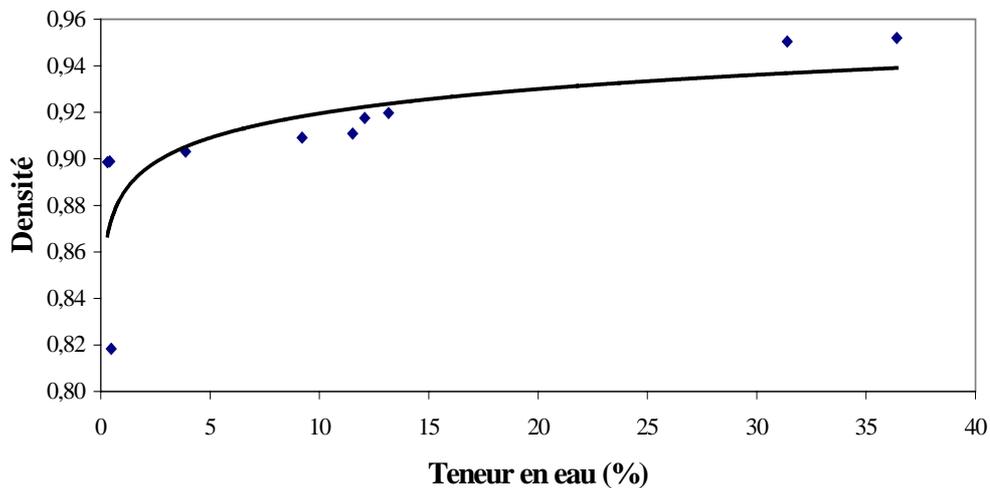


Figure 4.16 : Evolution de la densité de l'émulsion d'acide oléique en fonction de la teneur en eau (%)

2.4 Le dioctylphtalate

Les conditions météo-océaniques sur zone sont résumées dans le tableau 4.6.

Tableau 4.6 : Données météorologiques lors de l'expérimentation sur le dioctylphtalate en cellules flottantes en rade de Brest.

	$T^{\circ} \text{ air } (^{\circ}\text{C})$	$T^{\circ} \text{ eau } (^{\circ}\text{C})$	Vent (km.h^{-1})	Force Beaufort	Temps
T₀; T₀+3h	10	9	SE-E 20	4	Grand soleil
T₀+24h	10	8	SE-E 2-5	1	Soleil mais couvert
T₀+48h	10	8	S 5-10	2	Couvert, pas de soleil
T₀+72h	8	8	S-SO 5	1	Pluie
T₀+96h	8	7	S-SO très faible voire inexistant	0	Pluie

Cette semaine d'expérimentation a été marquée par des conditions météorologiques variées, avec un début de période très agité, un milieu et une fin de période plus calme, des directions de vent d'orientation changeante et des variations de température de l'air de 2°C.

- Observations sur le comportement du produit

La figure 4.17 (A et B) de la surface des cellules en début et fin de période expérimentale illustre le caractère flottant persistant du produit. L'aspect de la nappe n'a pas montré d'évolution significative au cours de la semaine d'expérimentation.

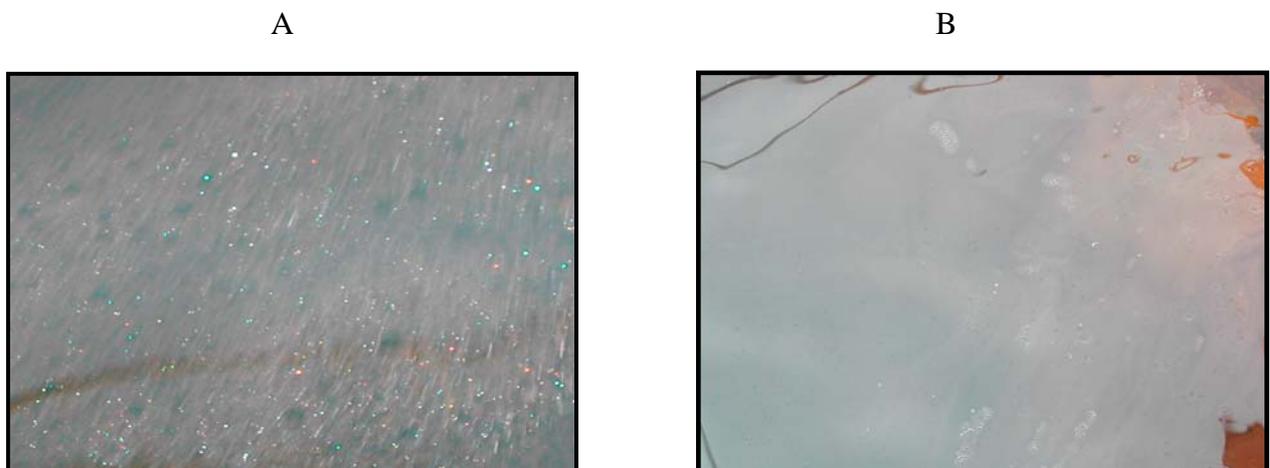


Figure 4.17 : Photographies de la dioctylphtalate à la surface de la cellule à T₀ (A), à T₀ + 72 h (B)

- Suivi de l'émulsification

La figure 4.18 illustre la capacité de la DOP à s'émulsionner en milieu marin. Pour la deuxième cellule, dès $T_0 + 3$ h, la DOP a incorporé 5% d'eau. Cependant, ce processus est réversible puisqu'à $T_0 + 24$ h il n'est plus que de 2%, pour augmenter de nouveau jusqu'à 7% à $T_0 + 72$ h. Cette tendance est également observée pour la première cellule mais celle-ci étant plus abritée que la deuxième cellule, cette évolution est moins marquée.

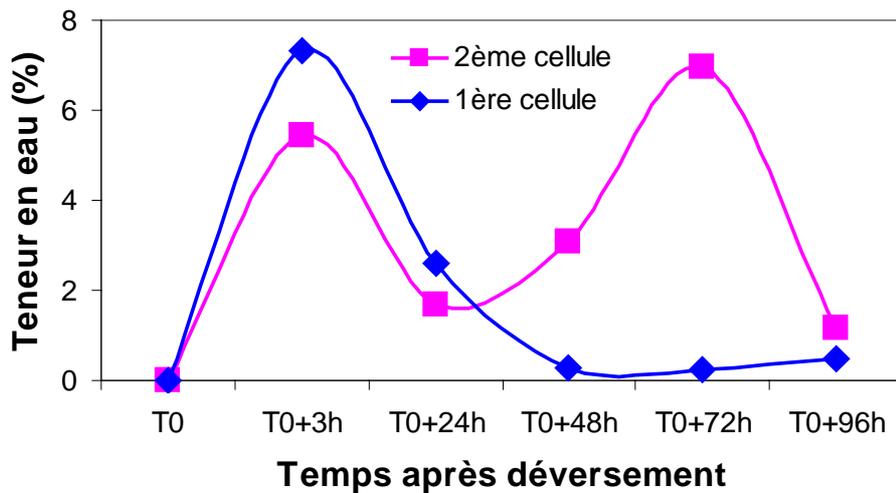


Figure 4.18 : Evolution de la teneur en eau (%) dans l'émulsion de dioctylphtalate à la surface de deux cellules flottantes durant la période expérimentale : T_0 , $T_0 + 3$ h, $T_0 + 24$ h, $T_0 + 48$ h, $T_0 + 72$ h et $T_0 + 96$ h

Il est possible de s'affranchir du paramètre "temps" en représentant viscosité et densité en fonction de la teneur en eau (*ie.* de l'importance du processus d'émulsification). Les données des deux cellules peuvent alors être regroupées (Figure 4.19 et 4.20).

La figure 4.19 montre qu'il n'est pas possible de corréler l'évolution de la viscosité de la nappe en fonction des teneurs en eau. Cependant, la viscosité observée $T_0 + 96$ h est trois fois supérieure à celle de T_0 et il est possible qu'un phénomène atypique prenne place dans l'ensemble des processus qui caractérisent le vieillissement d'une nappe de DOP à la surface de la mer ; ce phénomène pourrait correspondre à un début de cristallisation.

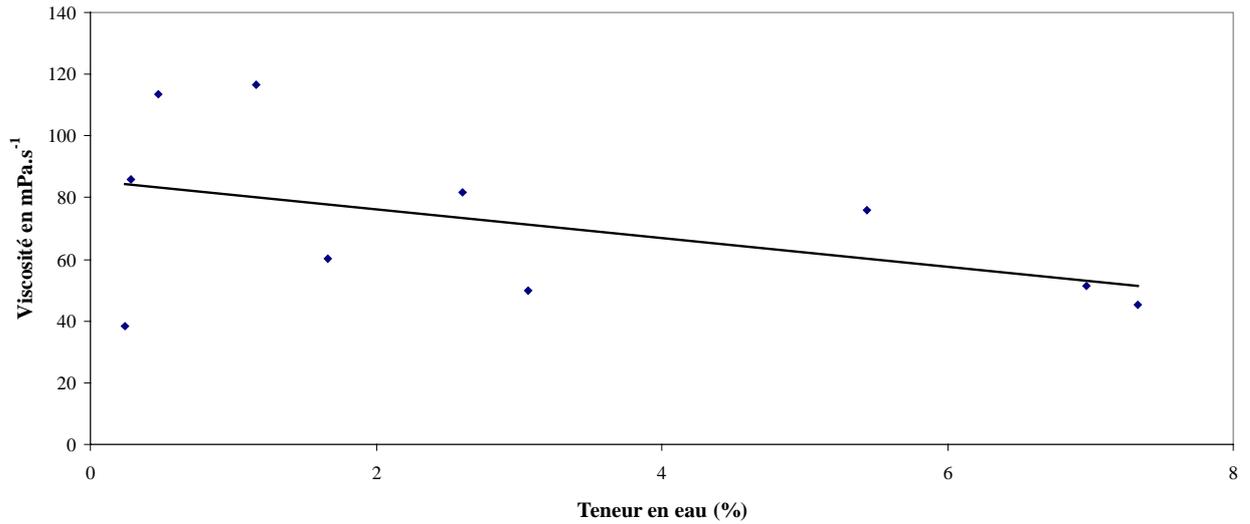


Figure 4.19 : Evolution de la viscosité (mPa.s⁻¹) de l'émulsion de dioctylphtalate en fonction de la teneur en eau (%)

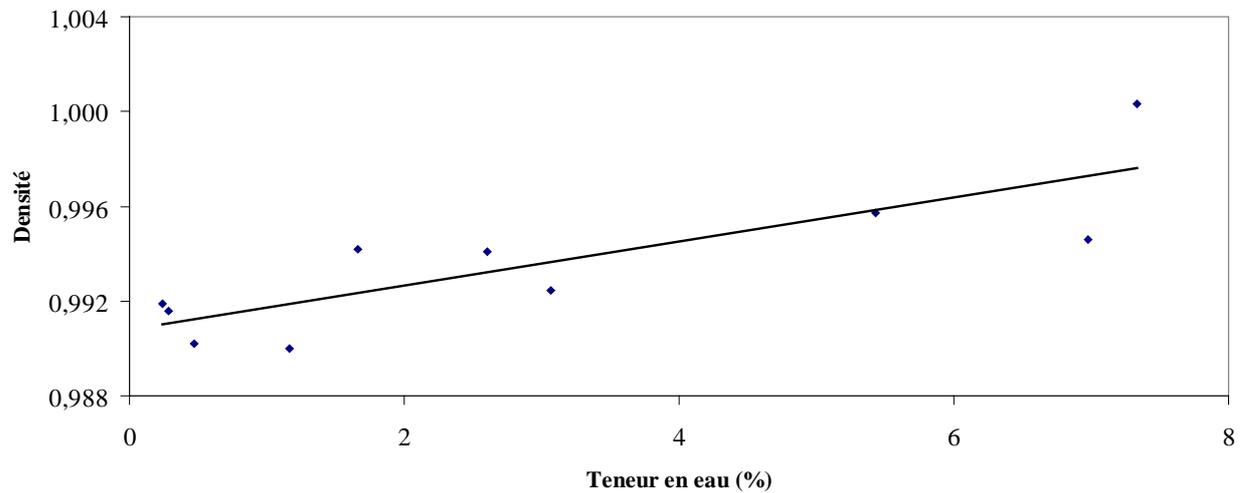


Figure 4.20 : Evolution de la densité de l'émulsion de dioctylphtalate en fonction de la teneur en eau (%)

En se chargeant en eau, l'émulsion voit sa densité augmenter (figure 4.20). La pente à l'origine du modèle de régression indique une densité de 0.99, ce qui est en accord avec la littérature qui donne une densité de 0.986 pour le produit pur. Ainsi, en vieillissant à la surface de la mer, la DOP voit sa densité se rapprocher de celle de l'eau de mer tout en conservant son caractère flottant.

2.5 Le styrène

Les conditions météo-océaniques sur zone sont résumées dans le tableau 4.1.

- Observations sur le comportement du produit

La figure 4.21A (T_0), illustre le caractère flottant du produit : nappe en surface présentant de nombreuses colorations du type irisations. La 4.21B montre l'évolution du styrène au cours de l'expérimentation et notamment le changement de couleur : produit incolore (à T_0) qui se teinte en jaune orangé au fil du temps. Cette coloration pourrait être le résultat des processus de photo-oxydation. A $T_0 + 48$ h, plus aucune nappe de styrène n'était visible à la surface de l'eau. Le temps nécessaire à la disparition des 50 l de produit selon des processus d'évaporation et de dissolution a pu être estimée à environ 29 heures.

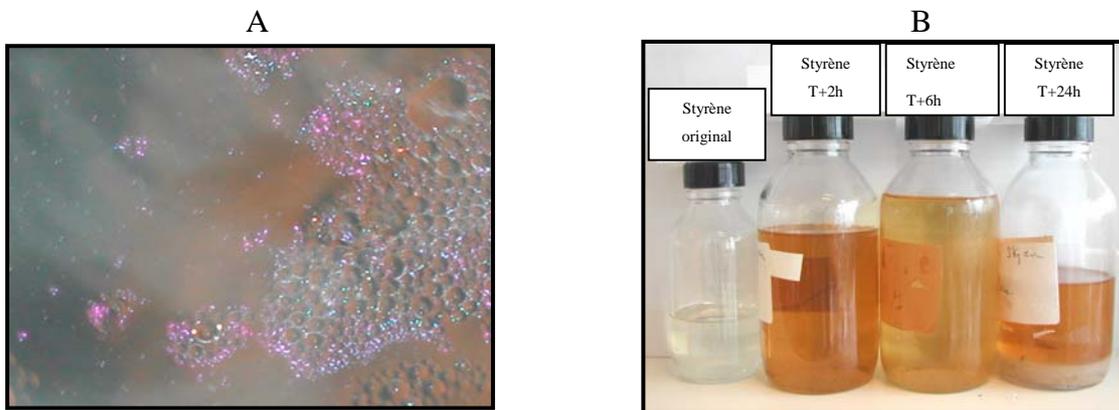


Figure 4.21 : Photographie de la surface de la cellule de styrène à T_0 (A) et comparaison des échantillons (B) à T_0 , $T_0+ 2$ h, $T_0+ 6$ h et $T_0+ 24$ h

- Suivi de l'émulsification

La figure 4.22 montre que la teneur en eau de la nappe de styrène est proportionnelle à son temps de séjour à la surface de la mer : elle passe de 0,25% à $T_0 + 2$ h à 2,06% à $T_0 + 24$ h selon une loi linéaire.

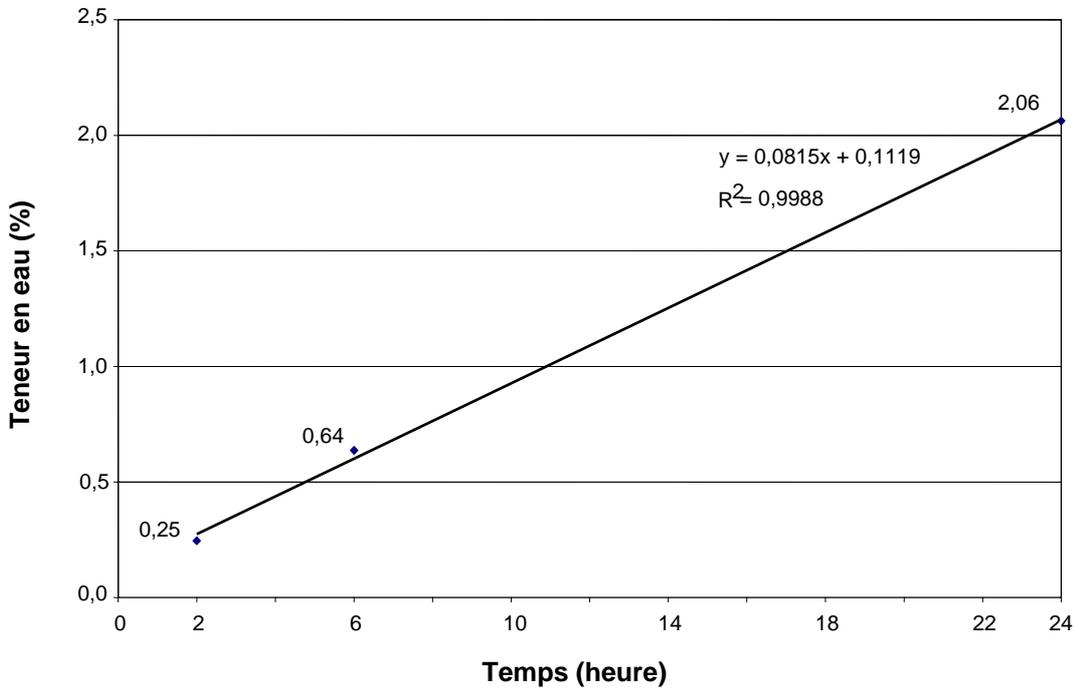


Figure 4.22 : Evolution de la teneur en eau (%) dans l'émulsion de styrène à la surface de la cellule flottante durant la période expérimentale : T_0 , $T_0 + 2$ h, $T_0 + 6$ h et $T_0 + 24$ h

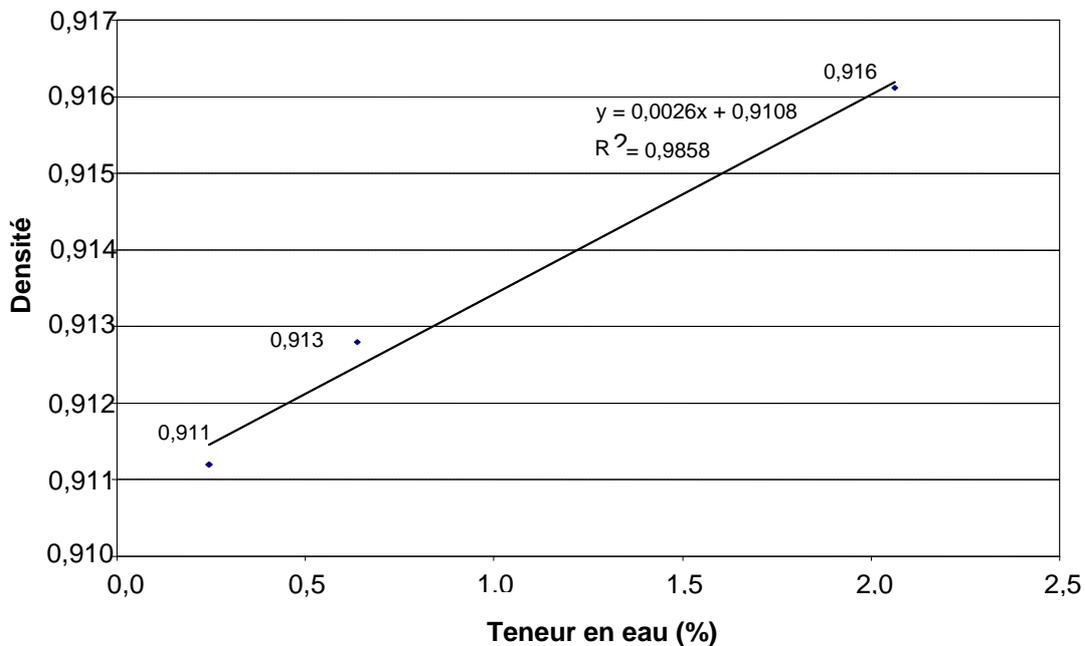


Figure 4.23 : Evolution de la densité de l'émulsion de styrène en fonction de la teneur en eau (%)

La figure 4.23 montre que les processus d'émulsification engendrent une augmentation de la densité du produit, cette évolution suit une loi linéaire.

Cependant, ces résultats ne sont exploitables que sur les premières heures qui suivent le déversement puisque, au-delà de $T_0 + 29$ h, plus aucune trace de styrène n'a pu être détectée à la surface de l'eau. L'émulsification apparaît donc comme étant un processus minoritaire dans le vieillissement du styrène en mer.

2.6 Le benzène

Les conditions météo-océaniques sur zone sont résumées dans le tableau 4.2.

- Observations sur le comportement du produit

La figure 4.24 (A), illustre le caractère flottant du produit : nappe en surface présentant de nombreuses colorations du type irisation. La 4.24 B montre l'évolution du styrène au cours de l'expérimentation et notamment le changement de couleur : produit incolore (à T_0) qui se teinte en jaune orangé au fil du temps. Cette coloration pourrait être le résultat des processus de photo-oxydation du benzène.

Dès $T_0 + 1$ h, le benzène était difficilement échantillonnable à la surface de la cellule et à $T_0 + 4$ h, plus aucune nappe de benzène n'était visible à la surface de l'eau. Le temps nécessaire à la disparition de 50 l de produit selon les processus d'évaporation, de dissolution et des conditions météo a donc pu être estimé à environ 3 heures.

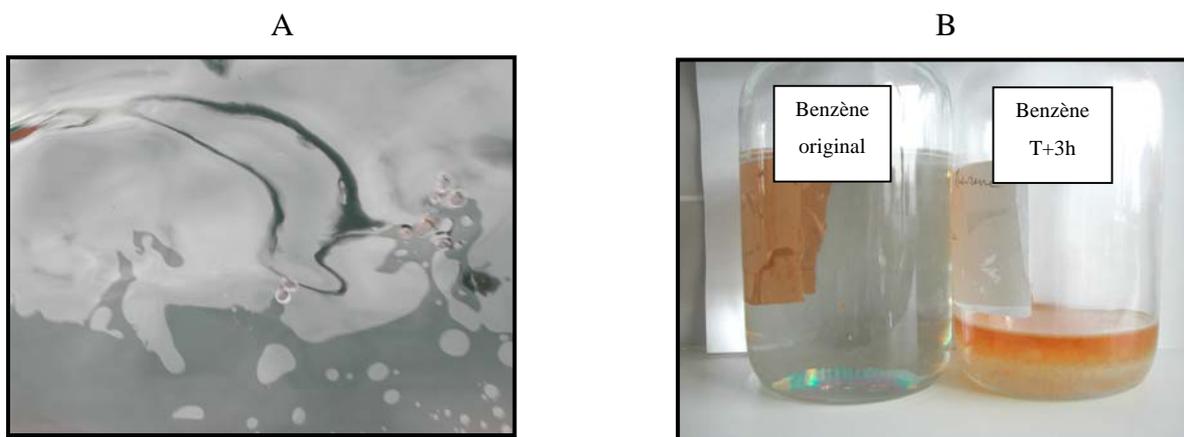


Figure 4.24 : Photographie de la surface de la cellule de styrène à T_0 (A) et comparaison des échantillons (B) à T_0 et $T_0 + 3$ h

- Suivi de l'émulsification

Au vu de l'évolution rapide de la nappe de benzène il n'a pas été possible de l'échantillonner en quantité suffisante pour réaliser les mesures de densité et de teneur en eau. Les caractéristiques physico-chimiques du benzène ne permettent donc pas d'observer une émulsification.

2.7 Discussion

Les produits étudiés ont conservé leur caractère flottant tout au long de la période d'expérimentation ; leur densité est restée inférieure à celle de l'eau de mer même si elle a, de façon générale, faiblement augmenté. Pour les produits dits être « des mélanges », ils se sont naturellement émulsionnés, les teneurs en eau ayant atteint des maxima de 35% pour l'acide oléique (Fp), 34% pour l'huile de ricin (Fp) et 7% pour l'huile de soja (Fp) et la dioctylphtalate (F). Après des conditions météo très fortes et donc un brassage mécanique très important, l'acide oléique est passé de l'état liquide à l'état solide. Ces données apportent des références nouvelles quant au vieillissement de ces produits en mer. Concernant les produits dits être « purs », le benzène (E) n'est pas resté assez longtemps en surface (< 3 heures) afin d'effectuer des prélèvements et des analyses. A l'inverse, le styrène (FE) a eu un temps de présence en surface assez long (environ 24 heures) tout en conservant son caractère flottant. Les analyses mettent en évidence une légère émulsification de ce produit qui atteint une teneur en eau de 2,06%.

3. Dispersion naturelle dans la colonne d'eau

3.1 L'huile de ricin

Lors de cette expérimentation, la dispersion naturelle de l'huile de ricin est détectée à des concentrations supérieures à celles données dans la littérature.

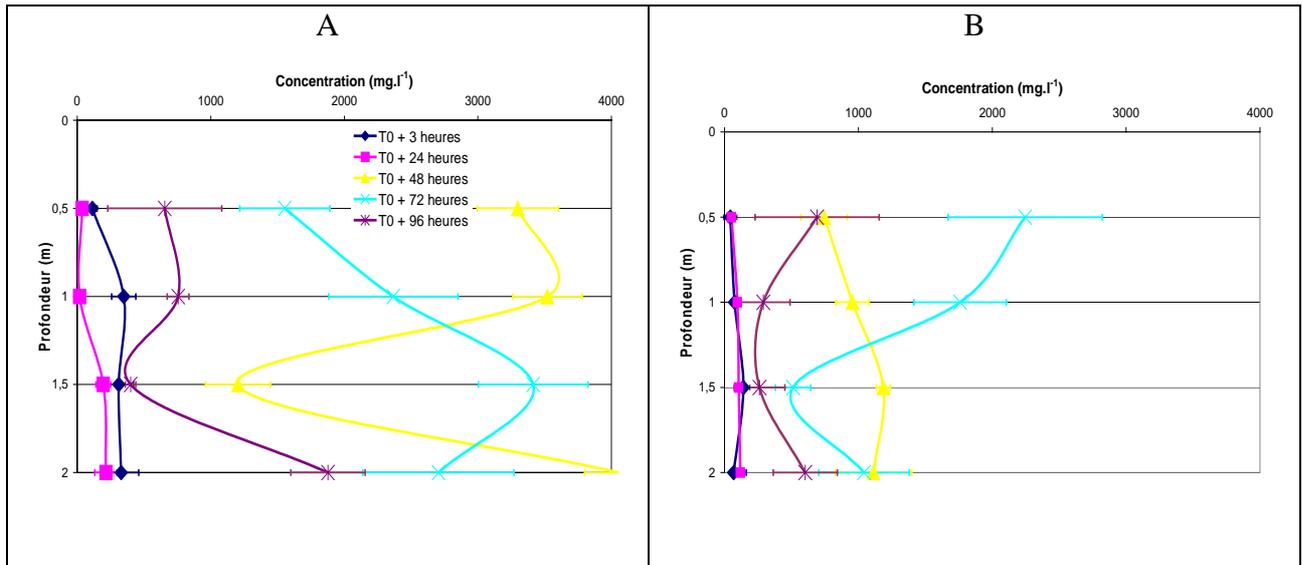


Figure 4.25 : Profils verticaux de la concentration de l'huile de ricin (mg.l^{-1} , moyenne \pm écart-type) dans la 1^{ère} cellule (A) et la 2^{ème} cellule (B) en fonction du temps ($T_0 + 3 \text{ h}$, $T_0 + 24 \text{ h}$, $T_0 + 48 \text{ h}$, $T_0 + 72 \text{ h}$, $T_0 + 96 \text{ h}$)

Les figures 4.25A et 4.25B représentent les profils verticaux de la dispersion naturelle de l'huile de ricin pendant 96 heures de 0,5 à 2 m de profondeur. Sur le plan vertical, la distribution présente une dispersion moyenne différente dans les deux cellules avec un profil de dispersion très variable d'une profondeur à une autre et notamment entre $T_0 + 48$ heures et $T_0 + 72$ heures et ce jusqu'à 2 m de profondeur. Pour les deux cellules, la dispersion naturelle moyenne augmente progressivement de T_0 à $T_0 + 48$ heures et selon la profondeur jusqu'à $T_0 + 72$ heures. Dans la première cellule, la dispersion naturelle atteint une moyenne maximale de 4000 mg.l^{-1} à 2 m de profondeur et 2246 mg.l^{-1} dans la deuxième cellule à 0,5 m de profondeur. Puis ce front de dispersion naturelle de l'huile de ricin décroît jusqu'à $T_0 + 96$ heures. Cette semaine d'expérimentation a été marquée par des vents de 5 à 30 km.h^{-1} jusqu'à $T_0 + 48$ heures puis un vent inexistant à $T_0 + 72$ heures et une reprise à $T_0 + 96$ heures d'un vent soufflant à 15 km.h^{-1} . Cette dispersion est à corrélérer implicitement avec les conditions météo avec 24 heures de décalage.

3.2 L'huile de soja

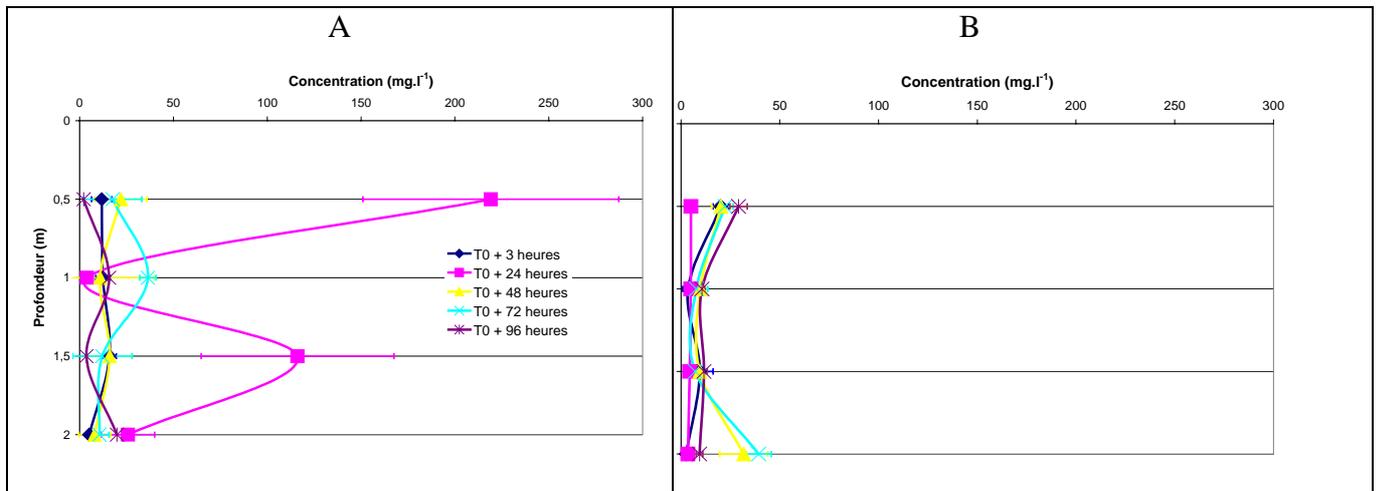


Figure 4.26 : Profils verticaux de la concentration de l'huile de soja (mg.l^{-1} , moyenne \pm écart-type) dans la 1^{ère} cellule (A) et la 2^{ème} cellule (B) en fonction du temps ($T_0 + 3 \text{ h}$, $T_0 + 24 \text{ h}$, $T_0 + 48 \text{ h}$, $T_0 + 72 \text{ h}$, $T_0 + 96 \text{ h}$)

Les figures 4.26A et 4.26B représentent les profils verticaux de la dispersion naturelle de l'huile de soja pendant 96 heures de 0,5 m à 2 m de profondeur. Sur le plan vertical, la distribution présente une dispersion différente dans les deux cellules. Elle est détectée jusqu'à 2 m de profondeur. Les variations de dispersion dans chaque cellule et en fonction de la profondeur sont relativement importantes.

Pour la première cellule, la dispersion augmente brutalement de $T_0 + 3$ heures à $T_0 + 24$ heures et atteint une moyenne maximale de 220 mg.l^{-1} avec un profil de dispersion très variable d'une profondeur à une autre. Après 24 heures de vieillissement, la dispersion reste stable dans un intervalle de 10 à 30 mg.l^{-1} pour $T_0 + 48$, 72 et 96 heures de vieillissement. Pour la deuxième cellule, la dispersion reste relativement stable dans un intervalle de 5 à 30 mg.l^{-1} ; elle est cependant détectée jusqu'à 2 m de profondeur malgré un profil de dispersion très variable.

3.3 L'acide oléique

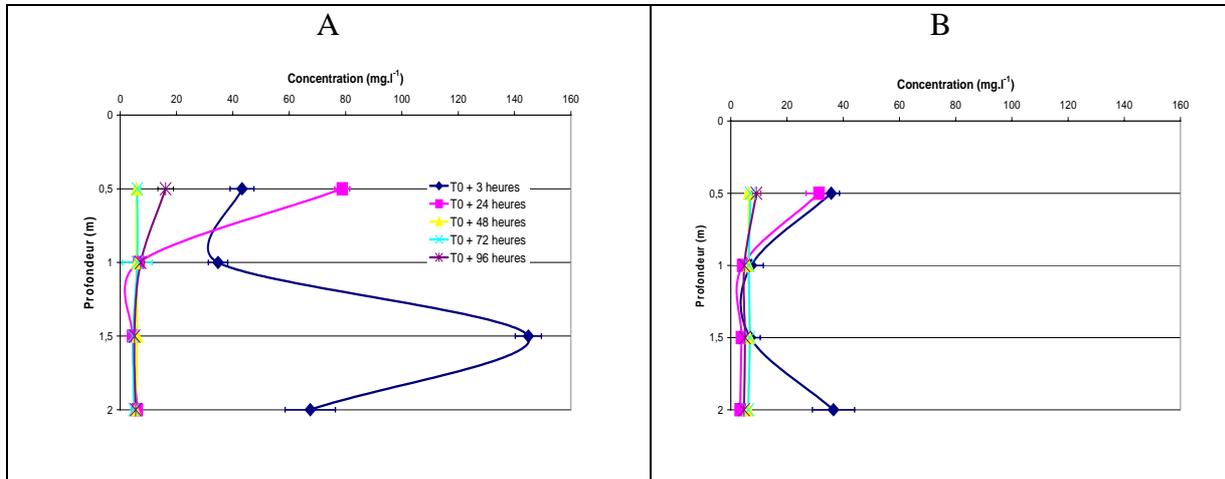


Figure 4.27 : Profils verticaux de la concentration de l'acide oléique (mg.l^{-1} , moyenne \pm écart-type) dans la 1^{ère} cellule (A) et la 2^{ème} cellule (B) en fonction du temps ($T_0 + 3 \text{ h}$, $T_0 + 24 \text{ h}$, $T_0 + 48 \text{ h}$, $T_0 + 72 \text{ h}$, $T_0 + 96 \text{ h}$)

Les 4.27A et 4.27B représentent les profils verticaux de la dispersion naturelle de l'acide oléique pendant 96 heures de 0,5 m à 2 m de profondeur. Sur le plan vertical, la distribution présente une dispersion différente dans les deux cellules, détectée jusqu'à 2 m de profondeur.

Pour la première cellule, la dispersion augmente brutalement à $T_0 + 3$ heures. Elle atteint une moyenne maximale de 144 mg.l^{-1} à 1,5 m de profondeur avec un profil de dispersion très variable d'une profondeur à une autre. A $T_0 + 24$ heures cette dispersion reste élevée à 0,5 m de profondeur avec 80 mg.l^{-1} , le reste du profil de dispersion se tient dans un intervalle de 5 à 20 mg.l^{-1} . Après 24 heures de vieillissement, le front de la dispersion reste stable dans un intervalle de 5 à 20 mg.l^{-1} pour $T_0 + 48$, 72 et 96 heures de vieillissement. Pour la deuxième cellule, la dispersion augmente également au début de l'expérimentation. A $T_0 + 3$ heures, elle atteint une moyenne maximale de 35 mg.l^{-1} à 0,5 m de profondeur avec un profil de dispersion variable d'une profondeur à une autre. A $T_0 + 24$ heures cette dispersion reste élevée à 0,5 m de profondeur avec 31 mg.l^{-1} , le reste du profil de dispersion varie dans un intervalle de 5 à 10 mg.l^{-1} . Après 24 heures de vieillissement, le front de la dispersion reste relativement stable dans un intervalle de 5 à 10 mg.l^{-1} .

3.4 Le dioctylphtalate

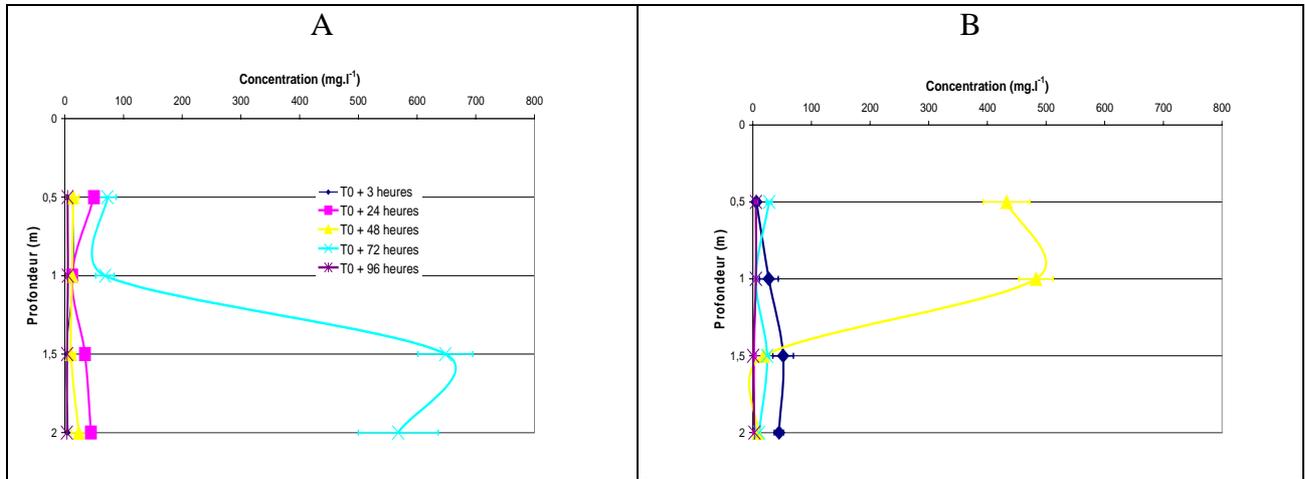


Figure 4.28 : Profils verticaux de la concentration du dioctylphtalate (mg.l^{-1} , moyenne \pm écart-type) dans la 1^{ère} cellule (A) et la 2^{ème} cellule (B) en fonction du temps ($T_0 + 3 \text{ h}$, $T_0 + 24 \text{ h}$, $T_0 + 48 \text{ h}$, $T_0 + 72 \text{ h}$, $T_0 + 96 \text{ h}$)

Les figures 4.28A et 4.28B représentent les profils verticaux de la dispersion naturelle du dioctylphtalate pendant 96 heures de 0,5 m à 2 m de profondeur. Sur le plan vertical, la distribution présente une dispersion différente dans les deux cellules. Elle est détectée jusqu'à 2 m de profondeur.

Pour la première cellule, la dispersion augmente jusqu' à $T_0 + 72$ heures où elle atteint une moyenne maximale de 650 mg.l^{-1} à 1,5 m de profondeur avec un profil de dispersion très variable d'une profondeur à une autre. Avant et après 72 heures de vieillissement, la dispersion reste stable dans un intervalle de 5 à 50 mg.l^{-1} . Pour la deuxième cellule, la dispersion naturelle atteint un maximum à $T_0 + 48$ heures de 480 mg.l^{-1} à 1 m de profondeur avec un profil de dispersion très variable d'une profondeur à une autre. Avant et après 48 heures de vieillissement, la dispersion reste stable dans un intervalle de 5 à 30 mg.l^{-1} , le profil de dispersion est stable d'une profondeur à une autre.

3.5. Le styrène

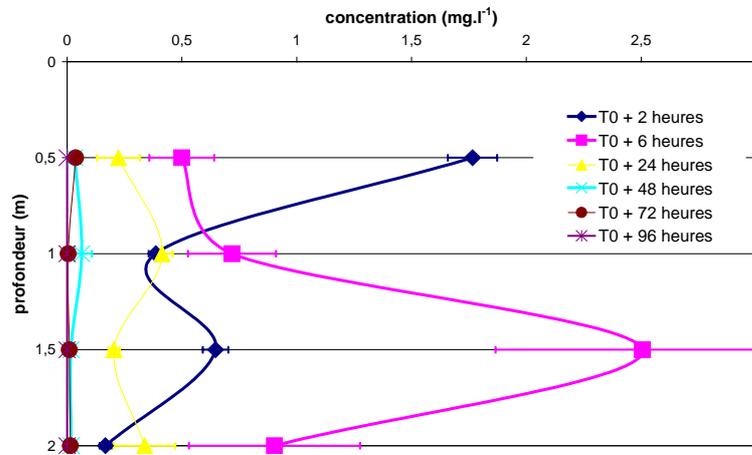


Figure 4.29 : Profils verticaux de la concentration du styrène (mg.l^{-1} , moyenne \pm écart-type) dans la 1^{ère} cellule en fonction du temps ($\text{T}_0 + 2$ h, $\text{T}_0 + 6$ h, $\text{T}_0 + 24$ h, $\text{T}_0 + 48$ h, $\text{T}_0 + 72$ h, $\text{T}_0 + 96$ h)

La figure 4.29 représente les profils verticaux de la dispersion naturelle du styrène pendant 96 heures de vieillissement de 0,5 m à 2 m de profondeur. Sur le plan vertical, la distribution présente une dispersion non homogène, détectée jusqu'à 2 m de profondeur. A $\text{T}_0 + 2$ heures, la concentration de styrène présente un maximum à 0,5 m de profondeur de $1,76 \text{ mg.l}^{-1}$ alors qu'aux autres profondeurs sa concentration est de l'ordre de $0,5 \text{ mg.l}^{-1}$. Puis, ce front de pollution migre en profondeur puisqu'à $\text{T}_0 + 6$ heures, on trouve une concentration de $0,5 \text{ mg.l}^{-1}$ à 0,5 m de profondeur et de $2,5 \text{ mg.l}^{-1}$ à 1,5 m. Si le styrène est encore détectable à $\text{T}_0 + 24$ h et à $\text{T}_0 + 48$ heures, il n'est qu'à la limite de l'être à $\text{T}_0 + 72$ heures et $\text{T}_0 + 96$ heures (concentrations inférieures à 1 mg.l^{-1}). Lors de ces essais et avec les conditions météo-océaniques du moment, le styrène n'est que faiblement passé en phase aqueuse. Par contre, cette figure présente une dispersion du styrène dans la colonne d'eau bien après qu'il soit complètement évaporé de la surface.

3.6 Le benzène

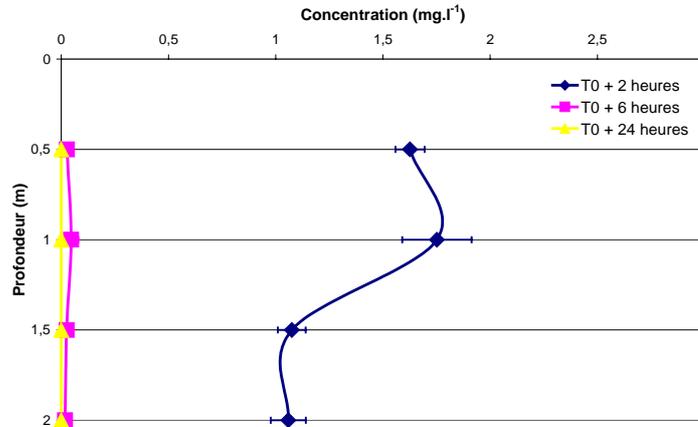


Figure 4.30 : Profils verticaux de la concentration du benzène (mg.l^{-1} , moyenne \pm écart-type) dans la 1^{ère} cellule en fonction du temps ($T_0 + 2 \text{ h}$, $T_0 + 6 \text{ h}$ et $T_0 + 24 \text{ h}$)

La figure 4.30 représente les profils verticaux de la dispersion naturelle du benzène pendant 24 heures de 0,5 m à 2 m de profondeur. Sur le plan vertical, la distribution présente une dispersion faible, détectée jusqu'à 2 m de profondeur.

A $T_0 + 2$ heures, le benzène est détecté aux quatre profondeurs avec des concentrations maximales comprises entre $1,7 \text{ mg.l}^{-1}$ à 0,5 m et 1 m de profondeur et 1 mg.l^{-1} à 1,5 m et 2 m de profondeur. A $T_0 + 6$ heures, la dispersion naturelle en benzène dans la colonne d'eau est très faible et est comprise entre $18 \mu\text{g.l}^{-1}$ et $45 \mu\text{g.l}^{-1}$. Après $T_0 + 6$ heures, il est possible de considérer la concentration en benzène dans la colonne d'eau comme étant négligeable. La dispersion naturelle du benzène et sa diffusion dans la colonne d'eau correspondent à des processus rapides. Cependant, la fraction de la nappe à se dissoudre reste très faible par rapport à la quantité déversée et ceci malgré une solubilité relativement importante donnée dans la littérature ($1,8 \text{ g.l}^{-1}$). Lors de ces essais et avec les conditions météo-océaniques du moment, le benzène n'est que faiblement passé en phase aqueuse. Cette figure présente une dispersion du benzène dans la colonne d'eau bien après qu'il soit complètement évaporé de la surface.

3.7 Discussion

Lors de cette étude, tous les produits sélectionnés se sont dispersés naturellement dans la colonne d'eau. Ces résultats expérimentaux démontrent des différences importantes avec les résultats donnés dans la littérature. La dispersion obtenue en mer en cellules flottantes est beaucoup plus importante que celle donnée dans la littérature pour les produits chimiques qui sont dit « des mélanges ». En effet, pour l'huile de ricin, une dispersion naturelle maximale de 4 g.l^{-1} est atteinte lors de ces essais alors que la littérature donne $< 1 \text{ g.l}^{-1}$. L'huile de soja présente une dispersion maximale plus faible de 220 mg.l^{-1} lors de ces essais alors que la littérature donne $< 0,1 \text{ g.l}^{-1}$. Pour la DOP et l'acide oléique, les dispersions maximales obtenues lors de ces essais sont respectivement 650 et 144 mg.l^{-1} alors que la littérature donne respectivement $3,4 \cdot 10^{-3} \text{ g.l}^{-1}$ et insoluble. Par contre, pour les produits chimiques qui sont dit « purs », leurs dispersions naturelles sont plus faibles que celles données dans la littérature. En ce qui concerne le styrène (FE) et le benzène (E), les dispersions maximales mesurées lors de ces essais sont respectivement $2,5$ et $1,7 \text{ mg.l}^{-1}$, alors que la littérature donne respectivement $0,3$ et $1,8 \text{ g.l}^{-1}$. Il est à noter que ces deux produits, une fois complètement évaporés de la surface des cellules, sont toujours détectés dans la colonne d'eau. Les résultats obtenus lors de ces études montrent un écart important entre la théorie et l'expérimentale et n'ont pas d'équivalent aujourd'hui dans la littérature scientifique.

**CHAPITRE 5 : ESSAIS *IN SITU* EN MER OUVERTE
– RAPSODI II –**

Introduction

Les objectifs de cette expérimentation RAPSODI (Remote sensing Anti Pollution System for geOgraphic Data Integration) sont d'étudier :

- la précision d'outils de télédétection, embarqués à bord d'aéronefs, pour déterminer leur efficacité dans le cadre d'un déversement de produits chimiques en mer
- le vieillissement et le devenir à court terme des produits flottants à trois niveaux :
 - dans la partie atmosphérique, les produits évaporant sont mesurés à l'aide du PID (détecteur à photoionisation)
 - à la surface, la densité, la teneur en eau et la viscosité des produits sont réalisées
 - et dans la colonne d'eau, la dispersion naturelle est suivie à l'aide d'un spectrofluorimètre de terrain (SF-UV).

1. Evolution des produits chimiques dans l'atmosphère

Pour des raisons de sécurité, le styrène et le benzène n'ont pas été déversés lors de cette expérimentation. Pour les autres produits (huiles de ricin et de soja, acide oléique et DOP), le traitement des résultats obtenus à l'aide du PID n'a pas mis en évidence la présence de carbones organiques volatiles. L'évaporation peut de ce fait être considérée comme nulle ou en deçà du seuil de détection de l'appareil. Le processus d'évaporation peut dès lors être négligé dans le comportement de ces produits en mer.

2. Vieillissement des nappes en surface

Les conditions météo-océaniques sur zone lors de cette journée d'expérimentation se caractérisent par un vent de SO de 5 nœuds, une mer à 12°C, une houle de 3-4 m et une bonne visibilité pour l'ensemble de la journée.

2.1. Dérives des nappes

La dérive des nappes a été suivie à l'aide d'un positionnement GPS au cours des phases d'échantillonnage, et en continu à l'aide de bouées argos. En reportant les différentes positions sur le logiciel MaxSea (marine software) équipé de l'atlas de courants de marées correspondant à la zone expérimentale, il apparaît clairement que ces courants

ont déterminé les dérives des nappes de produit (Figure 5.1). Ce résultat est directement lié à un vent très faible sur la zone expérimentale.

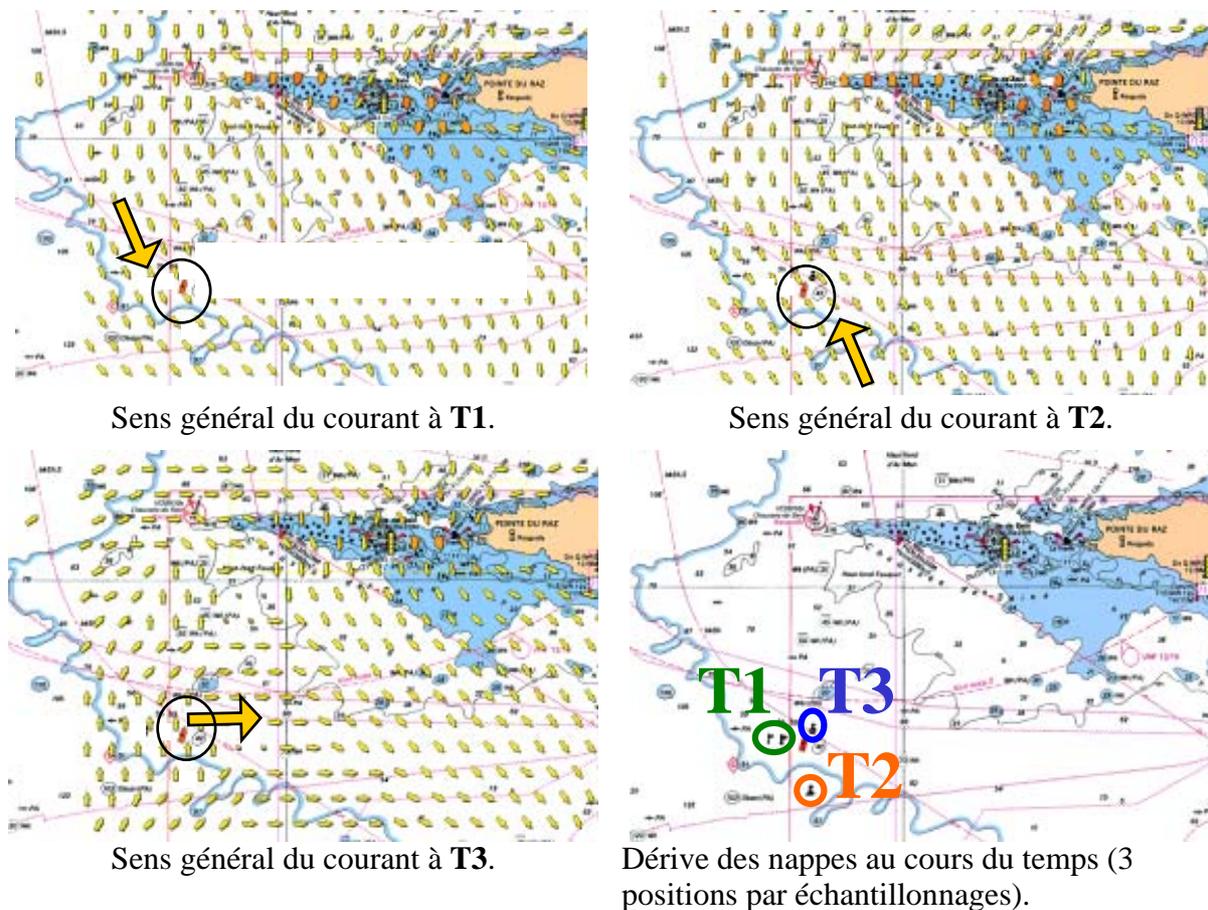


Figure 5.1 : Sens générale des courants et positionnement des nappes aux trois temps d'échantillonnages (T1 = 1^{er} échantillonnage, T2 = 2^{ème} échantillonnage, T3 = 3^{ème} échantillonnage).

Ce résultat, en plus de confirmer que le trajet des nappes en mer est essentiellement déterminé par les courants de marées (à proximité des côtes), met en évidence la nécessité de connaître parfaitement ces courants lors du choix de la zone expérimentale. En effet, ces derniers permettent de prédire dans quelle direction les nappes vont dériver et ainsi mieux préparer les phases d'échantillonnage.

2.2. Observations aériennes

2.2.1. Observations visuelles

La figure 5.2, réalisée par l'équipage du Lynx, montre l'évolution de la forme des nappes après 6 heures de dérives en mer. Il apparaît que les nappes d'huiles végétales et de dioctylphtalate se sont allongées tout en restant en un seul bloc tandis que celle de

l'acide oléique s'est fragmentée pour donner naissance à des filaments granuleux de longueurs variables (Figure 5.3A et B).

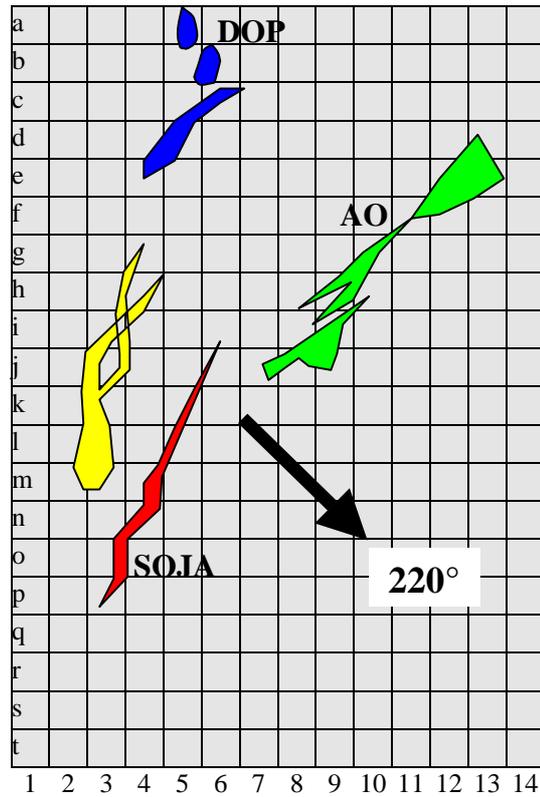


Figure 5.2 : Forme des nappes après 6 heures de vieillissement en mer (source : Marine Nationale) Échelle : 1 carreau = 100 yards x 100 yards, de a à t = 1 nautique, de 1 à 14 = 0,7 nautique.

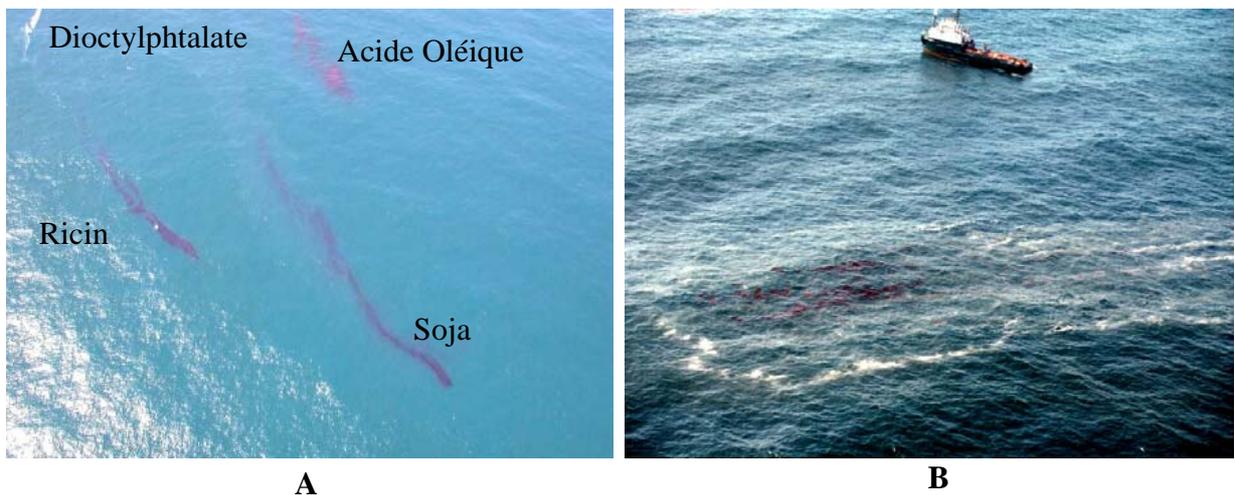


Figure 5.3 : Vue d'ensemble des nappes (A) et gros plan sur la nappe d'acide oléique (B) (source : Marine Nationale).

2.2.2. Résultats de la télédétection

L'utilisation de la télédétection avait pour objectif de caractériser la signature des différents capteurs embarqués vis-à-vis de deux huiles végétales et de deux produits chimiques.

En premier lieu, l'avion des Douanes a fait un survol de la zone expérimentale à haute altitude (3 500 pieds) afin de localiser les nappes à l'aide de son matériel de détection SLAR. Les images obtenues sont présentées sur la figure 5.4 où il est possible de repérer les nappes à la surface de la mer.

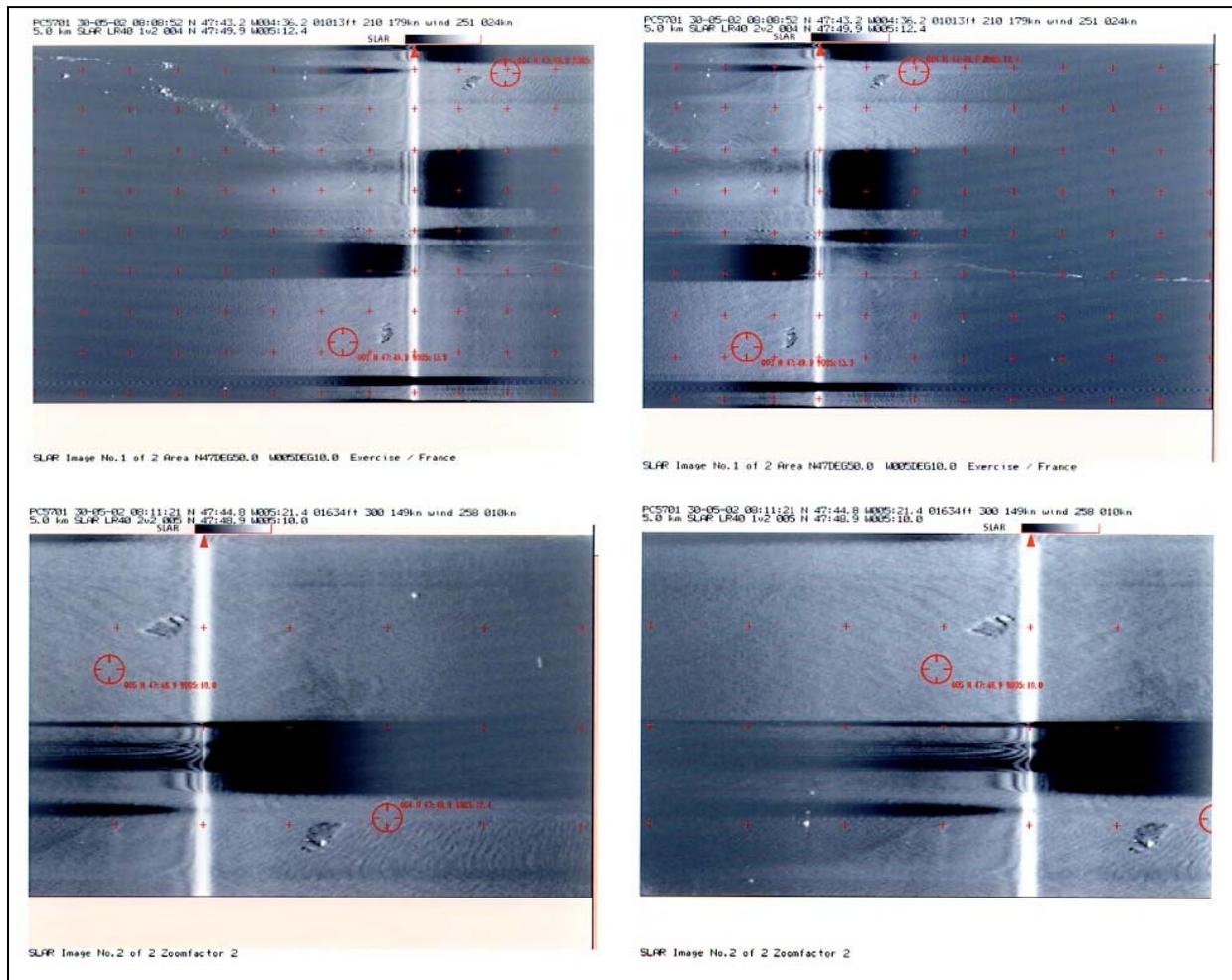


Figure 5.4 : Exemple d'imageries obtenues avec le détecteur SLAR de l'avion Polmar 2 permettant la localisation des nappes.  = Localisation des nappes détectées par le SLAR.

Ensuite, l'avion POLMAR 2 a effectué plusieurs passages à basse altitude sur les zones localisées afin de tester ses capteurs infrarouge et ultraviolet. Les images en infrarouge (IR) montrent que les quatre nappes peuvent être détectées alors qu'en ultraviolet (UV),

seuls l'acide oléique et le dioctylphtalate sont repérables (Figure 5.5). En IR, l'avion POLMAR 2 ne détecte que les zones des nappes les plus épaisses alors que sur l'image prise par l'avion allemand, les contours des nappes sont visibles. Cet équipement permet de détecter des nappes d'huile de soja, de ricin, d'acide oléique et de dioctylphtalate dérivant à la surface de la mer.

En ce qui concerne les résultats obtenus en UV, on constate que ce type d'équipement n'est pas adapté à la détection d'une nappe d'huile végétale. En effet, ni l'avion POLMAR 2 ni l'avion allemand identifient les nappes d'huile de soja et d'huile de ricin avec ce type de capteur. Par contre, l'avion POLMAR 2 identifie les nappes de deux produits chimiques, et ceci, avec une bonne appréciation de leur surface. Ce résultat ne peut pas être validé par l'image de l'avion allemand dont les spécificités de réglage du capteur étaient différentes. Le capteur UV utilisé sur l'avion POLMAR 2 permet donc d'identifier les nappes de produits chimiques.

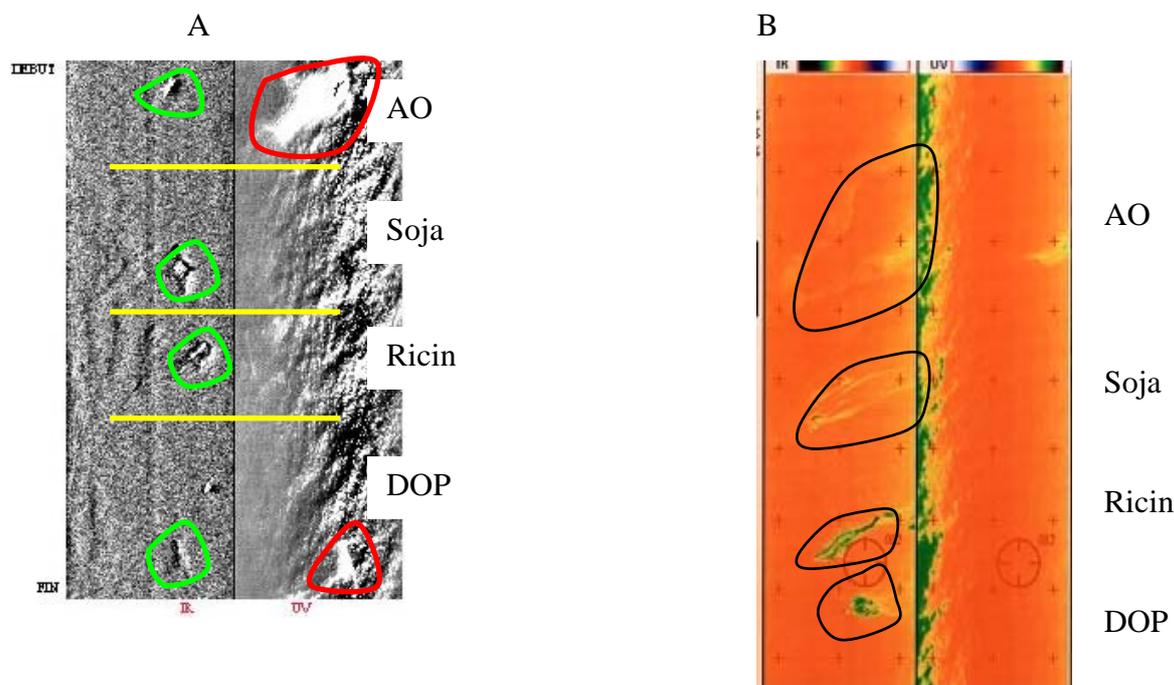


Figure 5.5 : Image IR et UV des nappes de produits prise par l'avion Polmar 2 (A) et par l'avion Allemand (B).

En pratique, la détection SLAR à haute altitude (3 500 pieds), si elle permet de localiser des nappes de pollution, doit être complétée par l'IR et l'UV en sachant que l'UV n'est pas spécifique aux huiles végétales.

2.3. Comportement physico-chimique des produits déversés

2.3.1. L'huile de ricin

La figure 5.6 illustre la capacité de l'huile de ricin à s'émulsionner en mer ouverte. Les analyses de la teneur en eau de l'huile de ricin montrent que cette huile n'incorpore pratiquement pas d'eau de mer, c'est-à-dire qu'elle a un faible pouvoir d'émulsification et ceci malgré un état de la mer de 3 beaufort (Figure 5.6A). En effet, le pourcentage d'eau n'évolue quasiment pas tout au long de l'expérimentation : il est de 2% au bout de deux heures de vieillissement (T1), de 1% après 6 heures (T2) et reste constant jusqu'à douze heures (T3). Les mesures de la viscosité (Figure 5.6B) indiquent que ce paramètre décroît de façon significative au cours du temps. Après deux heures de vieillissement, elle est passée de 2160 cSt (viscosité initiale) à 1936 cSt, pour chuter à 134 cSt au bout de six heures (diminution d'environ 90%). Cette diminution importante s'explique par un fort ensoleillement sur la zone d'expérimentation à partir de T2 (+6 heures). En effet, cet ensoleillement a eu pour principale conséquence le réchauffement de la nappe provoquant une fluidification du produit entraînant ainsi d'importantes variations de sa viscosité. La densité de cette huile ne reste pas constante au cours de son séjour en mer (Figure 5.6C). En effet, elle a baissé de 0,961 (densité du produit pur) à 0,959 après deux heures de vieillissement pour remonter à 0,981 après 8 heures et se stabiliser à 0,982 au bout de douze heures. Ainsi, plus sa durée à la surface de la mer s'allonge et plus la densité de l'huile de ricin augmente.

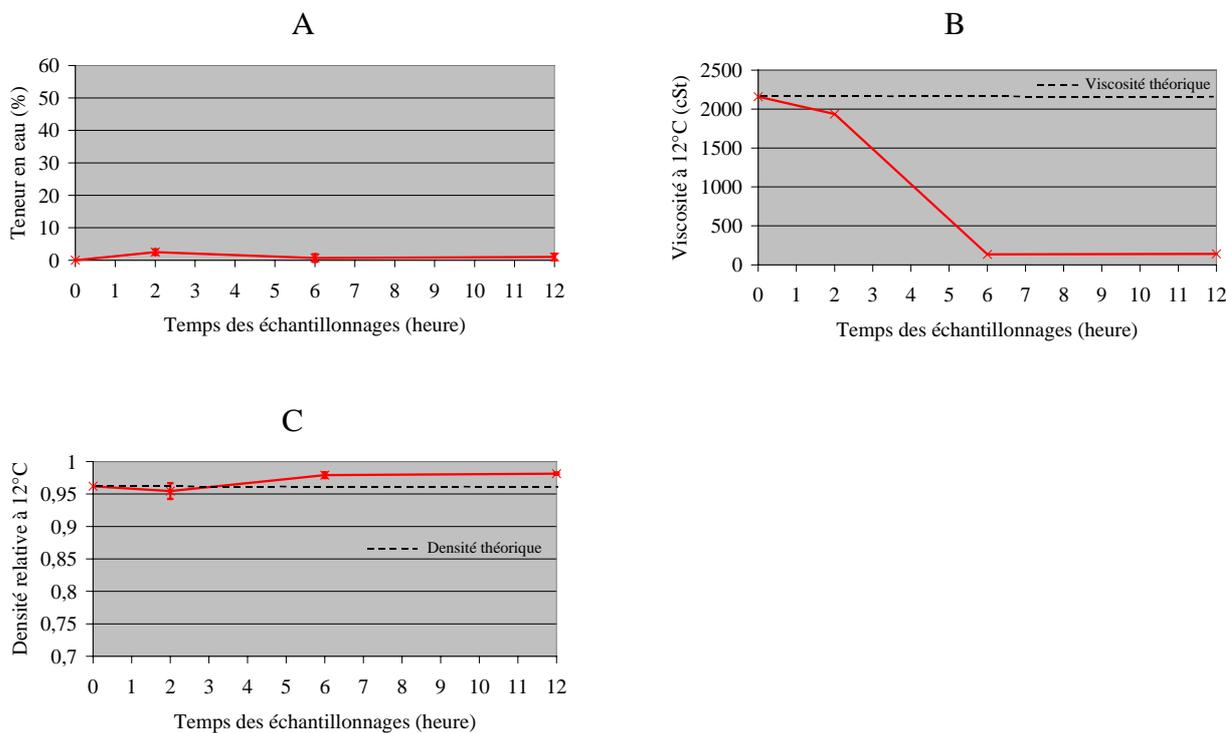


Figure 5.6 : Evolution en surface de l'huile de ricin en mer ouverte à T₀, T₁ (2 h), T₂ (6 h) et T₃ (12 h) de la teneur en eau (%), A), la viscosité (cSt), B) et la densité relative (C).

2.3.2. L'huile de soja

La figure 5.7 illustre la capacité de l'huile de soja à s'émulsionner en mer ouverte. En effet, après deux heures de dérive (T₁), l'huile a incorporé 20% d'eau (Figure 5.7A). Cependant, ce processus est réversible puisque à T₂ (+6 heures), il est de 7 %, pour revenir à 20 % à T₃, soit après douze heures de vieillissement en mer. L'huile de soja est donc un produit qui donne une émulsion de type mésostable.

Le vieillissement de cette huile se traduit également par une augmentation progressive et régulière de sa viscosité (Figure 5.7B). En effet, elle passe de 99 cSt (viscosité initiale) à 109 cSt au bout de 2 heures (+10%), puis à 120 cSt au bout de six heures (+20%), pour atteindre 140 cSt après douze heures de vieillissement en mer, ce qui représente une augmentation totale de 40%, augmentation peu significative tant en terme comportemental qu'en terme d'incidence sur d'éventuelles opérations de traitement. Les mesures de la densité n'ont pas mis en évidence une fluctuation importante de ce paramètre (Figure 5.7C), elle varie entre 0,921 et 0,916.

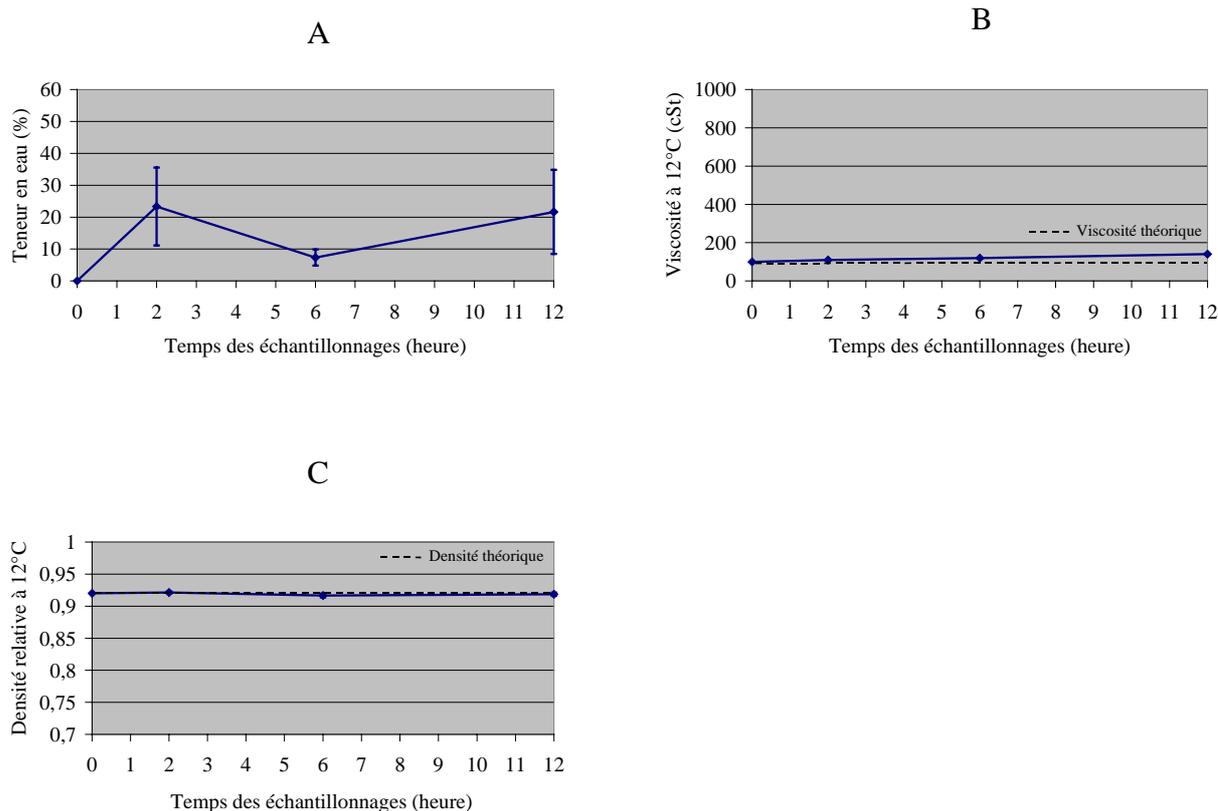


Figure 5.7 : Evolution en surface de l'huile de soja en mer ouverte à T₀, T₁ (2 h), T₂ (6 h) et T₃ (12 h) de la teneur en eau (%), A), la viscosité (cSt, B) et la densité relative (C).

2.3.3. L'acide oléique

La figure 5.8 illustre la capacité de l'acide oléique à s'émulsionner en mer ouverte. La cinétique d'émulsification de l'acide oléique n'est pas linéaire dans le temps : en effet, la teneur en eau est de 1% après deux heures, de 51% après 6 heures pour diminuer à 44% après douze heures de vieillissement en mer (figure 5.8A). L'acide oléique est donc un composé qui peut s'émulsionner de façon significative dans l'environnement marin et qui donne une émulsion de type mésostable.

Concernant l'étude de la viscosité et de la densité, il n'a pas été possible d'analyser les échantillons prélevés à T+6 heures et T+12 heures (quantité de produit trop faible). Cependant, la figure V.8B montre que la viscosité passe de 52 cSt (composé pur) à 58 cSt en deux heures, ce qui représente une hausse de 11%. La figure 5.8.C montre qu'à l'inverse, la densité de ce produit diminue légèrement après deux heures de présence à la surface de la mer (elle passe de 0,891 pour le composé pur à 0,884).

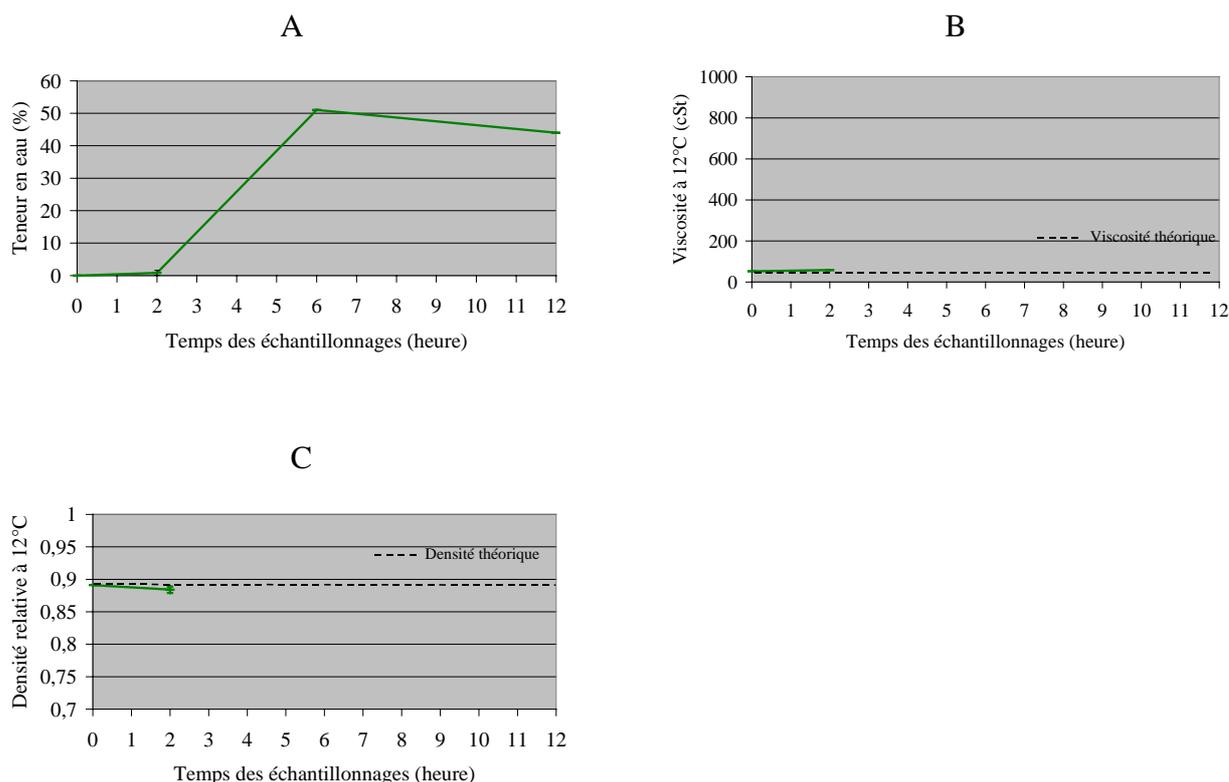


Figure 5.8: Evolution en surface de l'acide oléique en mer ouverte à T₀, T₁ (2 h), T₂ (6 h) et T₃ (12 h) de la teneur en eau (%), A), la viscosité (cSt), B) et la densité relative (C).

2.3.4 Le dioctylphtalate

La figure 5.9 illustre la capacité de la dioctylphtalate à s'émulsionner en mer ouverte. Le comportement du dioctylphtalate au cours de la dérive de la nappe en mer fut particulier. En effet, ce produit s'est tout d'abord émulsifié pour atteindre une teneur en eau de 21% à T₂ (Figure 5.9A) ; puis il a commencé à se solidifier pour prendre l'aspect de boulettes blanchâtres. A T₃, il n'a donc pas été possible de quantifier le processus d'émulsification. La viscosité du produit a augmenté de 136 cSt (viscosité du produit pur) à 837 cSt à T₂ (Figure 5.9B), ce qui représente une augmentation d'un facteur 6 en moins de 6 heures, pour tendre vers l'infini du fait des processus de solidification. A l'inverse, la densité du dioctylphtalate a chuté lors des processus de vieillissement : elle est passée de 0,980 à 0,809 à T₂ (Figure 5.9C), ce qui représente une baisse de 17%, et ceci malgré une incorporation d'eau de mer à hauteur de 21%. Cette évolution est à mettre en parallèle avec la solidification du produit (Figure 5.9D).

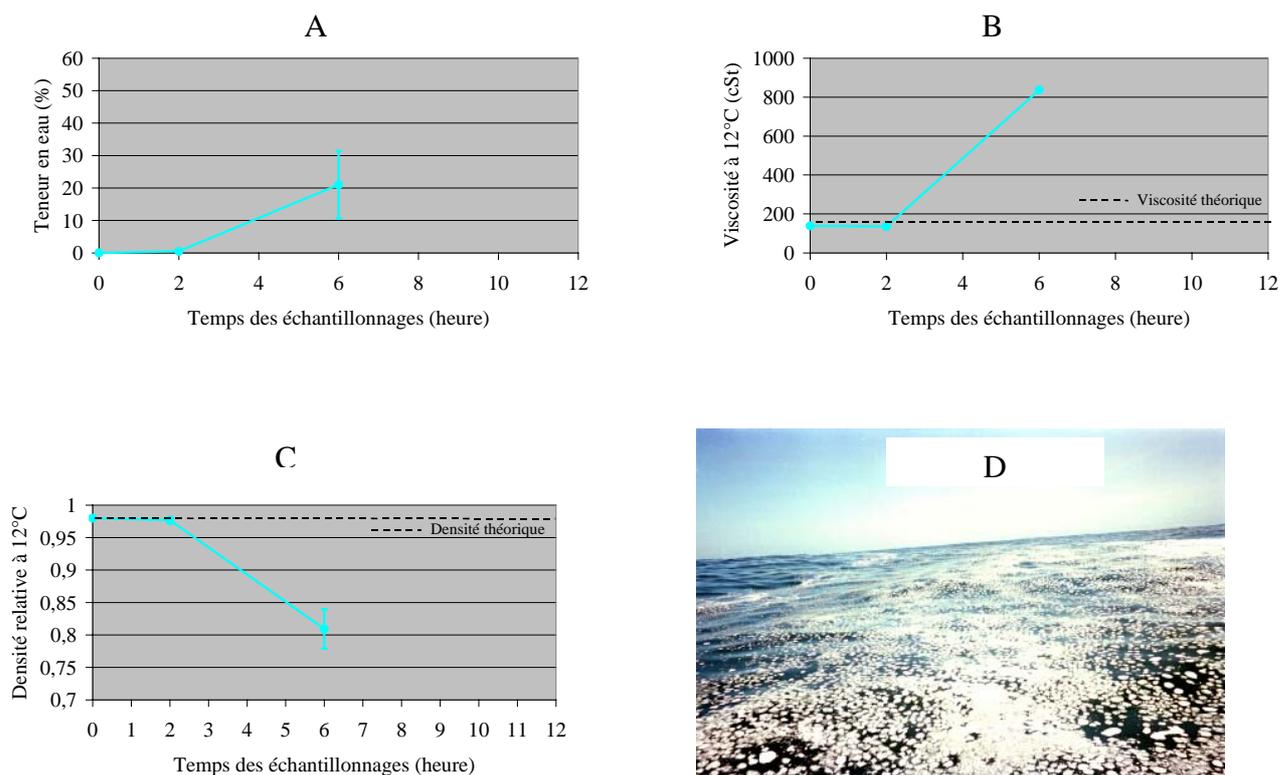


Figure 5.9: Evolution en surface de la dioctylphtalate en mer ouverte à T_0 , T1 (2 h), T2 (6 h) et T3 (12 h) de la teneur en eau (%), la viscosité (cSt) et la densité relative (C) et photographie de la nappe de DOP à T_0+8 h cristallisé (D).

3. Dispersion naturelle dans la colonne d'eau

La dispersion naturelle (dissolution et gouttelettes en suspension) des produits chimiques déversés a été étudiée en analysant en continu la colonne d'eau en spectrométrie de fluorescence aux trois temps d'échantillonnage (T1, T2 et T3). Après une calibration de la réponse obtenue en SF-UV à l'aide d'échantillons extraits et analysés en GC-MS au laboratoire (trois échantillons par temps de prélèvement, soit au total neuf échantillons), il a été possible de suivre quantitativement la cinétique de dispersion naturelle de l'huile de soja au cours de l'expérimentation (c'est-à-dire après 2 h, 7 h et 12 heures de vieillissement en mer).

3.1. L'huile de ricin

L'huile de ricin est détectée à 1 m de profondeur dans la colonne d'eau aux trois temps d'échantillonnage (Figure 5.10). Il y a donc eu des processus de dispersion naturelle significatifs (dissolution et émulsification directe). Ces processus ont entraîné une

augmentation progressive des concentrations qui atteignent en moyenne 40 g.l⁻¹ après douze heures de vieillissement (Figure 5.11). Pour chaque temps d'échantillonnage, les concentrations obtenues ne sont que très peu dispersées (à l'exception de T1) ce qui témoigne d'une diffusion relativement homogène dans la colonne d'eau.

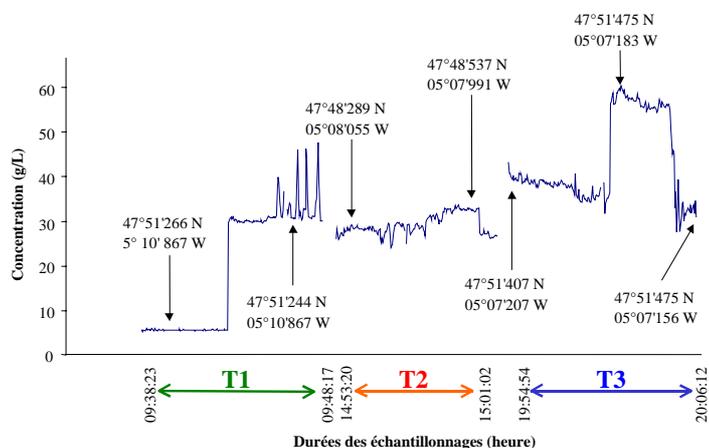


Figure 5.10 : Réponse obtenue en SF-UV pendant les différentes phases d'échantillonnage de la nappe d'huile de ricin à 1m de profondeur.

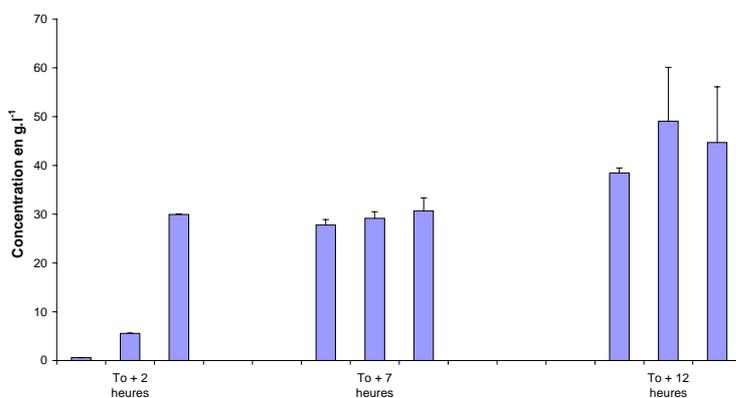


Figure 5.11 : Évolution de la concentration de l'huile de ricin (g.l⁻¹, moyenne ± écart-type) à 1 m de profondeur en dessous de la nappe à T1 (2h), T2 (7h) et T3 (12h).

3.2 L'huile de soja

L'observation d'une réponse en spectrométrie par fluorescence, et ceci à 1 m de profondeur aux trois temps d'échantillonnage, montre que cette huile végétale a tendance à passer en phase aqueuse (Figure 5.12). Cependant, il apparaît qu'à T2 les concentrations mesurées sont inférieures à celles obtenues à T1 ; cette diminution

pourrait s'expliquer par une dispersion non homogène dans la colonne d'eau et aussi par l'incapacité à échantillonner systématiquement à 1 m de profondeur en dessous d'une position fixe de la nappe liée aux conditions météo-océaniques (Figure 5.13).

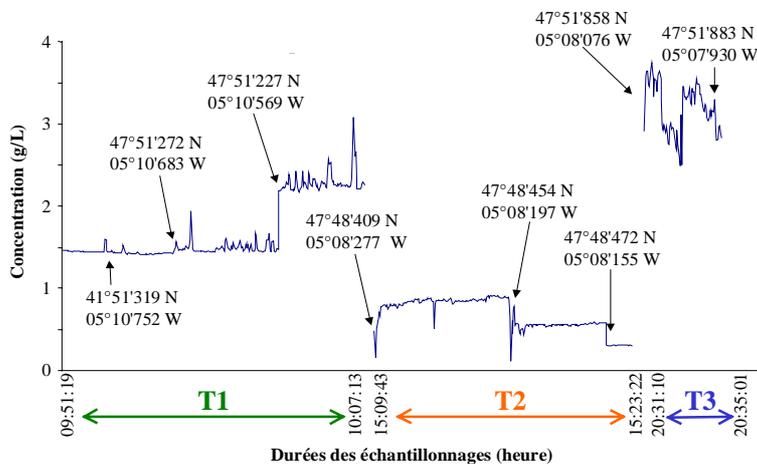


Figure 5.12 : Réponse obtenue en SF-UV pendant les différentes phases d'échantillonnage de la nappe d'huile de soja à 1 m de profondeur.

La figure 5.13 montre une dispersion naturelle de l'huile de soja pour chaque temps d'échantillonnage. Cette dispersion varie entre 0,6 et 3,3 g.l⁻¹ à 1 m de profondeur.

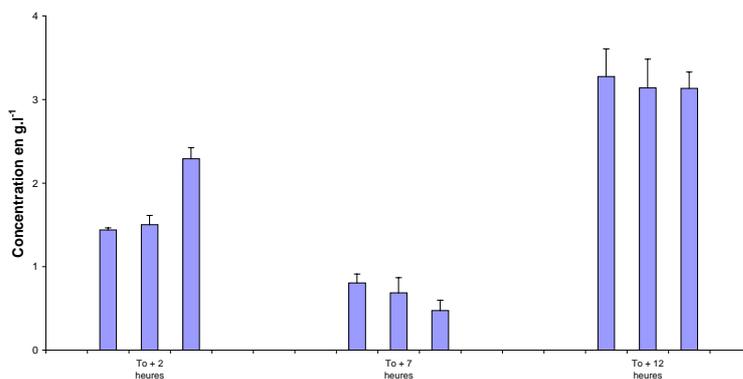


Figure 5.13 : Évolution de la concentration de l'huile de soja (g.l⁻¹, moyenne ± écart-type) à 1 m de profondeur en dessous de la nappe à T1 (2h), T2 (7h) et T3 (12h).

Il apparaît qu'après douze heures de vieillissement en mer, la dispersion de l'huile de soja dans la colonne d'eau reste faible (< à 3 g.l⁻¹) et limitée géographiquement.

Cependant, pour chaque temps d'échantillonnage, il apparaît que cette dispersion est homogène avec des écart-types faibles.

3.3. L'acide oléique

L'acide oléique est détecté à 1 m de profondeur dans la colonne d'eau à T1 et T2 (Figure 5.14). Cependant, les concentrations mesurées sont inférieures à 3 mg.l^{-1} jusqu'à sept heures de vieillissement en mer, ce qui traduit des processus de dispersion naturels faibles (Figure 5.15). L'acide oléique n'a donc que peu tendance à passer dans la colonne d'eau, ce qui est confirmé par l'absence de détection en SF-UV à T3.

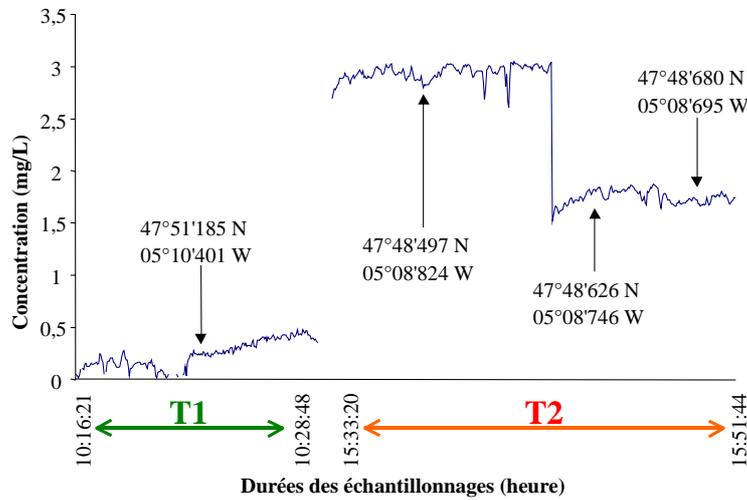


Figure 5.14 : Réponse obtenue en SF-UV pendant les différentes phases d'échantillonnage de la nappe d'acide oléique à 1 m de profondeur.

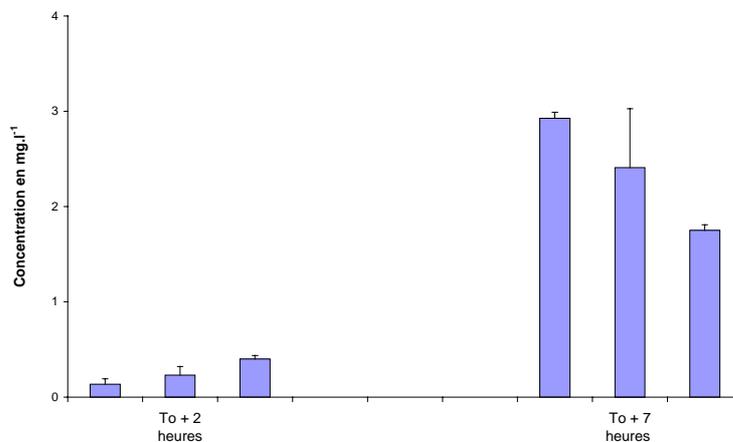


Figure 5.15 : Évolution de la concentration de l'acide oléique (mg.l^{-1} , moyenne \pm écart-type) à 1 m de profondeur en dessous de la nappe à T1 (2h) et T2 (7h).

3.4. Le dioctylphtalate

Le dioctylphtalate est détecté à 1 m de profondeur dans la colonne d'eau à T1, T2 et T3 (Figure 5.16). L'évolution de la concentration est croissante entre T1 et T3, elle reste inférieure à 30 mg.L^{-1} (Figure 5.17). Dans les conditions de cette expérimentation, la dispersion naturelle dans la colonne d'eau n'est pas le principal processus de vieillissement du dioctylphtalate.

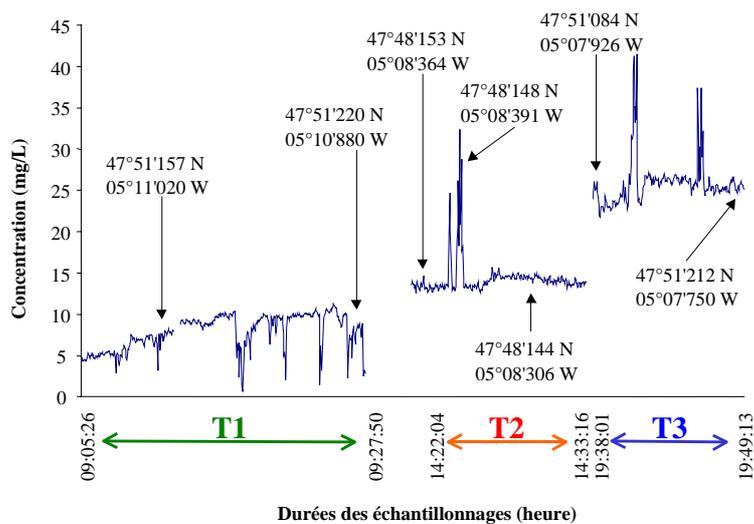


Figure 5.16 : Réponse obtenue en SF-UV pendant les différentes phases d'échantillonnage de la nappe de dioctylphtalate à 1 m de profondeur.

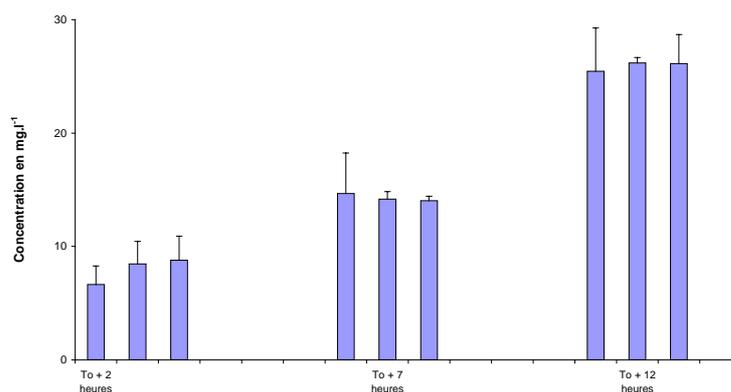


Figure 5.17 : Évolution de la concentration de dioctylphtalate (mg.l^{-1} , moyenne \pm écart-type) à 1 m de profondeur en dessous de la nappe à T1 (2h), T2 (7h) et T3 (12h).

Après T2, la nappe de DOP s'est cristallisée et a formé des boules de tailles variées. Malgré le passage de l'état liquide à l'état solide, la dispersion naturelle a été détectée et quantifiée à 28 mg.L⁻¹ à T3.

3.5. Discussion

Lors de cette étude, tous les produits sélectionnés se sont dispersés naturellement dans la colonne d'eau. Ces résultats expérimentaux montrent des différences avec les données de la littérature (Handbook). La dispersion obtenue en mer ouverte est plus importante que celle donnée dans la littérature pour les produits chimiques qui sont dits « des mélanges ». En effet, pour l'huile de ricin une dispersion naturelle maximale de 40 g.l⁻¹ est atteinte après douze heures de vieillissement alors que la littérature donne < 1 g.l⁻¹. L'huile de soja présente une dispersion maximale plus faible de 3,3 g.l⁻¹ après douze heures de vieillissement alors que la littérature donne < 0,1 g.l⁻¹. Pour la DOP et l'acide oléique, les dispersions maximales obtenues lors de ces essais sont respectivement < 30 mg.l⁻¹ et < 3 mg.l⁻¹ alors que la littérature donne respectivement 3,4 10⁻³ g.l⁻¹ et insoluble.

Lors d'un déversement d'huile de ricin (Fp) en mer, les résultats montrent que lors des douze premières heures qui suivent le déversement, le caractère flottant est conservé malgré une augmentation de la densité (la densité reste inférieure à celle de l'eau de mer). Les essais cellules ont montré que cette huile reste flottante même au-delà de cinq jours en mer. Si l'ensoleillement est important (conditions de l'expérimentation), la viscosité peut fortement diminuer (90% après six heures soit 134 cSt à 12°C). L'émulsification inverse (eau dans huile) ne devient significative que pour une agitation de surface importante ; ainsi les teneurs en eau ne dépassent pas 1% lors de la campagne en mer (vent quasi nul) alors qu'elles atteignaient 30 - 40% lors des essais cellules (vent de 50 km.h⁻¹) après 84 heures en mer. Pour ce produit, la cinétique d'émulsification semble donc être relativement lente (elle devient significative après deux jours en mer) et elle nécessite une agitation de surface relativement importante. La dispersion naturelle (solubilisation + émulsification directe) de ce produit est progressive et atteint 40 g.l⁻¹ après douze heures ce qui représente une concentration importante. Cette concentration est cependant très supérieure à celle donnée dans la littérature (<1 g.l⁻¹).

Le comportement d'une nappe de ricin à la surface de la mer est principalement influencé par l'ensoleillement qui diminue de façon significative la viscosité de cette huile et favorise ainsi les processus de dispersion dans la colonne d'eau (augmentation de la surface de contact eau de mer – huile de ricin). En cas d'accident, les options de l'intervention pourraient consister en des opérations de confinement / récupération qui visent à réduire les quantités de polluant susceptible d'être dispersé (pose de barrage, pompage...) et en un ensemble de mesures visant à protéger les sites sensibles du polluant dispersé dans la colonne d'eau (pose de filtres au niveau des prises d'eau, etc.).

Lors d'un déversement accidentel d'huile de soja (Fp) en mer, les résultats montrent que lors des douze premières heures qui suivent le déversement, le caractère flottant est conservé (la densité reste inférieure à celle de l'eau de mer). La viscosité augmente progressivement jusqu'à 40% après douze heures de vieillissement, soit 140 cSt à 12°C. Les émulsions formées peuvent contenir jusqu'à 20% d'eau, information à prendre en compte lors de la définition de la logistique pour le traitement des déchets. La dispersion naturelle (solubilisation + émulsification directe) de ce produit reste faible, toujours inférieure à 3 g.l⁻¹. Cette concentration est cependant très supérieure à celle donnée dans la littérature (<0,1 g.l⁻¹).

Le comportement d'une nappe d'huile de soja en mer est essentiellement influencé par les processus d'émulsification, eux-mêmes directement dépendants des conditions hydrodynamiques sur zone (houle, vagues). Ainsi, ce type de déversement donnera une nappe flottante persistante qui, tout en dérivant sous l'influence des courants et du vent, aura tendance, sur du court terme, à s'émulsionner. Cependant, même si le transfert de la pollution de la surface vers la colonne d'eau est plus faible que pour l'huile de ricin, il devra être pris en compte lors de la définition des options de l'intervention. En cas d'accident, les options de l'intervention pourraient consister en des opérations de confinement / récupération qui visent à réduire les quantités de polluant susceptibles d'être dispersées (pose de barrage, pompage...) et en un ensemble de mesures visant à protéger les sites sensibles du polluant dispersé dans la colonne d'eau (pose de filtres au niveau des prises d'eau, etc.).

Lors d'un déversement accidentel d'acide oléique (Fp) en mer, les résultats montrent que lors des douze premières heures qui suivent le déversement, le caractère flottant est conservé, voire légèrement accentué du fait d'une faible diminution de la densité. La viscosité n'évolue pratiquement pas au cours du temps tout en restant légèrement supérieure à celle du produit pur. Ce résultat est en accord avec ceux obtenus lors des

essais préliminaires en cellules flottantes. L'émulsification inverse (eau dans huile) devient rapidement significative pour atteindre des teneurs en eau de l'ordre de 50% mais, selon les conditions hydrodynamiques sur zone, ce pourcentage peut diminuer (émulsion mésostable). La dispersion naturelle (solubilisation + émulsification directe) est faible ($< 3 \text{ mg.l}^{-1}$). Cette concentration est cependant très supérieure à celle donnée dans la littérature (insoluble).

Le comportement d'une nappe d'acide oléique à la surface de la mer est principalement influencé par l'hydrodynamisme marin qui favorisera les processus d'émulsification. Ces processus peuvent aboutir à la formation d'émulsions qui contiennent jusqu'à 50% d'eau, seuil qu'il faudra retenir lors de la définition des moyens de stockage qui pourraient être mis en œuvre au cours d'opérations de récupération en mer du polluant. Cependant, lors des essais cellules, ce produit est passé de l'état liquide à l'état solide lors de conditions météo extrêmes (8-9 beaufort). C'est pourquoi, en cas d'accident et selon les conditions météo-océaniques, les options de l'intervention pourraient consister soit en des opérations de confinement / récupération qui visent à réduire les quantités de polluant susceptibles d'être dispersées (pose de barrage, pompage...), soit le chalutage si le produit est déjà sous sa forme solide. Un ensemble de mesures visant à protéger les sites sensibles du polluant dispersé dans la colonne d'eau (pose de filtres au niveau des prises d'eau...) est également nécessaire car contrairement aux données bibliographiques, ce produit se disperse naturellement dans la phase aqueuse.

Lors d'un déversement accidentel de dioctylphtalate (F) en mer, les résultats montrent que lors des douze premières heures qui suivent le déversement, le caractère flottant s'accroît (diminution de la densité : de 17% après six heures en mer). La viscosité augmente brutalement (x six après six heures), cette augmentation étant due à une solidification progressive du produit. Les émulsions formées contiennent jusqu'à 21% d'eau et, lors des essais préliminaires en cellules flottantes, des teneurs en eau de 62% avaient été obtenues, ce qui est conséquent. Cette information est à prendre en compte lors de la définition de la logistique pour le traitement des déchets. La dispersion naturelle (solubilisation + émulsification directe) de ce produit reste faible (30 mg.l^{-1}). Cette concentration est cependant supérieure à celle donnée dans la littérature ($< 3,4 \cdot 10^{-3} \text{ g.l}^{-1}$).

Le comportement d'une nappe de dioctylphtalate en mer est essentiellement déterminé par deux processus de surface qui sont l'émulsification et la solidification. A la vue des résultats des essais cellules et de la campagne en mer, on peut souligner qu'en présence

d'une agitation de surface suffisante, c'est le processus d'émulsification qui est favorisé alors qu'avec une agitation faible c'est le processus de solidification qui prend place. C'est pourquoi, en cas d'accident et selon les conditions météo-océaniques, les options de l'intervention pourraient consister soit en des opérations de confinement / récupération qui visent à réduire les quantités de polluant susceptibles d'être dispersées (pose de barrage, pompage...) soit le chalutage si le produit est déjà sous sa forme solide.

Lors d'un déversement accidentel de styrène (FE) en mer, les résultats montrent que le temps de présence en surface est relatif à la quantité déversée. La concentration dans l'atmosphère peut atteindre 80 ppm. Le caractère flottant et évaporant est conservé. Les analyses montrent une légère émulsification qui atteint une teneur en eau de 2,06%. La dispersion naturelle (solubilisation + émulsification directe) de ce produit reste faible et ne dépasse pas $2,5 \text{ mg.l}^{-1}$ en cellule flottante. Cette concentration est inférieure à celle donnée dans la littérature (300 mg.l^{-1}). Malgré une dispersion naturelle relativement faible, les expérimentations sur le biologique montrent que le styrène a un effet significatif sur l'altération de la stabilité membranaire lysosomale même si le comportement d'une nappe de styrène en mer est essentiellement déterminé par le processus d'évaporation. En cas de déversement accidentel, il apparaît donc comme étant primordial de protéger les intervenants, et s'il y a lieu la population civile présente à proximité du lieu de l'accident, contre un nuage toxique.

Lors d'un déversement accidentel de benzène (E) en mer, les résultats montrent que le temps de présence en surface est relatif à la quantité déversée. Le caractère évaporant est conservé tout en étant flottant. La concentration dans l'atmosphère peut atteindre 650 ppm. La dispersion naturelle (solubilisation + émulsification directe) de ce produit reste faible et ne dépasse pas $1,8 \text{ mg.l}^{-1}$ en cellule flottante. Cette concentration est très inférieure à celle donnée dans la littérature ($1,8 \text{ g.l}^{-1}$). Le comportement d'une nappe de benzène en mer est essentiellement déterminé par le processus d'évaporation. En cas de déversement accidentel, il apparaît donc comme étant primordial de protéger les intervenants et, s'il y a lieu, la population civile présente à proximité du lieu de l'accident, contre un nuage toxique.

**CHAPITRE 6 : IDENTIFICATION D’UN STRESS LIE A
UNE POLLUTION ACCIDENTELLE A
L’AIDE DU BIOMARQUEUR NRRT**

Introduction

Ce chapitre traite de l’intérêt d’utiliser la technique du NRRT (temps de rétention du rouge neutre) afin de mettre en évidence un stress subit par une population de moules suite à leur exposition à une pollution de nature chimique. En effet, il y a un manque de connaissance de l’impact des produits chimiques sur les organismes marins. C’est pourquoi cette expérimentation est réalisée afin d’apporter quelques éléments dans ce domaine. Cette étude est mis en place au laboratoire RF / Akvamiljø à Stavanger en Norvège. Elle est incluse dans une étude globale sur trois groupes d’organismes : poissons, crabes, moules. Cette étude concerne les réponses de biomarqueurs à une exposition au styrène (concentration nominale = 2 mg.L⁻¹). Seule l’exposition des moules au styrène est étudiée dans le cadre de cette thèse.

Dans cette expérimentation, le styrène est administré de façon continue dans l’eau de mer afin de simuler l’exposition. Les différents organismes testés ont été placés dans des bacs de contamination et de contrôle. Après 7 jours d’exposition, les résultats ont mis en évidence un dommage de l’ADN par le test du Comet assay sur les poissons (*Symphodus mellops*) et sur les moules (*Mytilus edulis*). De plus, le test du temps de rétention du rouge neutre (NRRT) à mis en évidence un impact du styrène sur la stabilité membranaire des lysosomes des moules. Des réponses biologiques significatives ont été observés sur cette période d’étude pour les deux organismes concernés. En conséquences, ces résultats montrent une utilisation possible de tests biomarqueurs afin d’évaluer l’état de santé de certains organismes marins en cas de déversement majeur de produits chimiques dans le milieu marin.

Ce travail a fait l’objet d’une publication dans la revue « Aquatic Toxicology » et seul l’article est ici présenté.



Aquatic Toxicology 75 (2005) 191–201

**AQUATIC
TOXICOLOGY**

www.elsevier.com/locate/aquatox

The neutral red lysosomal retention assay and Comet assay on haemolymph cells from mussels (*Mytilus edulis*) and fish (*Symphodus melops*) exposed to styrene

Emina Mamaca^a, Renee K. Bechmann^b, Sigfryd Torgrimsen^b, Endre Aas^b,
Anne Bjørnstad^b, Thierry Baussant^b, Stéphane Le Floch^{a,*}

^a Centre of Documentation, Research and Experimentation on Accidental Water Pollution,

715 rue Alain Colas, CS 41836, 29218 Brest Cedex 2, France

^b RF-Akvamiljø, Mekjarvik 12, N-4070 Randaberg, Norway

Received 10 February 2005; received in revised form 1 August 2005; accepted 5 August 2005

Abstract

Despite the extensive transport of chemicals at sea, there is current lack of knowledge of the fate and effects of many of them on the marine biota. The current regulation that follows the GESAMP–MARPOL classification is mainly based on ecotoxicity assessment from fresh water based studies. Repetitive spills in marine coastal environment from tanker ship loaded with several thousand tonnes of chemicals raised concern about whether the existing freshwater data location can be used to predict the behaviour and the environmental effects of contaminants in marine surroundings. There is a general lack of information of the fate of chemicals at sea. A deviating pattern in marine environment from that in freshwater may have significant consequences for the counteracting actions taken to fight the spill, on staff working on the site of spill as well as on marine life present in the vicinity of the accident. In the present article, an environmental effect study of styrene was conducted as part of the ECOPEL program. We report some biological effects of styrene in laboratory-exposed marine organisms. Styrene was continuously supplied at a nominal concentration of 2 mg L⁻¹ over 7 days to both mussels (*Mytilus edulis*) and fish (*Symphodus mellops*). At the end of this period, DNA damage was assessed by the Comet assay performed on blood (fish) and haemolymph (mussel) cells. In mussels, the lysosomal membrane stability was additionally assessed by the neutral red retention time assay (NRRT). Significant biological responses were observed over the studied period in both organisms with these two tests. Hence, the results favour the use of a biomarker-based approach to assess the health conditions in case of spill.

© 2005 Elsevier B.V. All rights reserved.

Keywords: Styrene; Marine biota; Lysosomal retention time; Comet assay

1. Introduction

Large volumes of chemicals are produced each year. Shipment of these chemicals by boats and barge transit-

* Corresponding author. Tel.: +33 2 98 33 10 10;

fax: +33 2 98 44 91 38.

E-mail address: stephane.le.floch@cedre.fr (S.L. Floch).

ing along coastal marine route are numerous. A single tank on board of a bulk chemical tanker may hold up to as much as 3000 tonnes while the ship itself may contain well over 40,000 tonnes of chemical. This traffic causes a potential constant threat to human populations and the marine life. Recent examples of chemical spills have made authorities launch programs in order to prevent and fight pollution events as well as predict environmental effects at sea, which are still mainly based on freshwater ecotoxicity data. As an example, on 19 April 2001 the French Ministry of Research has created the RITMER (network for research and technological innovations on accidental marine pollution events and their ecological consequences, Brest, France). Within one of these programs, the RITMER funded the ECOPEL project which was started under the supervision of *Cedre* to better characterise the behaviour of some selected chemicals both in the laboratory and in pilot sea study. The two sub-goals were: (i) better define the physico-chemical properties in sea conditions of the selected substances and (ii) investigate some of them for their effects on the marine environment. The selection of compounds was made based on a literature study to find out the reported toxicity and on other considerations like the volumes that are shipped yearly. Among one of them, styrene has been selected because it is an aromatic compound present in the composition of a wide range of industrial products like plastics and resins; and because this compound was identified as a priority for research to improve the response and countermeasures technology for spills (Fingas et al., 2001). Recently, the accident of the chemical tanker *Ievoli Sun* which sank in the English Channel in 2000 releasing approximately 1000 tonnes of styrene in water (Law et al., 2003) has raised concern about the fate of this compound at sea. In aquatic environment, styrene is often reported to be of low risk for chronic effects due to its volatility and low bioaccumulation potential. Hence, the potential for styrene to produce long-term adverse environmental impacts appears to be negligible. However, most of these statements are based on tests performed in fresh water environment whilst very few data exist concerning the marine environment. Also, the value of some of these tests can on some occasion be questionable as they are relying on static mode of exposure and measurements of the actual exposure concentration are not performed during the tests. Hence, although styrene's

volatility and biodegradability would in most cases significantly reduce the levels in water, the behaviour and bioavailability of styrene in saline water is not very well known. Thereby, a better evaluation of the real toxic effects of this compound in marine aquatic organisms is needed. In the recent example of the *Ievoli Sun* vessel, relatively large amount of styrene was discharged in a relatively short time. Yet, studies showed that only low levels of styrene contamination was measured in edible tissues of crabs caught in the immediate vicinity of the wreck site (Law et al., 2003). Bioaccumulation does not necessarily represent the real uptake of a contaminant as many aquatic organisms including fish and crustaceans have the possibility to efficiently biotransform the mother compounds into more polar metabolites, thereby considerably reducing the bioaccumulation factor of mother compound. Even at low concentration, it is known that some substances can disturb important biochemical pathways which can impair biochemical functioning of cells and lead to deleterious effects in tissue, like cancer development, on a longer term. The GESAMP (group of experts on the scientific aspects of marine pollution) that carries out hazard evaluations of chemicals carried in bulk by ships has actually classified styrene as a MARPOL B because of its low potential for bioaccumulation but the recognition that it can potentially have severe toxic effects like carcinogenicity. Yet, this classification is mainly based on occupational exposure by workers. Generally, in mammals, there is been a large panel of investigations with styrene mainly because products of styrene metabolism, like styrene oxide, are recognized to have potential carcinogenic and mutagenic properties (Alexander, 1997; Vaghef and Hellman, 1998; Moller et al., 2000; Laffon et al., 2002). To our knowledge, these effects have not been reported in vertebrates and invertebrates in the aquatic environment.

In the frame of ECOPEL, we performed an environmental effect study using marine organisms exposed in a flow-through system to relatively low level of styrene. A nominal concentration of 2 mg L^{-1} was chosen based on acute toxicity levels found which fish indicate a LC_{50} of 10 mg L^{-1} and a NOEC of 4 mg L^{-1} at 96 h in a closed system with continuous flow (Cushman et al., 1997), and also on preliminary exposure studies performed at *Cedre*. A biomarker-based approach was used to provide information on the health status using two sentinel marine species. Fish and mussels were

chosen because they have fundamental difference in their physiology and belong to very distinct ecological niches. Fish can swim and may avoid a long-term exposure to pollutant dissolved in the water after a spill. However, some fish species have a more stationary behaviour (territorial fish) and thus may be exposed for longer time. Also, compared to invertebrates, many species of fish can biotransform organic xenobiotic by efficient enzymatic systems after uptake in the body tissues and thereafter excrete the more polar metabolites into the external fluid. By-products of pollutant metabolism may have a deleterious effect on cellular and structural macromolecules. Strand breaks or even covalent binding of radicals to DNA are often reported in literature following exposure to organic pollutants in fish. Mussels are filter-feeding, sessile organisms and thereby can accumulate relatively large concentration of pollutant passing through their gills. Therefore, mussels are often used as sentinel organisms to monitor pollution in the aquatic environment (Goldberg, 1978; Viarengo and Canesi, 1991; Livingstone et al., 2000). Compared to fish, they do not have the same ability to metabolize organic compounds but detoxification processes exist through other complex mechanisms that take place partly in the lysosomal compartment. Hence, the lysosomes play an important role as a natural immunological defence system in these invertebrates (Lowe and Pipe, 1994; Moore and Willows, 1998). However, metabolic pathways similar to fish exist in mussels as well (Akcha et al., 2004).

In a biological effect study, the choice of biomarker is an important criterion. Here, we wanted to test relatively broad responses and changes that could provide information about the general health status at the cellular level to the selected species. Also, we wished to use a biological tissue that required little preparation having in mind the possibility to use the methodology on site for biomonitoring in case of chemical spill. Haemolymph and blood cells can readily be obtained from these organisms without necessarily sacrificing them. Based on these criteria, the biological effects of styrene were tested by the Comet assay as a measure of the general DNA integrity damage and the neutral red retention time of lysosome membranes as a general indicator of physiological stress. These biomarkers have proven to be sensitive and work well in fish and mussels which potentially make them suited for in situ exposure (Krishnakumar et al., 1994; Livingstone et

al., 2000; Wedderburn et al., 2000; Akcha et al., 2003; Lee and Steinert, 2003; Regoli et al., 2004).

Generally, this study was made to evaluate the environmental effect of large chemical spill within a short time after the accident and a biomarker approach was used as to evaluate sensitive biological effect indicators to the marine fauna.

2. Materials and methods

2.1. Organisms

The organisms were collected in a field locality in Byfjord (Stavanger, Norway) in the beginning of June 2000. Approximately 50 mussels (*Mytilus edulis*; size \approx 50–60 mm) were hand collected by a diver and 28 corkwing wrasse (*Symphodus melops*; mean weight: 57 ± 19 g) were caught by means of bottom traps. After their arrival in the laboratory, the animals were placed in a 600 L fish tank with running seawater at 10 ± 0.5 °C directly pumped from the fjord at a depth of ca. 70 m. They were kept in quarantine for a period of 10 days. During this period, mussels were fed regularly with a dense culture of microalgae (*Isochrysis galbana*) and fish were fed frozen shrimps. No mussel mortality was recorded. Three fish with evident skin wounds died during the quarantine period.

2.2. Experimental arrangement

2.2.1. Exposure system

Mussels and fish were divided into two groups placed in two different tanks, a control tank and an exposed tank. Both males and females were used. Each tank had a volume of 600 L and was 60 cm deep. The tanks were placed at the outside of the research centre and they were covered with untight lid to avoid direct sun exposure. This was done to obtain a good ventilation, to avoid cross contamination from the styrene-exposed tank to the control tank and at the same time to prevent the possible effect of photo-degradation. A peristaltic pump (model 205 Watson, Marlow, UK) supplied first styrene to a mixing bottle where seawater was provided at sufficient flow using a second pump (model 505 Watson, Marlow, UK) to give a final concentration of 50 mg L^{-1} . Then the 50 mg L^{-1} solution was delivered to the exposure tank where a final dilution with

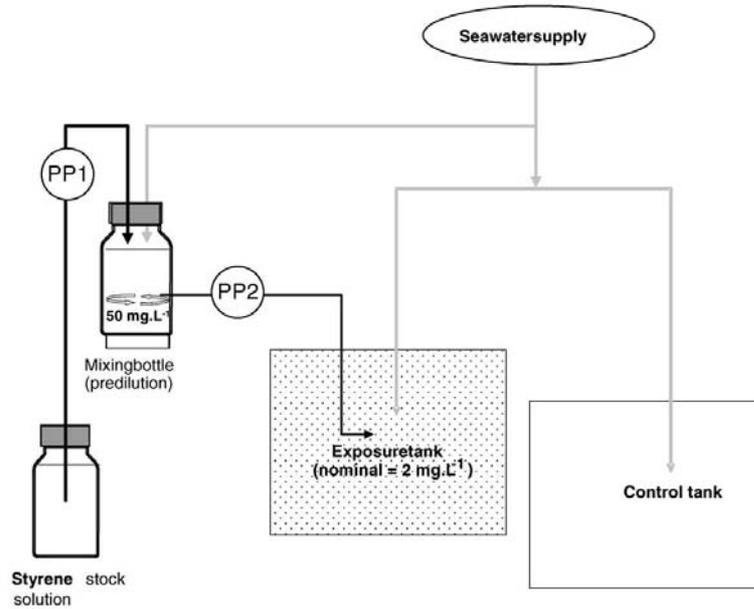


Fig. 1. Conceptual drawing of the experimental setup (PP1: peristaltic pump, 28.6 rpm, model 205 WM; PP2: peristaltic pump, 91 rpm, model 505 WM). Organisms were exposed continuously for a period of 7 days to a styrene nominal concentration of 2 mg L^{-1} .

seawater was achieved to give a nominal concentration of 2 mg L^{-1} (Fig. 1). The total flow at the inlet of the tank was 5 L min^{-1} .

2.2.2. Exposure conditions

Seawater was supplied at 15°C . Mussels and fish were exposed to styrene at a nominal concentration of 2 mg L^{-1} . The organisms were exposed continuously for a period of 7 days with the natural light/dark cycle. No depuration period was allowed. In each tank, about 20 mussels were placed in a basket hanging at about 20 cm under the surface and 10 fish were also transferred. Rocks were placed on the bottom of the tanks as to allow the territorial fish to shelter. During the course of the exposure, mussels and fish were fed the same diet as in the quarantine period i.e., respectively, a dense culture of microalgae and frozen shrimps. At feeding time, mussels were removed from the tanks and temporarily placed for 30–60 min in a 50 L glass

aquarium containing static seawater and 1 L of a dense algae culture (*Isochrysis galbana*).

2.3. Sampling

2.3.1. Seawater

Six water samples of seawater were taken to control styrene in the exposure tank at 10 and 40 cm depth during the exposure period. A volume of 1 L was collected in heated (500°C) Duran glass bottles. Samples were extracted with dichloromethane pestipur. Thirty milliliters of dichloromethane were added to the water samples, stirred for 5 min on a magnetic stirrer and then poured into a separation funnel. The water phase was drained back into the sampling flask and extracted two additional times. The combined organic extracts were dried by filtering through anhydrous sodium sulfate (pesticide grade) and concentrated to 1 ml by means of a Turbo Vap 500 concentrator (Zyman,

Hopkinton, MA, USA). Detection was performed by use of a Perkin-Elmer UV spectrometer (model lambda2S).

2.3.2. Organisms

At the end of the exposure period the organisms were sampled to collect haemolymph and blood, respectively, in mussels and fish. Nine individual replicates were used for each the exposed and the control group. The samples were immediately used to assess the cell lysosome membrane stability performed by the neutral red retention time assay (NRRT) and the loss of cellular DNA integrity using the Comet assay. The same haemolymph sample was used to perform both assays in each mussel. For fish, only the Comet assay was used.

2.4. Sample preparation

2.4.1. Neutral red retention time (NRRT) assay

This assay was performed on haemocytes of mussels only. The test is based on the use of a cationic probe neutral red which is taken up into cells by membrane diffusion where it becomes ion trapped within the lysosomal compartment (Rashid et al., 1991). The procedure used for performing the test on mussels was adapted from Lowe and Pipe (1994) and Lowe et al. (1995). The end point parameter is the time at which dye loss to the cytosol is evident in 50% of the granular haemocytes. Haemolymph (between 0.1 and 0.2 ml) was collected from the posterior adductor muscle using a 1 ml syringe containing an equal volume of physiological saline solution. A volume of 30 μ l of the cell suspension is then transferred onto the centre of microscope slide and left to adhere for 15 min at room temperature in a light proof humidity chamber containing wet paper towels. After that time, the slides were removed individually from the chamber and the excess suspension carefully tipped off on a paper towel. Thereafter, 30 μ l of a working solution (10 μ l into 5 ml physiological saline from a stock solution of 28.8 mg Neutral Red (C.I. 50040 Sigma) in 1 ml of dimethyl sulfoxide) was added to the cell layer. After 15 min incubation, slides were examined systematically using light microscopy (40/100 \times). And following a further 15 min, each preparation was observed at 30 min intervals until a total time of 180 min.

2.4.2. Comet assay

The Comet assay or single cell gel electrophoresis on *M. edulis* haemocytes and blood samples from the fish species corkwing wrasse (*S. melops*) was carried out by a procedure based on the well-established method from Singh et al. (1988). The method was optimized to haemocytes from *M. edulis* following recommendations by Victoria Cheung (Plymouth Environmental Research Centre, Plymouth, UK, pers. comm.) and some minor modifications in RF-Akvamiljø laboratory (Taban et al., 2004) as described below.

2.4.3. Mussel haemocytes

The samples were placed in 1.5 ml centrifuge tubes on ice, the cells were pelleted at 200 \times g for 3 min (4 $^{\circ}$ C), the supernatant was discarded and the pellet resuspended in 170 μ l of 0.6% low-melting point agarose (LMA) in Kenny's salt solution (0.4 M NaCl, 9 mM KCl, 0.7 mM K₂HPO₄, 2 mM NaHCO₃ (KLMA)) at 35 $^{\circ}$ C. The cells suspended in LMA were transferred onto frosted microscope slides which had previously been coated with 170 μ l 0.75% normal-melting point agarose (NMP) in TAE solution (40 mM Tris-acetate, 1 mM EDTA), and allowed to gel on a metal tray in the fridge. After gelling the slides were placed in lysing solution (2.5 M NaCl, 100 mM Na₂EDTA, 10 mM Tris-base, 1% *N*-lauroyl-sarcosine, 1% Triton X-100, 10% DMSO, pH 10 (LS)) in staining troughs, and incubated for 1 h at 4 $^{\circ}$ C, in the dark to lyse the cells. Slides were transferred from LS and rinsed in distilled water three times for 2 min to remove excess salts, then placed in a submarine gel electrophoresis chamber filled with electrophoresis buffer (600 ml 1 N NaOH, 10 ml 200 mM EDTA, 1390 ml Millipore water) and DNA was allowed to unwind under these alkaline conditions for 20 min. After unwinding, electrophoresis was performed at 300 mA, and 20 V for 30 min. The slides were removed from the electrophoresis chamber, and rinsed three times for 5 min with five drops of neutralization buffer (0.4 M Tris). The slides were stained with 30 μ l ethidium bromide (20 μ g/ml), stored in airtight containers in the fridge, and analyzed within 24 h. For visualization of DNA damage, the slides (50 cells per slide) were examined under epifluorescence (400 \times magnification), and scored using an image analysis package (Kinetic Imaging Software, Version 4, Liverpool, UK). The param-

ter used for the scoring was the percentage of DNA in the comet tail (Lee and Steinert, 2003).

2.4.4. Fish blood

A slightly modified procedure was used for fish blood cells. Diluted blood samples were added to 0.7% LMA in EDTA (7.5 mg/ml, pH 7.4) at 35 °C and transferred onto frosted microscope slides which had previously been coated with 150 µl 1% NMP in phosphate buffered saline (PBS). The rest of the procedure was the same as for mussel haemocytes, except that the electrophoresis time was 15 min.

2.5. Statistics

2.5.1. NRRT

The mean and median retention time was calculated for each sample set. Data were examined by non-parametric analysis using a Kruskal–Wallis rank test.

2.5.2. Comet assay

Mean percent DNA (%DNA) in the comet tail was compared between treatments by using a one-way ANOVA and the Dunnett's test at $p = 0.05$ level. Comparison of the mean of exposed group to the mean of control group was made based on the mean of all cells analyzed ($n \approx 450$) in each group and also on the mean of each individual ($n = 9$) within a group to analyse variability between organism replicates. Also, to compare the variability of %DNA in cells of control and exposed individuals, frequency distributions of the %DNA in the comet tail of all the cells were analyzed. First, the %DNA in comet tail of 95% of the control cells was estimated. This number was compared to that found in the exposed cells.

All statistics were run with JMP® software (Version 5.1, SAS Institute, Cary, NC, USA).

3. Results

3.1. Chemical sea water analyses

The analytical measurements of seawater samples in the styrene-exposed tank were relatively stable with time of exposure. The concentration found was on the average $0.2 \pm 0.03 \text{ mg L}^{-1}$. Hence, the measured

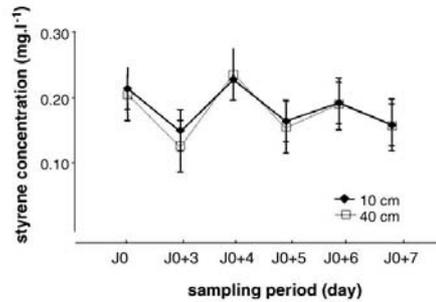


Fig. 2. Measured styrene concentration in the sea water of the exposure tank at 10 and 40 cm under the surface during the course of the exposure period (7 days).

concentration was 10 times less than the nominal one (2 mg L^{-1}) (Fig. 2). Also, the concentration difference between the samples taken at 10 and 40 cm depth was statistically not significant (t -test, $p > 0.05$), showing that the exposure was homogenous along the water column. No styrene was detected in the control tank.

3.2. Biological analyses

3.2.1. Mortality

No mortality of any of the organisms used in the experiment was recorded during the exposure period.

3.2.2. Neutral red retention

The results on the NR retention time measured in haemocytes of mussels are shown in Fig. 3. In the mussels from the control group, there was almost no loss of dye from the lysosome to the cytosol for the

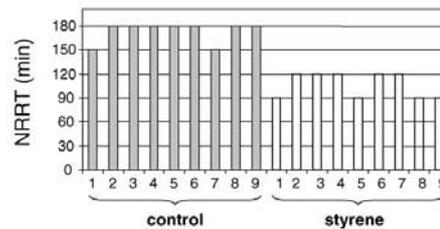


Fig. 3. Neutral red retention time (NRRT) of haemocytes from mussels (*Mytilus edulis*) exposed to styrene at a mean measured concentration of $0.2 \pm 0.03 \text{ mg L}^{-1}$ for 7 days, compared to control mussels.

Table 1
Mean %DNA in comet tail of mussel haemocytes and fish blood exposed to styrene dissolved in sea water (mean measured concentration: $0.2 \pm 0.03 \text{ mg L}^{-1}$) at the end of the exposure period (7 days), and in the control group

	Mean % DNA in comet tail \pm S.D. (n = number of cells or number of animals)	
	Control	Styrene
Mussels (<i>Mytilus edulis</i>)		
Haemocytes ^a	10 \pm 4, n = 451 cells	18 \pm 9, n = 452 cells
Haemocytes ^b	10 \pm 2, n = 9 mussels	18 \pm 2, n = 9 mussels
Corkwing wrasse (<i>Symphodus melops</i>)		
Blood cells ^a	7 \pm 3, n = 452 cells*	11 \pm 6, n = 450*
Blood cells ^b	7 \pm 2, n = 9 fish*	11 \pm 4, n = 9 fish*

The values are the means based on the total number of analyzed cells from each treatment ($n \approx 450$; a), and means for the individual replicate animals collected from each treatment ($n = 9$; b) to perform the assay. Mean comparisons using Dunnett's test were made to analyse differences between exposed and control groups.

^a Based on all cells, i.e. total number of analyzed cells; cells from individual animals (mussels or fish) from the same treatment has been combined.

^b Based on individual mean, i.e. number of animals tested; mean % DNA in the comet tail of cells from each individual animal (mussel or fish).

* Significant statistical significance compared to control (one-way ANOVA with Dunnett's test; $p > 0.05$).

duration of the assay. A destabilization of the lysosomal membrane was evidenced after 90 min in 45% of the individuals from the styrene-exposed group. After 120 min, loss of the neutral red was observed in more than 50% of the haemocyte cells in all exposed individuals. There was a statistically significant difference between control and exposed mussels ($p = 0.0002$; $n = 9$; Kruskal–Wallis rank test).

3.2.3. DNA strand breaks analyzed by Comet assay

Styrene caused a statistically significant (Dunnett's test, $p < 0.05$) increase in %DNA in the comet tail of blood cells from both mussels (1.8 times increase) and fish (1.6 times increase) compared to the corresponding control group. The difference between control and exposed animals was statistically significant both when all analyzed cells from each treatment were used and compared ($n \approx 450$), and when the test was performed on the individual replicate means ($n = 9$) (Table 1).

3.2.4. Inter-individual variations

All mussels exposed to styrene had a higher mean percentage of DNA in the comet tail (range: 15–22%) than any of the control mussels (range: 8–13%). For the wrasse fish, five of the nine individuals had higher means than all the control fish. The means for individuals were in the range 6–19% DNA in comet tail for

exposed fish and 5–9% for control fish, hence there was some overlap between control and exposed (Fig. 4).

3.2.5. Frequency distribution

The distribution plot of DNA damage in cells from styrene-exposed mussels and fish are skewed towards higher percentage of DNA in the tail compared to control cells, i.e. more of the exposed cells, than the control cells had a high percentage of DNA in the tail. The difference between control and styrene-exposed group in the frequency distribution of DNA damage was more pronounced in mussels than in fish. We calculated that 50% of the analyzed haemocytes from styrene-exposed mussels had more than 15% DNA in the comet tail, while only 5% of the cells from control mussels had more than 15% DNA in the comet tail. In fish, 5% of the blood cells from control fish compared to 32% of the cells from styrene-exposed fish had more than 13% DNA in the comet tail (Fig. 5).

4. Discussion

Since styrene is usually reported to have a low bioaccumulation potential and is readily volatilized and biodegraded, this chemical is often considered to be of no concern for chronic toxicity in the aquatic environment. This was also the conclusion drawn from sample

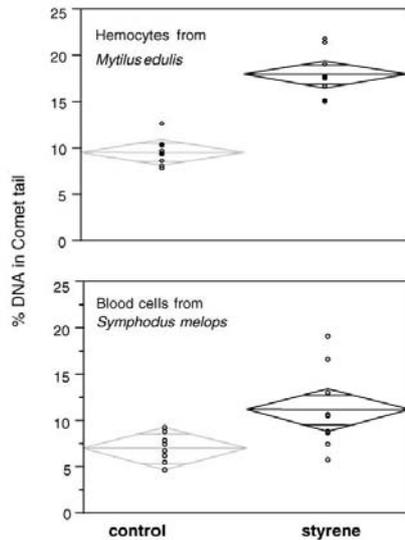


Fig. 4. Percentage of DNA in the comet tail of mussels and fish exposed to styrene compared to control. Each open symbol represents the mean obtained for one individual (based on the 50 cells analysis from each individual animal).

analyses of crab and lobsters caught close to the sinking site of the *Ievoli Sun* 7 days after the accident (Law et al., 2003). In studies by Machado (1995) and Cushman et al. (1997), performed with the freshwater fish, fat-head minnows, NOEC value for styrene was found to be 4 mg L^{-1} . Baer et al. (2002) found a NOEC of 2.6 mg L^{-1} in the same fish species exposed to *para*-methyl styrene. These values are based on experimental setup limiting the loss of styrene by volatilization, continuous flow and including regular measurement of styrene content in the water. Here NOEC represent toxicant-related mortality, physical or behavioural changes and are established in freshwater experimental conditions. These concentrations are much higher than those usually found in the aquatic environment, which rarely exceed $20 \mu\text{g L}^{-1}$ in waste water (Alexander, 1997). In our experimental setup, we found that styrene content was reduced 10 times compared to the nominal concentration probably due to volatilization and biodegradation processes even though it was supplied continuously. The experimental setup was on purpose

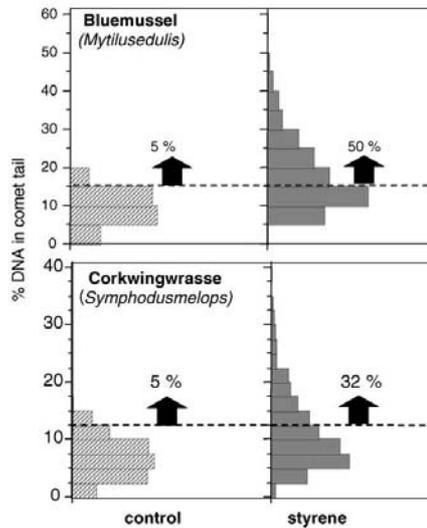


Fig. 5. Frequency distributions showing % DNA in the comet tail of haemocytes from mussels (*M. edulis*) and blood cells from corkwing wrasse (*Symphodus melops*) exposed to styrene in the water (mean measured concentration: $0.2 \pm 0.03 \text{ mg L}^{-1}$) for 7 days, and in the control group. Cells from all replicate animals from each treatment are combined in the frequency distributions. Ninety-five percent of the control cells are scored below the horizontal line. Top panel: mussels. Only 5% of the control cells had more than 15% DNA in the comet tail (=the horizontal line), while 50% of the cells from styrene-exposed mussels had more than 15% DNA in the comet tail. Bottom panel: fish. Only 5% of the control cells had more than 13% DNA in the comet tail (=the horizontal line), while 32% of the cells from styrene-exposed fish had more than 13% DNA in the comet tail.

not closed in order to approach natural weathering of styrene. The 7 days continuous exposure period could represent a case where the content of a chemical tanker is released continuously after the sinking as during the *Ievoli Sun* event. No mortality was found at the 0.2 mg L^{-1} concentration during the exposure period confirming that NOEC (related to mortality) is above the tested concentration in this study. However, the results of the study show that this concentration can significantly alter the stability of lysosomal membranes and lead to DNA damage in haemocyte and blood cells of marine organisms. The lysosomal stability test has been shown to be a good indicator of impaired immunocompetence and cell injury both in laboratory and in

field conditions (Fernley et al., 2000; Wedderburn et al., 2000; Regoli et al., 2004). Also, it appears that no significant seasonality influenced this measure so that it seems to be a suitable parameter to evaluate contaminant exposure in organisms like mussels throughout the entire year (Kagley et al., 2003).

A possible toxic mechanism of styrene may be explained by the formation of radical styrene metabolite with potent oxidative capacity. Good correlation has been reported between impairment of antioxidant capability, the neutral red retention time and changes in DNA integrity in marine organisms (Regoli et al., 2002, 2004; Camus et al., 2002). The free radicals produced during oxidative stress can react with genetic material promoting oxidative DNA strand breaks and lipid damage. Invertebrates, styrene-oxide is produced during *in vivo* degradation pathways as one of the main metabolite of styrene. This metabolite has been reported to induce DNA strand breaks measured with the Comet assay in animals exposed in the laboratory and humans working in styrene-contaminated area (Bastlova et al., 1995; Vaghef and Hellman, 1998; Migliore et al., 2002). Mitchelmore and Chipman (1998) demonstrated the potential of the Comet assay to detect DNA strand breaks in mussels exposed to aquatic contaminants and Akcha et al. (2003) measured DNA strand breaks with this test in dab collected in PAH and PCB polluted sites in the eastern English Channel. Efficient DNA repairing system exists in vertebrates like fish which may help them to recover fast after background levels are reached in the water and hence mitigate the effects of the pollutants.

The occurrence of DNA strand breaks (i.e. % DNA in the comet tail) measured in haemolymph cells of mussel was greater than that in blood of fish, compared to their respective control. This could be explained by difference in uptake and bioaccumulation of styrene between the two organisms. Mussels are filter-feeding organisms and hence a large quantity of water is passing through their gills, thereby exposing the organism to a large flow of pollutant dissolved in the water and eventually bound to particles. In addition, styrene could be more bioaccumulated in the tissue of blue mussels than in the tissue of fish which have a greater ability to excrete/detoxify organic compounds than mussels. Also, the level of inter-individual variation was lower in mussels than in fish. In mussels, all exposed individuals had DNA damage higher than the control indi-

viduals while, in fish, there were four individuals that had DNA strand breaks comparable to those found in control. Nevertheless, even though there was a larger inter-variability between fish exposed to styrene, we found statistically significant differences. In their study, Lemos et al. (2005) used 20 specimens of the freshwater fish *Tilapia rendalli*, a number that proved to be sufficient for their evaluation of the genotoxicity of the water under investigation. They found only three specimens with % DNA in comet tail comparable to control levels. Hence, it appears that a number below 20 animals would have been sufficient to assess genotoxicity. In our study, the use of nine individual with visual observation of 50 cells/individual (the minimum number recommended after Lee and Steinert (2003)) was sufficient to determine DNA impairments in organisms exposed continuously and for 7 days to 0.2 mg L⁻¹ styrene in the water.

The loss of red dye in the cytosol (reduction of NRRT) indicating destabilization of lysosomal membrane was associated with an increase in DNA in the comet tail of haemocyte cells in mussels. These biomarker responses have been related to chronic effects of toxicants on survival and/or reproduction in a daphnid (den Besten and Tuk, 2000). Also, there have been studies that suggest a clear link between DNA damage assessed by the Comet assay and reproduction abnormalities in grass shrimps exposed to different genotoxicants (Lee et al., 2004; Kim and Lee, 2004) and in the mussel *M. edulis* (Lee and Steinert, 2003). A study by Tatarazako et al. (2002) indicated that styrene dimers and trimers have also the potential to affect survival and reproduction of crustaceans in the aquatic environment at concentrations as low as 0.04–1.7 µg L⁻¹.

Both the NRRT and the Comet assay are relatively easy to perform and may be well-suited methods to assess the health status of marine biota in biomonitoring studies related to chemical spill. The NRRT is simple, requires few preparation steps and seems to be a good methodology suitable for on board measurement. The procedure of the Comet assay includes more methodological steps and requires slightly more time. Still, the methodology performs well, is relatively easy to conduct and is sensitive. Hence it appears to be advisable for routine analysis in environmental monitoring (Van Der Oost et al., 2003). Also, it gives sound information at the cellular level and with a larger statistical

power than provided by NRRT. However, for an actual routine application, the two methodologies would benefit of a better harmonisation of the procedures and the way to treat data.

The two methodologies can be performed on the same biological samples and if the sampling is done carefully, the same individual can, in principle, be used several times. This might be relevant in an experiment where individuals are placed in cages to monitor pollutant effluent in the water column close to the location of a wreck. In both cases results can be obtained within a day. Although based on a relative small set of data, the results presented in this investigation are encouraging for the field application of these techniques as warning indicators in biota in case of acute spill. They provide sensitive, yet not specific, biomarker of cell injury and genotoxicity. There is still a large bulk of substances for which little chemical and ecotoxicological data are available. A sound biomarker approach, based first on laboratory exposure similar to the one conducted in this study and validation in the field, could help to evaluate their potential impact. Several methodologies exist and an effective integrated environmental approach targeting different levels of biological organisation ought to be considered. The type of substances, the corresponding methodology to be used and the ecological relevance to higher level effects are key elements to evaluate. This is an ongoing process within the OSPAR commission for the monitoring and assessment of the marine environment of the northeast Atlantic. A similar process could be initiated in the coming GESAMP hazard evaluation procedure for chemical substances carried by ships.

Acknowledgements

The work was funded by the French Research Ministry within the RITMER programme frame and by the intern resources of RF-Rogaland Research, Norway. We thank the manager and staff of RF-Akvamiljo for their hospitality and help during the course of the experimental work.

References

- Akcha, F., Tanguy, A., Leday, G., Pelluhtet, L., Budzinski, H., Chiffoleau, J.F., 2004. Measurement of DNA single-strand breaks in gill and hemolymph cells of mussels, *Mytilus* sp., collected on the French Atlantic Coast. *Mar. Environ. Res.* 58, 753–756.
- Akcha, F., Hubert, F.V., Pfohl-Leschkiewicz, A., 2003. Potential value of the comet assay and DNA adduct measurement in dab (*Limanda limanda*) for assessment of in situ exposure to genotoxic compounds. *Mutat. Res.-Gen. Tox. En.* 534, 21–32.
- Alexander, M., 1997. Environmental fate and effects of styrene. *Crit. Rev. Environ. Sci. Technol.* 27, 383–410.
- Baer, K.N., Boeri, R.L., Ward, T.J., Dixon, D.W., 2002. Aquatic toxicity evaluation of *para*-methyl styrene. *Ecotox. Environ. Saf.* 53, 432–438.
- Bastlova, T., Vodicka, P., Peterkova, K., Hemminki, K., Lambert, B., 1995. Styrene oxide-induced Hprt mutations DNA-adducts and DNA strand breaks in cultured human lymphocytes. *Carcinogenesis* 16, 2357–2362.
- Camus, L., Jones, M.B., Børseth, J.F., Grøsvik, B.E., Regoli, F., Depledge, M.H., 2002. Total oxyradical scavenging capacity and cell membrane stability of haemocytes of the Arctic scallop, *Chlamys islandicus*, following benzo(a)pyrene exposure. *Mar. Environ. Res.* 54, 425–430.
- Cushman, J.R., Rausina, G.A., Cruzan, G., Gilbert, J., Williams, E., Harrass, M.C., Sousa, J.V., Putt, A.E., Garvey, N.A., St-Laurent, J.P., Hoberg, J.R., Machado, M.W., 1997. Ecotoxicity hazard assessment of styrene. *Ecotox. Environ. Saf.* 37, 173–180.
- den Besten, P.J., Tuk, C.W., 2000. Relation between responses in the neutral red retention test and the comet assay and life history parameters of *Daphnia magna*. *Mar. Environ. Res.* 50, 513–516.
- Fernley, P.W., Moore, M.N., Lowe, D.M., Donkin, P., Evans, S., 2000. Impact of the Sea Empress oil spill on lysosomal stability in mussel blood cells. *Mar. Environ. Res.* 50, 451–455.
- Fingas, M., Ketcheson, K., Lau, C., Spicer, M.A., 2001. Development of a chemical spill priority list for environment Canada. In: *The Handbook of Hazardous Materials Spills Technology*. McGraw-Hill (Chapter 44).
- Goldberg, E.D., 1978. Analytical Technique in the Environmental Chemistry. Pergamon Press, pp. 373–386.
- Kagley, A.N., Snider, R.G., Krishnakumar, P.K., Casillas, E., 2003. Assessment of seasonal variability of cytochemical responses to contaminant exposure in the blue mussel *Mytilus edulis* (complex). *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 44, 43–52.
- Kim, G.B., Lee, R.F., 2004. Effects of genotoxic compounds on DNA and development of early and late grass shrimp embryo stages. *Mar. Environ. Res.* 57, 329–338.
- Krishnakumar, P.K., Casillas, E., Varanasi, U., 1994. Effect of environmental contaminants on the health of *Mytilus edulis* from Puget-Sound, Washington, USA. I. Cytochemical measures of lysosomal responses in the digestive cells using automatic image-analysis. *Mar. Ecol.-Prog. Ser.* 106, 249–261.
- Laffon, B., Pasaro, E., Mendez, J., 2002. Evaluation of genotoxic effects in a group of workers exposed to low levels of styrene. *Toxicology* 171, 175–186.
- Law, R.J., Kelly, C., Matthiessen, P., Aldridge, J., 2000. The loss of the chemical tanker Ievoli Sun in the English Channel, October 2000. *Mar. Pollut. Bull.* 46, 254–257.
- Lee, R.F., Steinert, S., 2003. Use of the single cell gel electrophoresis/comet assay for detecting DNA damage in aquatic (marine and freshwater) animals. *Mutat. Res.* 544, 43–64.

- Lec, R.F., Maruya, K.A., Bulski, K., 2004. Exposure of grass shrimp to sediments receiving highway runoff: effects on reproduction and DNA. *Mar. Environ. Res.* 58, 713–717.
- Lemos, N.G., Dias, A.L., Silva-Souza, A.T., Mantovani, M.S., 2005. Evaluation of environmental waters using the comet assay in *Tilapia rendalli*. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 19, 197–201.
- Livingstone, D.R., Chipman, J.K., Lowe, D.M., Minier, C., Mitchelmore, C.L., Moore, M.N., Peters, L.D., Pipe, R.K., 2000. Development of biomarkers to detect the effects of organic pollution on aquatic invertebrates: recent molecular, genotoxic, cellular and immunological studies on the common mussel (*Mytilus edulis* L.) and other mytilids. *Int. J. Environ. Pollut.* 13, 56–91.
- Lowe, D.M., Fossato, V.U., Depledge, M.H., 1995. Contaminant-induced lysosomal membrane damage in blood cells of mussel *Mytilus galloprovincialis* from the Venice Lagoon: an in vitro study. *Mar. Ecol.-Prog. Ser.* 129, 189–196.
- Lowe, D.M., Pipe, R.K., 1994. Contaminant induced lysosomal membrane damage in marine mussel digestive cells—an in vitro study. *Aquat. Toxicol.* 30, 357–365.
- Machado, M.W., 1995. Styrene-acute Toxicity to Fathead Minnow (*Pimephales promelas*) Under Flow-through Conditions. Springborn Laboratories, Wareham, MA, 128 pp.
- Migliore, L., Naccarati, A., Zanello, A., Scarpatò, R., Bramanti, L., Mariani, M., 2002. Assessment of sperm DNA integrity in workers exposed to styrene. *Hum. Reprod.* 17, 2912–2918.
- Mitchelmore, C.L., Chipman, J.K., 1998. DNA strand breakage in aquatic organisms and the potential value of the comet assay in environmental monitoring. *Mutat. Res.-Fund. Mol. Mutag.* 399, 135–147.
- Møller, P., Knudsen, L.E., Loft, S., Wallin, H., 2000. The comet assay as a rapid test in biomonitoring occupational exposure to DNA-damaging agents and effect of confounding factors. *Cancer Epidemiol. Biomar.* 9, 1005–1015.
- Moore, M.N., Willows, R.I., 1998. A model for cellular uptake and intracellular behaviour of particulate-bound micropollutants. *Mar. Environ. Res.* 46, 509–514.
- Rashid, F., Horobin, R.W., Williams, M.A., 1991. Predicting the behaviour and selectivity of fluorescent probes for lysosomes and related structures by means of structure–activity models. *Histochem. J.* 23, 450–459.
- Regoli, F., Frenzilli, G., Bocchetti, R., Annarumma, F., Scarcelli, V., Fattorini, D., Nigro, M., 2004. Time-course variations of oxyradical metabolism, DNA integrity and lysosomal stability in mussels, *Mytilus galloprovincialis*, during a field translocation experiment. *Aquat. Toxicol.* 68, 167–178.
- Regoli, F., Gorbi, S., Frenzilli, G., Nigro, M., Corsi, I., Focardi, S., Winston, G.W., 2002. Oxidative stress in ecotoxicology: from the analysis of individual antioxidants to a more integrated approach. *Mar. Environ. Res.* 54, 419–423.
- Singh, N.P., McCoy, M.T., Tice, R.R., Schneider, E.L., 1988. A simple technique for quantitation of low-levels of DNA damage in individual cells. *Exp. Cell Res.* 175, 184–191.
- Taban, I.C., Bechmann, R.K., Torgrimsen, S., Baussant, T., Sanni, S., 2004. Detection of DNA damage in mussels and sea urchins exposed to crude oil using comet assay. *Mar. Environ. Res.* 58, 701–705.
- Tatarazako, N., Takao, Y., Kishi, K., Onikura, N., Arizono, K., Iguchi, T., 2002. Styrene dimers and trimers affect reproduction of daphnid (*Ceriodaphnia dubia*). *Chemosphere* 48, 597–601.
- Vaghef, H., Hellman, B., 1998. Detection of styrene and styrene oxide-induced DNA damage in various organs of mice using the comet assay. *Pharmacol. Toxicol.* 83, 69–74.
- Van Der Oost, R., Beyer, J., Vermeulen, N.P.E., 2003. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 13, 57–149.
- Viarengo, A., Canesi, L., 1991. Mussels as biological indicators of pollution. *Aquaculture* 94, 225–243.
- Wedderburn, J., McFadzen, I., Sanger, R.C., Beesley, A., Heath, C., Homsby, M., Lowe, D., 2000. The field application of cellular and physiological biomarkers, in the mussel *Mytilus edulis*, in conjunction with early life stage bioassays and adult histopathology. *Mar. Pollut. Bull.* 40, 257–267.

CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES

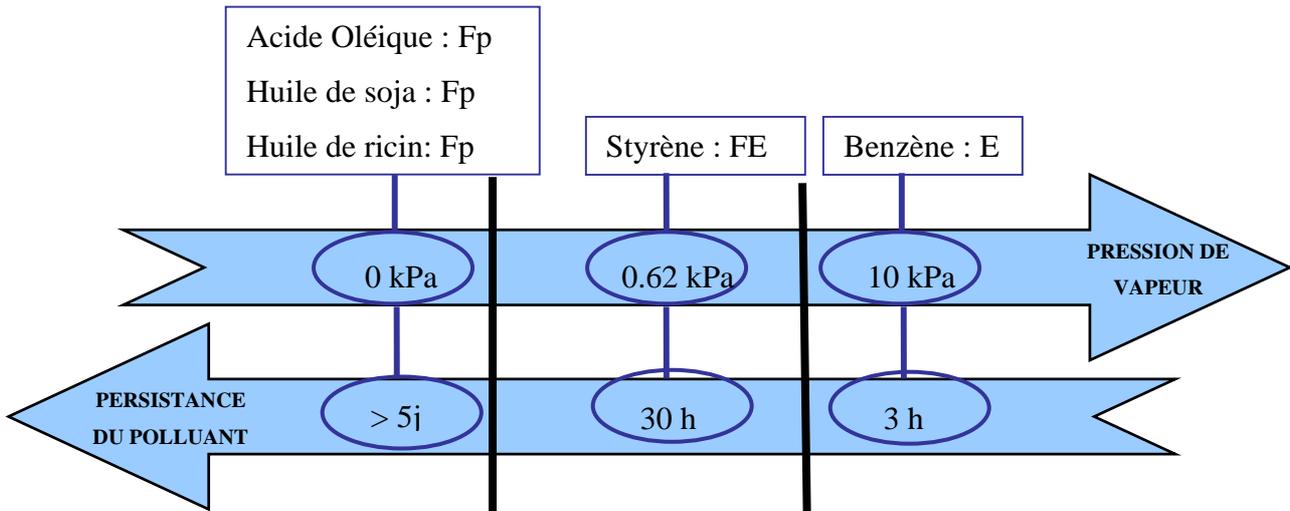
Lors de ce travail, la méthodologie définie au laboratoire pour caractériser la solubilité d'une substance chimique en phase aqueuse a permis de déterminer une fourchette estimative de la quantité de produit chimique susceptible de passer dans la colonne d'eau en cas de déversement accidentel. Cette méthodologie, qui est opérationnelle, permet de caractériser la solubilité d'un produit chimique donné en fonction de la température et de la salinité de la colonne d'eau et ceci, pour différentes conditions d'agitation. Cependant, les résultats, obtenus avec le styrène, le benzène ou l'acide oléique au laboratoire selon des conditions d'essais standardisées, ne décrivent pas parfaitement la réalité *in situ* qui sera observée lors d'un déversement accidentel majeur. En effet, la complexité du milieu naturel et la multiplicité des paramètres environnementaux qui influencent le comportement d'un produit, et notamment leurs cinétiques d'évaporation et d'émulsification ainsi que les processus de photo-oxydation, ne permettent pas de prédire exactement la fraction de produit susceptible de se solubiliser. Suite à l'accident du *Ievoli Sun*, au cours duquel des déversements majeurs de styrène ont été observés, il n'a pas été possible d'en détecter dans la colonne d'eau, ce qui peut aussi mettre en cause la procédure de prélèvement. Au vu des résultats observés dans cette étude et outre la non-représentativité des prélèvements, plusieurs hypothèses ont été émises comme, par exemple, une cinétique d'évaporation supérieure à la cinétique de dispersion naturelle du produit, ou une dispersion naturelle importante du fait de la présence de forts courants aux environs de l'épave entraînant des concentrations à la limite des seuils de détection des appareils analytiques.

Les cellules flottantes ont permis d'étudier sur du court terme le comportement de six produits chimiques (styrène, benzène, huile de soja, huile de ricin, acide oléique et dioctylphtalate) afin de préciser quelles stratégies de lutte pourraient être déployées en cas de déversement d'un de ces produits. D'un point de vue opérationnel, les résultats obtenus permettent de conclure que les produits ayant tendance à s'émulsionner (huile de soja 20% et acide oléique 50%) peuvent être récupérés par pompage après confinement, en tenant compte, premièrement, de l'incorporation d'eau selon les processus d'émulsification afin d'adapter les capacités de stockage aux volumes à récupérer et secondement, en considérant l'évolution des viscosités afin de sélectionner les pompes à utiliser.

L'intervention sur les produits pouvant se solidifier (dioctylphtalate, acide oléique) devra plutôt s'orienter vers des opérations de chalutage après sélection d'un chalut de mailles adaptées (environ 1 cm). Cette technique peut également être retenue pour intervenir sur une nappe d'huile de soja ou d'acide oléique dont le vieillissement en mer est supérieur à 48 heures. Pour les produits n'ayant que peu tendance à s'émulsionner et qui passent dans la colonne d'eau par dispersion naturelle (huile de ricin), l'intervention peut avoir pour finalité de favoriser ce transfert par ajout de dispersants. Cependant, avant d'opter pour ce choix, il est important de s'assurer que le dispersant sélectionné est efficace sur ce type de produit, que le mélange dispersant / polluant ne soit pas toxique et que la hauteur d'eau soit suffisante pour assurer une bonne dilution à l'instar des règles d'utilisation des dispersants sur les hydrocarbures.

Ces résultats sont confirmés par ceux obtenus lors de l'expérimentation en mer ouverte RAPSODI II et les complètent en apportant des informations nouvelles sur le comportement à moyen terme des produits, et notamment en ce qui concerne la nappe d'acide oléique qui, au-delà de 5 jours, se présente sous la forme de boulettes pouvant atteindre 10 cm de diamètre.

Pour le benzène et le styrène, leur temps de présence en surface est essentiellement dépendant des processus d'évaporation : le benzène s'est totalement évaporé en trois heures et le styrène en moins de 48 heures. En cas de déversement accidentel, il apparaît donc comme étant primordial de protéger les intervenants et, s'il y a lieu, la population civile présente à proximité du lieu de l'accident, contre un nuage toxique. Cependant, un suivi de la dispersion naturelle dans la colonne d'eau sera nécessaire même après évaporation complète de ces produits. Ainsi, l'intervention sur un chimiquier en avarie au large devra tenir compte de cette problématique (distance suffisante entre le remorqueur et le chimiquier, choix d'un port refuge éloigné d'un centre urbain...). De plus, si le déversement a lieu à proximité d'une zone de pêche ou d'une ferme aquacole, il faudra prendre des mesures adéquates étant donné que les produits FE et E sont toujours détectés dans la colonne d'eau même après évaporation complète de la surface.



Faisabilité de l'intervention sur nappe :

En mer	OUI	A proximité des côtes	NON
En zone portuaire	OUI	OUI	OUI

Les résultats obtenus lors de cette étude ont clairement souligné la complémentarité entre essais en laboratoire et essais *in-situ* : la réalité de terrain est essentielle à la validation des résultats obtenus au laboratoire. Ainsi, la classification SEBC qui décrit le comportement des produits chimiques en fonction de leurs caractéristiques physico-chimiques est définitivement adaptée pour identifier le ou les compartiments environnementaux qui seront contaminés immédiatement après le déversement d'un produit chimique. Cependant, elle montre ses limites dès qu'il s'agit d'évaluer à moyen et à plus long terme le comportement des produits déversés. En effet, elle ne prend pas en compte l'influence de l'environnement marin au sens large (caractéristiques physico-chimiques de la colonne d'eau : température, salinité..., conditions météo-océaniques sur zone lors du déversement : intensité du vent, agitation de surface...) sur le comportement des produits. De nombreuses données manquent afin de corréler la pression de vapeur et l'intensité du vent, afin de définir une durée au-delà de laquelle plus aucune intervention n'est nécessaire (évaporation totale du produit). De plus, l'aspect solidification des produits n'est pas abordé (solidification suite à des processus de polymérisation ou par formation d'une structure cristalline).

Sur le plan biologique, cette étude a permis de valider l'emploi de tests biomarqueurs en tant qu'indicateur biologique de stress subi par une population d'organismes marins exposés à une pollution accidentelle. D'un point de vue opérationnel, le test de la stabilité membranaire des lysosomes a été sélectionné et installé au *Cedre* à l'issue de ce travail de thèse.

Il est cependant primordial de s'interroger sur l'intérêt d'étudier le comportement de certains produits chimiques, notamment ceux à viscosité élevée, sur une durée plus longue (au minimum quinze jours), pour mettre plus clairement en évidence des phénomènes atypiques comme une solidification par polymérisation, cristallisation ou autre.

De plus, cette prolongation de la durée expérimentale permettra d'étudier l'option « utilisation d'un dispersant » pour intervenir sur des nappes de produits classés flottants persistants (Fp) selon le code SEBC. En effet, la capacité de certains produits chimiques considérés comme non-toxiques (Marpol D) à s'émulsionner mais aussi à se disperser dans la colonne d'eau plaide en faveur d'un traitement aux dispersants dans le cas où des zones sensibles seraient menacées (touristiques, écologiques, aquacoles...). Cependant, si le choix de cette technique semble judicieux, il nécessite de réaliser un programme expérimental afin de vérifier l'efficacité de la dispersion sur ce type de produits et également de rechercher quel type de dispersant doit être préconisé.

	Techniques de lutte				
	Pompage	Dispersion	Chalutage	Suivi atmosphérique	Suivi colonne d'eau
Huile de Soja	X		Au-delà de 72h		
Huile de Ricin	X	X			X
Acide oléique		X	Au-delà de 72h		X
Dioctylphtalate			X		X
Styrène				X	X
Benzène				X	X

Cette thèse a abouti à la définition et à la mise en place au *Cedre*, d'outils expérimentaux pouvant être mis en œuvre dans l'urgence afin d'apporter des informations opérationnelles aux intervenants en charge de la lutte anti-pollution.

Cette étude a complété les données de la littérature et surtout apporté des références nouvelles quant aux comportements de ces produits chimiques déversés dans le milieu marin. Ce travail apporte des résultats expérimentaux qui n'ont pas d'équivalent aujourd'hui dans la littérature scientifique.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

AFNOR, 1957. *Norme NF T 66-107* : Détermination de la densité relative des produits bitumineux.

AFNOR, 1970. *Norme NF T 60-113* : Produits pétroliers: Détermination de la teneur en eau dans les pétroles et dérivés.

AFNOR, 1985a. *Norme NF T 20-045* : Détermination de l'hydrosolubilité des solides et liquides à faible solubilité - Méthode par élution sur colonne.

AFNOR, 1985b. *Norme NF T 20-046* : Détermination de l'hydrosolubilité des solides et liquides à solubilité élevée - Méthode des flacons.

AFNOR, 1990. *Norme NF ISO 5508* : Corps gras d'origine animale et végétale : analyse par chromatographie en phase gazeuse des esters méthyliques d'acides gras.

AFNOR, 2000. *Norme NF ISO 5509* : Corps gras d'origine animale et végétale : Préparation des esters méthyliques d'acide gras.

Aminot A. et Chaussepied M. 1983 : Manuel des analyses chimiques en milieu marin. *Centre National pour l'Exploitation des Océans*.

Anonyme, 1997a. Mystery goo in Monterey Bay oils migrating water fowl, *Oil Spill Intelligence Report*, 20 (42).

Anonyme, 1997b. World spill briefs, *Golob's Oil Pollution Bulletin*, 9 (23).

Arnaud, P. 1994. Cours de chimie organique. ed. Dunod, 522 p.

Bayne B.L., J. Widdows et C. Worrall., 1977. Some temperature relationships in the physiology of two ecologically distinct bivalve populations. In *Physiological responses of marine biota to pollutants*. Academy Press, New York ; F.J. Vernberg, A. Calabrese, F. Thurnberg and W. Vernberg (eds) pp 379-400.

Blandin P. 1998. Bioindicateurs et diagnostic des systèmes écologiques. *Bulletin écologique*, 17 (4) pp 215-307.

Bucheli T.D. et Fent K. 1995. Induction of cytochrome P450 as a biomarker for environmental contamination in aquatic ecosystems. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, vol 25, pp 201- 268.

Boethling R. et Mackay D. 2000. Handbook of property estimation methods for chemicals. *Environmental and health sciences, Lewis Publishers*, pp 131-134.

Bonn Agreement, 1994. European classification system, Bonn Agreement : Counter-Pollution Manual, *Bonn Agreement*, Londres, chap. 25.

BP Amoco 1999. The Drewry Chemical Market Review. *BP Amoco Annual Review*.

Bragg, J. R., Prince, R. C., Harner, E. J. and Atlas, R. M. 1994. Effectiveness of bioremediation for the *Exxon Valdez* oil spill. *Nature*, 368 (6470), pp. 413-418.

Brix R., Hvidt S. et Carlsen L. 2000. Solubility of nonylphenol and nonylphenol ethoxylates. *Chemosphere* 44, pp 759-763.

Bucas, G. and Saliot, A. 2002. Sea transport of animal and vegetable oils and its environmental consequences. *Mar Pollut Bull.* 44 (12), pp 1388-1396.

CEDRE. 2000a. Comportement, Devenir et Impact des substances chimiques déversées accidentellement en mer : Classification des substances chimiques en fonction de leur comportement. *R. Cedre 00.33.C*.

CEDRE. 2000b. Comportement, Devenir et Impact des substances chimiques déversées accidentellement en mer : Études bibliographiques orientées prioritairement sur les produits flottants en vue de préciser les paramètres opérationnels. *R. Cedre 00.27.C*.

CEDRE. 2001b. Localisation des POLREP confirmés pour l'année 2000. Source : Analyse et Exploitation des POLREP reçus au *Cedre* pour l'année 2000, *R.cedre 01.23.C/3351*.

CEPPOL, 2001. Statistique sur le trafic maritime en Manche. CEPPOL, Commission d'études pratiques de lutte antipollution. Marine Nationale.

Crump-Wiesner H.J. et Jennings A.L. 1975. Properties and effects of nonpetroleum oils, In proceeding of the 1975 Conference on Prevention and Control of Oil Pollution, pp 29-32.

Delvigne G.A.L. and Sweeney C.E., 1988. Natural dispersion of oil. *Oil and Chemical Pollution*, Vol 4, Issue 4, pp 281-310.

Depledge M. H. 1994. The rational basis for use of biomarkers as ecotoxicologicals tools, In Fossi M.C. et Lezio C. (Eds), *Non destructive biomarkers in Vertebrates*, Lewi Publ., Boca Raton, Floride, pp 271-295.

Descy J.P. et Coste M. 1988. Utilisation des diatomées benthiques pour l'évaluation de qualité des eaux courantes. *Contrat CEEB7123, FNDUP Namur/ Cemagref Bordeaux*, pp 49.

EPA 1996a. *Guideline OPPTS 830.7840* : Product Properties Test Guidelines – Water solubility : Column Elution Method ; Shake Flask Method.

EPA 1996b. *Guideline OPPTS 830.7860* : Product Properties Test Guidelines – Water solubility (Generator Column Method).

Fay, J.A. 1971. Physical processes in the spread of oil on a water surface. In *Proceedings of the Joint Conference on Prevention and Control of Oil Spills*. American petroleum Institute Washington DC, June 15-17, pp. 463-467.

Fingas M., Ketchon K., Lau C. and Spicer M.A. 2001. Development of a chemical spill priority list for environment Canada. In *The Handbook of Hazardous Materials Spills Technology*. Eds. McGraw-Hill, ISBN 0-07-135171-X, Chapter 44, pp 44.3-44.46.

Fingas, M., Fieldhouse, B., and Mullin, J. 1997. Studies of water-in-oil emulsions: stability studies. In *Proceedings of the 20th Artic and Marine oil Spill Program (AMOP) Technical Seminar*, pp 21-42.

Fingas M., Fieldhouse B., Mullin J., 1996. Studies of water-in-oil emulsions : Stability studies. *In Spill Science and Technology Bulletin*.3 (4) pp 189-190.

Fingas, M., Fieldhouse, B., Gamble, L. and Mullin, J. 1995. Studies of water-in-oil emulsions: stability classes and measurements. In *Proceedings of the 18th Arctic and Marine oil Spill Program (AMOP) Technical Seminar*, pp 21-42.

Fingas, M., Fieldhouse, B., and Mullin, J. 1994. Studies of water-in-oil emulsions and techniques to measure emulsion treating agents. In *Proceedings of the 17th Arctic and Marine oil Spill Program (AMOP) Technical Seminar*, pp 213-244.

Fingas, M., Fieldhouse, B. and Bobra M. 1993. « The physics and chemistry of emulsions ». In *Proceedings of Formation and Breaking of Water in Oil Emulsions*, 14-15 juin 1993, Kananaskis Village, Canada, pp 97-104.

Fraser, J. P. and Wicks, M. 1995. Estimation of maximum stable oil droplet sizes at sea resulting from natural dispersion and from use of a dispersant. In *Proceedings of the 18th Arctic and Marine oil Spill Program (AMOP) Technical Seminar*, pp 313-316.

French, D.P. and Isaji, T. 2004. Evaluation of the consequences of chemical spills using modelling : chemicals used in deepwater and gas operations. *Environmental Modelling & Software*, Vol. 19, pp 629–644.

Gabbott P.A. 1976. Energy metabolism. In B.L. Bayne, ed. *Marine mussels : their ecology and physiology*. Cambridge University Press, New York. pp 298-355.

GESAMP, The Revised GESAMP Hazard Evaluation Procedure for Chemical Substances Carried by Ships, 2002. *Reports & Studies n°64*, Londres.

GESAMP, The Joint Group of Experts on the Scientific Aspects of Marine Environmental Protection 1989. The evaluation of the hazards of harmful substances carried by ships : revision of GESAMP. *Reports & Studies n°35*, Londres.

GESAMP, The Joint Group of Experts on the Scientific Aspects of Marine Environmental Protection, 1982. The evaluation of the hazards of harmful substances carried by ships. *Reports & studies n°17*, Londres.

Görgényia Miklós, J. Dewulfb, H. V. Langenhoveb and K. Héberger, 2006. Aqueous salting-out next term effect of inorganic cations and anions on non-electrolytes. *Chemosphere* 65, 5 , pp 802-810.

Gunstone, F. D. 1984. Reaction of oxygen and unsaturated fatty acids. *Journal of American Oil Chemists' Society*, 61(2), pp 441-447.

Horton, A. A. and Fairhurst, S. 1987. Lipid peroxidation and mechanisms of toxicity. *Critical Reviews in Toxicology*, 18(1), pp 27-79.

Hui, Y. H. 1992. *Encyclopedia of Food Science and Technology*. ed. John Wiley & Sons, pp 818-832.

Hunter R.J. 1993. Introduction to modern colloid science, *ed Oxford University Press*, pp 338.

IMO, International Maritime Organisation 1974. SOLAS, International Convention for the Safety of Life at Sea, Londres.

IMO, International Maritime Organisation 1993. IGC Code, International Code for the Construction and Equipment of Ships Carrying liquid Gaz in Bulk, Londres.

IMO, International Maritime Organisation 1997. MARPOL 73/78, Consolidated edition ; Articles, Protocols, Unified Interpretations of the International Convention for the prevention of Pollution from Ships, Londres pp 235 – 280.

IMO, International Maritime Organisation 1998. IBC Code ; International Code for the Construction and Equipment of Ships Carrying Dangerous Chemicals in Bulk and Index of Dangerous Chemicals Carried in Bulk, Londres.

IMO, International Maritime Organisation 2000. The International Maritime Dangerous Goods Code (IMDG CODE), Londres.

Isemar 1999. Synthèse n°14 : les outils statistiques : réflexions méthodologiques sur les études portuaires. *ISEMAR*, février 1999.

Isobe T., Nishiyama H. et Takada H, 2001. Distribution and behavior of nonylphenol, octylphenol in Tokyo Metropolitan Area: their association with aquatic particles and sedimentary distribution. *Environ. Sci. Technol.*, 35, pp 1041-1049.

Jensen, P.A. and Roy, W.H. 1976. The interrelationship of material toxicity, stream properties and quantity of spilled material in assessing the risk of hazardous material spills. *Texas A&M University Sea Grant College*. Texas, USA, pp 25-26.

Jonsson G., Beyer J., Wells D. et Ariese F., 2003. The application of HPLC and GC-MS to the analysis of selected hydroxy polycyclic hydrocarbons in two certified fish bile reference materials. *J. Environ. Monit.*, 5, pp 513-520.

Karleskind A., 1992. "Manuel des corps gras", eds. *Lavoisier Tec & Doc*, pp 1160.

Kawamura, P.I. and Mackay, D. 1987. The evaporation of volatile liquids. *Journal of Hazardous Materials*, Vol. 15, pp 343-364.

Khalansky M. et Souchon Y. 1994. Quelles variables biologiques pour quels objectifs de gestion? *In État de santé des écosystèmes aquatiques, Les variables biologiques comme indicateurs*, Actes du séminaire national HydrOsystemes, Paris 2-3 nov. 1994, Editions Cemagref 1998, 2^e édition, ISBN 2-85362-490-0, pp 67-72.

Koops, W. 2005. Chemsheet: Model to predict the behaviour and hazards of a chemical spill in the aquatic environment. In *Proceedings of the Workshop on Oil Spill Trajectory*. 6-8 March, Bahrain.

Lafont M. 1998. Contribution à la gestion des eaux continentales: utilisation des oligochètes comme descripteurs de l'état biologique et du degré de pollution des eaux et des sédiments. *Thèse de doctorat d'état*, Université de Lyon I, pp 311.

Lagadic L., Caquet Th., Amiard J.C., 1997. Biomarqueur en Ecotoxicologie : Aspects fondamentaux. *Masson*, Paris, pp 1-9.

Lagadic L., Caquet Th., Amiard J.C., 1998. Utilisation de biomarqueurs pour la surveillance de la qualité de l'environnement. *Lavoisier*, Paris, pp 225.

Law, R.J., Kelly, C., Matthiessen, P. and Aldridge, J. 2003. The loss of the chemical tanker Ievoli Sun in the English Channel, October 2000. *Mar Pollut Bull.* 46 (2), pp 254-257.

Lee, K., Stoffyn-Egli, P., Wood, P. A. and Lunel, T. 1998. Formation and structure of oil-mineral fines aggregates in coastal environments. In *Proceedings of the 21st Arctic and Marine oil Spill Program (AMOP)*, Technical Seminar, pp 911-921.

Lee, K., St-Pierre, S. and Weise, A. M. 1997. Enhanced oil biodegradation with mineral fine interaction. In *Proceedings of the 20th Arctic and Marine oil Spill Program (AMOP)*, Technical Seminar, pp 715-722.

Le Floch, S. and Merlin, F. 2005. The Ievoli Sun wreck: toxicity and olfactory threshold of styrene in marine organisms. In *Proceedings of the 8th International Conference on Shellfish Restoration. Brest, France, October 2- 5, 2005.* pp 8.

Le Floch S., Guyomarch J., Merlin F., Stoffyn-Egli P., Dixon J., Lee K. 2002. The influence of salinity on oil-mineral aggregate formation. *Spill Science & Technology Bulletin*, Vol. 8, pp 65-71.

Le Floch, S. 2002. Etude expérimentale de la biorestauration in situ de sédiments marins contaminés par du pétrole brut. In thèse présentée à l'Université de Bretagne Occidentale, pp 219.

Le Goff, G. 2002. Le comportement des polluants flottants en cas de déversement accidentel en eau de mer. In thèse présentée à l'Université Paris 6, pp 222.

Le Goff, G. and Marchand, M. 1998. Observation of a palm kernel oil spillage in the English Channel. In *Proceedings of the 15th Technical Seminar on Chemical Spills*, pp 75-82.

Lewis, A. and Walker, M. 1993. A review of the processes of emulsification and demulsification. In *Proceedings of Formation and Breaking of Water in Oil Emulsions*, Kananaskis Village, Canada, pp 223-238.

Lowe D. M., Pipe R.K., 1994. Contaminant-induced lysosomal membrane damage in marine mussel digestive cells : an in vitro study. *Aquatic Toxicology* 30 pp 357-365.

Lowe D. M., Fossato V.U. et Depledge M.H., 1995. Contaminant-induced lysosomal membrane damage in blood cells of mussels *Mytilus galloprovincialis* from Venice Lagoon : an in vitro study. *Marine Ecology Progress series*, volume 129 pp 189-196.

Lyman W.J., 1996. Handbook of chemical property estimation methods. *American Chemical Society*, McGraw-Hill, pp 2-1, pp 2-14, pp 2-15, pp 2-39 et pp 2-41.

Mackay, D., Paterson, S. and Trudel, K. 1980. A Mathematical model of oil spill behaviour. *Rapport technique*, Department of Chemical and Applied Chemistry.

Mackay, D. and Matsugu, R.S. 1973. Evaporation rate of liquid hydrocarbon spills on land and water. *The Canadian Journal of Chemical Engineering*, Vol. 51, pp 434-439.

Mc Carthy J.F., Halbrook R.S. et Shugart L.R. 1991. Conceptual strategy for design, implementation, and validation of a biomarker-based biomonitoring capability. *Publication n° 3072, ORNL/TM- 11783, Environmental Sciences Division, Oak Ridge National Laboratory, Tennessee, USA.*

Mc Kelvey R., Robertson I., Whitehead P., 1980. Effect of non-petroleum oil spills on wintering birds near Vancouver, *Marine Pollution Bulletin*, 11 (6), pp 169-171.

Mamaca E., Bechmann R., Torgrimsen S., Aas E., Bjornstad A., Baussant T., Le Floch S., 2005. The neutral red lysosomal retention assay and comet assay on haemolymph cells from mussels (*Mytilus edulis*) and fish (*Symphodus melops*) exposed to styrene. *Aquatic toxicology*, 75 pp191-201.

- Marchand M., Kantin R., 1997. Contaminants chimiques en milieux aquatiques, *OCEANIS*, Vol. 23-4, pp 661-665.
- Marchand M., Kantin R., 1996. Contaminants chimiques en milieux aquatiques, *OCEANIS*, Vol. 22-3, chap 8.
- Millero, 2000. The activity coefficients of non-electrolytes in seawater. *Marine chemistry* 70 pp 5-22.
- Mudge, S. M., Saunders, H. and Latchford, J. 1994. Degradation of vegetable oils in the marine environment. In *Countryside Council for Wales Science Report*, 91, pp 7-17.
- Mouthon J. 1993. Un indice biologique lacustre basé sur l'examen des peuplements de mollusques. *Bulletin Français de Pêche et Pisciculture*, vol 331 pp 397- 404.
- Mudge S., Salgado M., East A., 1993. Preliminary investigations into sunflower oil contamination following the wreck of the M.V., *Marine pollution Bulletin*, 11 (26) pp 40-44.
- Mudge S., Goodchild, Wheeler I., 1995. Vegetable oil spills on salt marshes, *Chemistry and Ecology*, Vol. 10, pp 127-135.
- National Research Council, 1985. Oil in the sea: inputs, fates end effects, ed. *National Academy Press*.
- Neveux J., 1976. *Annales de l'Institut Océanographique*, 52 (32) pp 165-174.
- Newell, R.C. 1979. Biology of intertidal animals. *Marine Ecological Surveys Ltd.*, Faversham, U.K. pp 781.
- Newell R.I.E, 1989. Species profiles : life histories and environmental requirements of coastal fishes and invertebrates (North and Mid Atlantic) : Blue Mussel. *U.S. Fish. Wildl. Serv. Biol. Rep* 82 (11.102). U.S. Army Corps of Engineers.

NRC Committee on biological Markers of the national Research Council. 1987. Biological markers in environmental health research. *Environmental Health Perspectives*, vol 74 pp 3-9.

Peakall D.W. 1994. Biomarkers: the way forward in environmental assesment. *Toxicology Ecotoxicology News*, n° 1, pp 55-60.

Periago J.F, Prado C. et Luna A, 1996. Purge-and-trap method for the determination of styrene in urine. *Journal of Chromatography A*, Vol 719, 1, pp 53-58

Poré, J., 1992. « Emulsions, micro-émulsions, émulsions multiples ». In. *Emulsions, micro-émulsions, émulsions multiples. Lavoisier tec & doc*, pp 270.

Ramade F. 1999. Dictionnaire encyclopédique des pollutions, *Ediscience International*, pp 52.

Regoli F. 1992. Lysosomal response as a sensitive stress index in biomonitoring heavy metal pollution. *Marine Ecology Progress Series*, vol 84, pp 63-69.

Reid et al. 1984, The property of gases and liquids. 3^{ème} édition, *McGraw Hill, New-York*.

Richer J. C., 1999. Compendium de terminologie chimique et lexique anglais/français, *Tech&Doc Lavoisier*, pp 395.

Strickland J. H. D. & Parsons T. R., 1972. A practical handbook of sea water analysis. *J. Fish. Res. Bd. Can.* 167, pp 310.

U.S. Coast Guard. 1999. Most Spills Near Gulf ; Most Spillage Inland ; Most Were Acid. *Hazardous Substances Spill report*, 2 (8).

Van Gastel C.A.M. et Van Brummelen T.C. 1996. Incorporation of the biomarker concept in ecology calls for a redefinition of terms. *Ecotoxicology*, vol 5, pp 217-225.

Wells, P.G., R.A. Duce and M.E. Huber, 2001. Caring for the sea - Accomplishments, activities and future of the United Nations GESAMP (Joint Group of Experts on the Scientific Aspects of Marine Environmental Protection). *Ocean and Coastal Management*, 44.

Wells P.G.,T. Höfer, M. Nauke, 1999. Evaluating the hazards of harmful substances carried by ships. The role of GESAMP and its EHS working group. *The Science of the Total Environment*, pp 329-350.

WHO World Health Organization. 1993. Biomarkers and risk assesment: concepts and principles. *Environmental Health Criteria*, vol 155, International Programme on Chemical Safety (IPCS), Geneva.

Widdows J., P. Fieth et C.M. Worall.1979a. Relationship between seston, available food and feeding activity in the common mussel *Mytilus edulis*. *Mar.Biol.* (Berl.) vol 50, pp 195-207.

Widdows, J., B.L. Bayne, D.R. Livingstone, R.I.E. Newell et P. Donkin. 1979b. Physiological and biochemical responses of bivalve molluscs to exposure to air. *Comp. Biochem. Physiol.* Vol 62, pp 301-308.

Williams R.J. 1970. Freezing tolerance in *Mytilus edulis* . *Comp. Biochem. Physiol.* Vol 35, pp 154-161.

Xie et al., 1997. A review of the effect of salts on the solubility of organic compounds in seawater. *Marine Environmental Research*, 44 (4) pp 429-444.

Yalkowsky et al, 2002. Estimation of solubility of organic compounds by using the general solubility equation. *Chemosphere*, 48 (5) pp 487-509.

Yalkowsky et Ni, 2002. Prediction of Setschenow constants. *International journal of pharmaceutics* 254, pp 167-172.

ANNEXES

ANNEXE 1 : Bilan des principaux accidents maritimes mettant en jeu des substances chimiques.

N°	Navire	Date & lieu	Produits en cause	Mesures, moyens	Lieu
1940					
61	Cargo GRANDCAMP	16 avril 1947 Golfe du Mexique	2300 tonnes de nitrate d'ammonium	Explosion accidentelle du navire	Port de Texas City
0	Liberty-ship OCEAN-LIBERTY	23 juillet 1947 Océan Atlantique	3000 tonnes de nitrate d'ammonium	Bombardement volontaire du navire	Port de Brest
1950					
63	Cargo SEISTAN	1957 Golfe Persique	Nitro cellulose	Explosion accidentelle du navire	Port de Bahrain
1970					
7	Cargo POONA	15 juillet 1971 Mer du Nord	36 tonnes de chlorate de sodium	Extinction incendie sur le navire	Port de Gothenburg
6	Citernier AMALIE ESSBERGER	13 janvier 1973 Mer du Nord	400 tonnes de phénol	Récupération après solidification par température très basse de l'air	Port de Gothenburg
8	Cargo VIGGO HINRICHSSEN	29 septembre 1973 Mer Baltique	234 tonnes d'oxyde de chrome et 180 tonnes de dichromate de sodium	Oxydo-réduction avec 11 tonnes de ferrosulphate et remontée de l'épave	1 mile au nord de Oland
5	Cargo CAVTAT	14 juillet 1974 Mer Adriatique	120 tonnes de plomb tétraéthyle et 150 tonnes de plomb tétraméthyle	Récupération de 250 tonnes de produit (opérations sous-marines)	Détroit d'Otranto
1	Gazier YUYO MARU N°10	9 novembre 1974 Océan Pacifique	50 000 tonnes de propane, butane, naphta	Bombardement volontaire du navire	Baie de Tokyo
2	Cargo LINDENBANK	17 août 1975 Océan Pacifique	18 000 tonnes de coprah, huile de palme et huile de noix de coco	Dissolution par eau de mer	Récif Corallien, Atoll Fanning
9	Citernier RENÉ 16	16 janvier 1976 Suède	180 tonnes d'ammoniac	Dispersion du nuage dans l'air	Port de Landskrona
10	Cargo BURGENSTEIN	10 janvier 1977 Mer du Nord	Sodium peroxide, Cyanides	Extinction incendie sur le navire, mise en place d'une zone d'exclusion	Port de Bremerhaven
62	Cargo AEOLIAN SKY	4 novembre 1979 Manche	Arsenic mercuric, nitrate mercurique, naphtol, peroxyde de sodium	-	12 miles au sud- est de Portland Bill
3	Cargo SINDBAD	Décembre 1979 Mer du Nord	51 cylindres de 1 000 kg de chlore	Recherche des cylindres au sonar, récupération de 12 cylindres et destruction des autres sur zone des cylindres	20 miles à l'ouest de Ijmuiden

1980					
53	Porte containers FINNEAGLE	1 ^{er} octobre 1980 Mer du Nord	Trimethyl phosphite	Remorquage du navire	30 milles nautiques à l'ouest de Orkney Islands
11	Porte containers TESTBANK	22 juillet 1980 Louisiane	16 tonnes de PCB et 3 fûts de bromure d'hydrogène	Ventilation du navire et évacuation de 75 personnes dans un village à proximité	Mississippi River Gulf Outlet
12	Cargo STANISLAW DUBOIS	2 avril 1981 Mer du Nord	500 tonnes de carbure de calcium	Pompage du mazout puis navire coulé	île hollandaise de Texel
13	Porte containers DANA OPTIMA	13 janvier 1984 Mer du Nord	80 fûts de 200 litres de DNBP	Récupération de 72 fûts par chalutage	150 milles nautiques à l'est de Esbjerg
14	Cargo MONT LOUIS	25 août 1984 Mer du Nord	30 cylindres de 15 tonnes d'uranium hexafluoride (UF6)	Récupération des cylindres par -15 m	7 milles nautiques des côtes Belges
15	Porte containers RIO NEUQUEN	27 juillet 1984 Golfe du Mexique	Aluminium phosphide	Déversement à la mer	Port de Houston
58	Citernier BRIGITTA MONTANARI	16 novembre 1984 Mer Adriatique	1 324 tonnes de chlorure de vinyle liquéfié monomère	Récupération de 700 tonnes par pompage et abandon de l'épave	3 milles de Tijascica Lighthouse (Italie)
4	Cargo ARIADNE	24 août 1985 Océan Indien	Plomb tétraéthyle, malathion, trichloréthylène, ...	Incendie à bord, récupération d'une partie des fûts (tétra éthyle , sodium pentachlorophénate, et trichloroéthylène n'ont jamais été récupérés)	Port de Mogadicio
59	Car ferry HERALD OF FREE ENTERPRISE	06 mars 1987 Mer du Nord	25 cylindres de diisocyanate de toluène, une douzaine de cylindres de résine ou solvent, 200 sacs d'hydroquinone, des produits chimiques variés en bouteilles	Zone d'exclusion des navires et des avions, barrages absorbants, renflouage de l'épave	Au large du port de Zeebrugge
16	Cargo CASON	5 décembre 1987 Océan Atlantique	Sodium, aniline, orthocrésol, diphénylméthane di-isocyanate	Périmètre de sécurité (5 km), récupération d'une partie de la cargaison, dissolution par eau de mer	Près du Cap Finisterre
54	Cargo BREA	22 janvier 1988 Océan Atlantique	700 fûts de sulfure de sodium et d'acétone	Récupération des fûts	Nord d'Ouessant
17	Chimiquier ANNA BROERE	27 mai 1988 Mer du Nord	200 tonnes d'acrylonitrile, 118 tonnes de dodécylbenzène	Périmètre de sécurité (10 km), récupération de la moitié de l'acrylonitrile, dissolution par eau de mer et évaporation du reste	60 milles nautiques à l'ouest d'Ijmuiden

18	Citernier PERINTIS	13 mars 1989 Manche	5,8 tonnes de lindane, 1 tonne de perméthrine et 600 kg de cyperméthrine en fûts de 50 kg	Récupération de 28 fûts, surveillance	35 milles nautiques au sud-est de Brixham
64	Chimiquier MAASGUSAR	14 mars 1989 Japon	Acrylonitrile	Explosion accidentelle du navire	Japon
19	Chimiquier OOSTZEE	9 septembre 1989 Mer du Nord	975 tonnes d'épichlorhydrine, fûts de zinc et d'étain	Remorquage, déchargement (8100 l se sont évaporés dans l'air pendant l'opération)	Baie allemande
56	Cargo EAL RUBY	21 octobre 1989 Océan Atlantique	150 fûts d'acide et d'ammoniaque	Récupération des fûts sur la plage	Au large d'Ouessant
57	Cargo MURREE	28 octobre 1989 Océan Atlantique	Fûts de cyanure et autres produits	Récupération des fûts	Au nord du Cotentin
20	Cargo JULIE A	4 novembre 1989 Dannemark	300 tonnes d'acide chlorhydrique	Pompage cargaison (perte de 1 à 5 tonnes d'acide dans le port)	Port de Århus

1990

21	Gazier VAL ROSANDRA	28 avril 1990 Mer adriatique	1 800 tonnes de propylène	Brûlage de la cargaison avec explosifs (50 km au large des côtes)	Port de Brindisi
22	Citernier KIMYA	Janvier 1991 Mer du Nord	1 500 tonnes d'huile de tournesol	Dissolution par eau de mer	Littoral d'Anglesey
23	Chimiquier ALESSANDRO PRIMO	1 ^{er} février 1991 Mer Adriatique	550 tonnes d'acrylonitrile, 3 000 tonnes de ethylene dichloride	Zone d'exclusion, surveillance puis pompage de la cargaison	16 milles nautiques au nord-est de Molfetta
24	Ro/ro ferry STORA KORSNÄS LINK I	5 novembre 1991 Côtes anglaises	40 tonnes de chlorate de sodium	Zone d'exclusion d'un milles, incendie	10 milles nautiques à l'est de Teeside
25	Porte containers SANTA CLARA	4 janvier 1992 New Jersey	21 containers dont 4 d'arsenic trioxide (414 fûts de 374 livres) et 400 kg de magnesium phosphide	Chaland + 2 ROV'S utilisés pour récupérer 320 fûts	30 milles nautiques au large des côtes du Cap May
26	Porte containers CANMAR AMBASSADOR	1992	Naphtalène, dichlorobenzidine	-	
60	Porte containers ORIENTAL KNIGHT	18 juillet 1992 Mer Méditerranée	Conteneur de phosphore	Déchargement de la cargaison et reconditionnement	Port de Marseille
27	Vraquier	25 octobre 1992	1 600 tonnes de sulfure de plomb	Récupération	50 km de

	NORDFRAKT	Mer du Nord			Noordwijk aan Zee (Pays-bas)
28	Vraquier ARIEL	1992 Mer du Nord	45 fûts de White-Spirit	Récupération sur la plage	
55	Cargo MARY-H	16 septembre 1993 Océan Atlantique	34 500 détonateurs perdus (23 000 récupérés)	Récupération sur la plage	400 km au large de Belle-Ile
30	Cargo FRANK MICHAEL	10 octobre 1993 Mer Baltique	1 100 tonnes de monoammonium phosphate	Dissolution par eau de mer	Nord de l'île de Gotland
31	Porte containers SHERBRO	8 décembre 1993 Manche	88 conteneurs remplis de sachets de pesticides, nitrocellulose	Récupération sur la plage	Au large du Cotentin
29	Chimiquier GRAPE ONE	9 décembre 1993 Manche	3 017 tonnes de xylène	Dissolution par eau de mer	-
32	Chimiquier N°1 CHUNG MU	9 mars 1995 Mer de Chine	230 tonnes de styrène monomère	Barrages flottants + Dissolution par eau de mer	Chenal d'accès au port de Hanjiang
65	Cargo SABINE D	12 décembre 1995 Canal de Kiel	1 conteneur de 78 fûts de malathion	Traitement de la pollution par absorbants	Près de Rendsburg
33	Gazier IGLOO MOON	6 novembre 1996 Océan Atlantique	Butadiène en soute / Pas de pollution	Pompaggio cargaison, remorquage du navire	Key Biscane (Floride)
34	Vraquier ALBION 2	18 février 1997 Océan Atlantique	114 tonnes de carbure de calcium	Dissolution par eau de mer	60 milles au large de Brest
35	Vraquier SEA EMPRESS	2 août 1997 Mer d'arabie	4 200 tonnes de soufre	-	Port de Mumbai (Inde)
36	Citernier ALLEGRA	1 ^{er} octobre 1997 Manche	700 tonnes d'huile de palmiste	Dissolution dans la colonne d'eau et récupération sur la plage des résidus	30 miles au N-O de Guernesey
37	Porte containers ROSA M	30 novembre 1997 Manche	70 tonnes de matières dangereuses / Pas de pollution	Remorquage	Cherbourg
66	Cargo MATSUKAZE	10 avril 1998 Hong-kong	Huile de colza	-	-
40	Vraquier BAN-ANN	Juin 1998 Mer du Nord	Sachets de Detia-Ex-B (aluminium-phosphide)	Récupération sur la plage	Port / Pays-bas
41	Chimiquier BAHAMAS	24 août 1998 Rio Grande	12 000 tonnes d'acide sulfurique	Dissolution par eau de mer / Pompaggio puis sabordage du navire	Terminal de Trevo
38	Chimiquier PANAM PERLA	10 novembre 1998 Océan Atlantique	Acide sulfurique / Pas de pollution	Pompaggio des cuves, neutralisation par bicarbonate	Wilmington, Caroline du Nord
39	Ferry	17 décembre 1998	1 container de 2100 boîtes d'allumes	Récupération sur la plage d'un mélange	(Allemagne)

	APUS	Mer du Nord	feux	{ sable + allumes feux }	
42	Cargo JUNIOR M	4 octobre 1999 Océan Atlantique	700 tonnes de nitrate d'ammonium	Dissolution par eau de mer	Au large de Brest
43	Porte containers EVER DECENT	24 août 1999 Mer du Nord	Matières dangereuses (2 conteneurs de cyanure)	Remorquage	20 milles au nord-est de Margate
44	Citernier ASCANIA	19 mars 1999 Mer du Nord	Acétate de vinyle	Périmètre de sécurité (5 km), évacuation de 600 habitants, pompage de la cargaison et remorquage du navire	Pentland Firth (Angleterre)

2000

45	Chimiquier STOLT ASPIRATION	22 février 2000 Océan Atlantique	Naphta, isononanol	Confinement, absorbants	
68	Chimiquier MARTINA	28 mars 2000 Mer Baltique	600 tonnes d'acide chlorhydrique (30%)	Relargage contrôlé de l'acide dans le milieu	Öresund, ouest de Kullen (Suède)
46	Chimiquier DALHIA-S	7 mai 2000 Mer Méditerranée	Acide nitrique	Dissolution par eau de mer (+ pompage cargaison)	Au large d'Alexandrie
47	Chimiquier HIKARI II	4 août 2000 Déroit de Singapour	230 tonnes de phénol	Dissolution par eau de mer	
48	Chimiquier IEVOLI SUN	31 octobre 2000 Manche	Styrène, méthyl éthyl cétone, alcool iso propylique	Surveillance, modification route maritime	80 km au nord de l'île de Batz
49	Porte containers AGAMEMNON	1 ^{er} janvier 2001 Golfe de Thaïlande	2 000 tonnes de nitrate d'ammonium	(Pompage cargaison)	Rayong
50	Chimiquier BALU	20 mars 2001 Océan Atlantique	8 000 tonnes d'acide sulfurique	Dissolution par eau de mer	Golfe de Gascogne, à 210 km du port de Ribadeo
51	Chimiquier ENDAH LESTARI	13 juin 2001 Mer de Chine	630 tonnes de phénol	Pompage cargaison	Kampung Pasir Putih
67	Cargo THE DINA	16 décembre 2001 Océan Atlantique	2 430 tonnes de Flurospar (composant de la pâte dentifrice)	-	35 milles à l'ouest des côtes du Pays de Galles.
52	Chimiquier BOW EAGLE	26 août 2002 Océan Atlantique	200 tonnes d'acétate d'éthyle	Dissolution par eau de mer, colmatage de la brèche	Au large de l'île de Sein

ANNEXE 2 : Bilan des principaux biomarqueurs

Biomarqueurs	Bioindicateurs	Composés ou produits concernés	Commentaires
Induction CYP/ EROD	Poissons (limandes, turbot, saumons, divers poissons d'eau douce), moules, crabes, huîtres, crevettes, choquemort	Composés halogénés, PCB, PAH, dioxine, organochlorés	-Indicateur très sensible aux polluants. -Une des premières manifestations de pollution. -Son induction est influencée par d'autres facteurs tel que l'âge, l'espèce...
L'induction de la GST	Poissons (anguilles...), moules	Composés halogénés, PCB, PAH, dioxine, organochlorés	-Efficacité varie avec saisons, stade de développement des organismes, sexe. -Certains polluants (PCDD et PAH) peuvent causer à la fois son induction et son inhibition. -Convenable pour l'exposition aux PCB non-planaires et organochlorés qui n'induisent pas l'activité de CYP 1A
UDPGT	Poissons	PCB, PAH, OCP et PCDD	-Métabolise les substrats endogènes (hormones stéroïdes). -Son induction peut sérieusement altérer le métabolisme des stéroïdes, ayant des effets profonds sur le succès reproductif des organismes. -Sexe, saison, température et pH agissent.
SOD	Poissons, crustacés, coquillages.	Tous les polluants provoquant des radicaux libres (PCB, PAH, OCP, HCH et DDE)	Analyse: électrophorèse et densimétrie de gel polyacrylamide ou spectrophotométrie (moins efficace).
CAT	Poissons, crustacés (crabe, crevette), mollusques (Huître, moule)	PAH, PCB, pesticides	Inhibitions et inductions concomitantes face à certains polluants.

Biomarqueurs	Bioindicateurs	Composés ou produits concernés	Commentaires
GPOX/GRED GSH/GSSG	Poissons,	PCB, PAH, DDE et HCB	GRED en tant que biomarqueur est remise en question car les enzymes ne semblent pas répondre à l'exposition de contaminants dans 82% des études effectuées sur le terrain.
Teneur en GSH	Poissons, moules, crustacés (crabe, crevette)	PCB, PAH, DDE, HCB et les métaux	Réagit différemment selon les métaux.
Les vitamines, flavoprotéines et le bêta-carotène	Poissons	UV, pesticides, PAH, PCB...	La baisse des vitamines indique une augmentation des radicaux libres.
MDA	Bivalves (moules)	PAH, PCB et métaux	Sa diminution sous forme libre indique la peroxydation.
GCS	Moules	Métaux	Activité variable selon les métaux.
Métabolites des PAH	Poissons (Tomcod, limande, flet)	PAH	Varie avec la nutrition.
MTs	Annélides, mollusques, crustacés, échinodermes, poissons et mammifères.	Métaux	Variation selon le sexe, l'âge, la taille, la nutrition, la température...
HSP	Mollusques bivalves (huître, moules, palourdes...) ; poissons (truite, medaka...)	Métaux lourds et xénobiotiques	Action de la température, les UV, la salinité, l'anoxie et la nutrition.

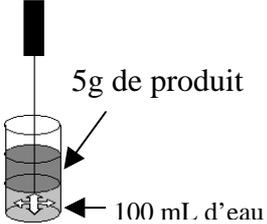
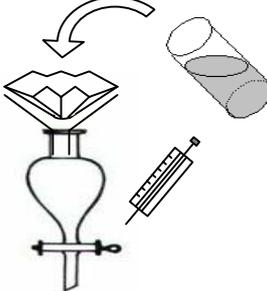
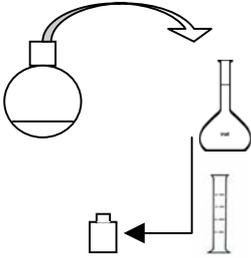
Biomarqueurs	Bioindicateurs	Composés ou produits concernés	Commentaires
MXR	Poissons, bivalves (moules), éponges et vers.	Xénobiotiques (hydrocarbure) et lésions cellulaires	-Première ligne de défense vis à vis des toxiques . -Rôle de protection du système de défense MXR apparaît être fragile. -Inhibition des fonctions des MXR, de façon compétitive, par plusieurs classes de produits chimiques, (chemosensibilisateurs)
Transaminase sérique	Poissons (flet, carpe, poisson-lune...)	PAH, BKME	Inhibition de l'activité ou la synthèse des enzymes, par les produits toxiques entraînant une baisse de leur activité dans le sang.
Hématocrite	Poissons (gardon, carpe)	ECF (Alcali, dioxyde de chlore, peroxyde et oxygène).	-Très controversée. -Plus d'études sont nécessaires.
ALA-D	Poissons	Plomb	-Peu d'informations . -Etudes à approfondir.
Glucoses	Poissons	Diesel, BKPME.	Etudes supplémentaires nécessaires afin de confirmer l'hyperglycémie et son temps d'apparition.
CRP	Poissons	Tous les polluants provoquant une inflammation	Peu d'informations.

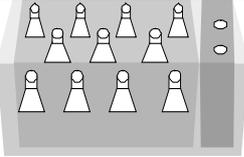
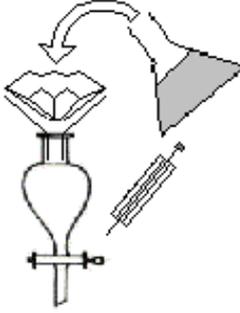
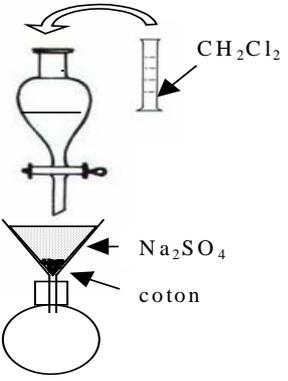
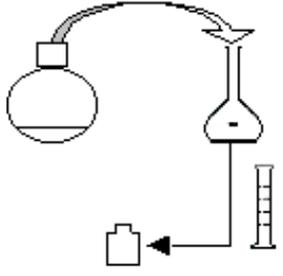
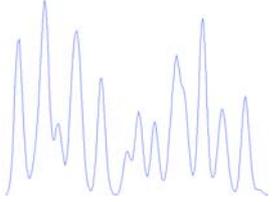
Biomarqueurs	Bioindicateurs	Composés ou produits concernés	Commentaires
VTG	Poissons (chevaine, goujon, truite arc-en-ciel, chabot, medaka...)	PCB, PAH, dioxine, pesticides, produits de détergents et de composés plastiques. (xenoestrogènes)	<p>-ZRP plus sensibles à l'exposition oestrogénique que les VTG.</p> <p>-Sensibilité peut être due aux espèces, à la reconnaissance des épitopes ou aux doses et aux différentes formes d'exposition.</p> <p>-Méthodes utilisées: ELISA ou PCR en temps réel, présentent des avantages uniques et des limites .</p> <ul style="list-style-type: none"> • ELISA: peu coûteuse et dépend de la disponibilité des anticorps et des antisérums pouvant être produits par le biais des espèces. • PCR: relativement facile (à condition que les séquences d'ADNc soient disponibles), elle demande un équipement spécialisé coûteux mais qui a une capacité d'échantillonnage plus grande et plus efficace .
ZRP	Poissons (Saumon d'atlantique, saumon du pacifique, carpe, sole, truite arc-en-ciel...)	PCB, PAH, dioxine, pesticides, produits de détergents et de composés plastiques. (xenoestrogènes)	Plus sensibles que VTG.
Imposex	Mollusques	TBT	Indice tardif de pollution car une fois visible il est trop tard pour la population car c'est un phénomène irréversible.

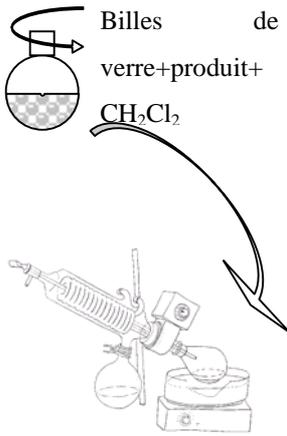
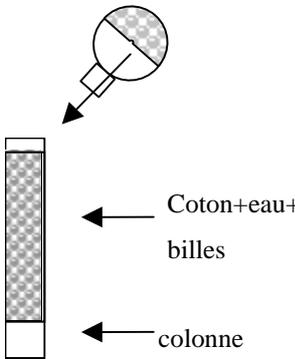
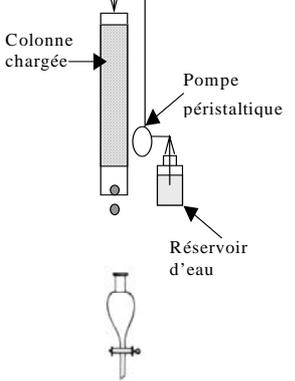
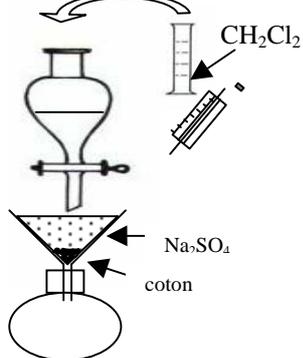
Biomarqueurs	Bioindicateurs	Composés ou produits concernés	Commentaires
Ovocytes	Poissons (truite, poisson zèbre, épinoche, chevaine...)	PCB, PAH, dioxine, pesticides, produits de détergents et de composés plastiques. (xenoestrogènes)	-Facile à repérer dans les gonades mâles (grande différence de taille entre les cellules sexuelles femelles et mâles). -Méthodes de prélèvement et d'observation assez simples mais la préparation des lames demande du matériel complexe.
Testostérone et inhibition de la croissance testiculaire	Poissons	Produits dérivés de la pâte à papier, les dérivés du bois. (xenoestrogènes)	Peu d'informations.
Cortisol	Poissons	PAH, métaux lourds, BKPME, manipulation...	L'affaiblissement de la capacité à amplifier le cortisol dans le sang, peut constituer un biomarqueur de stress toxique, dans l'évaluation de la santé des poissons sauvages habitant dans des endroits pollués
AchE	Poissons, moules, huîtres, crustacés...	Pesticides (organophosphates et carbamates)	Mesure selon la méthode décrite par Bocquenet et al.
Test Comète (Cassures de l'ADN)	Cellules des poissons, des moules, crabes, crevettes...	Tous les polluants génotoxiques (PCB, PAH...)	-Rapide. -Sensible. -Facile et peu coûteux.
Comportement	Tout organisme (poissons, crustacés, mollusques...)	Stress	-Pas très précis dans tous les cas. -Peut juste indiquer un stress éventuel de l'organisme ou être typique d'un polluant et d'une espèce.

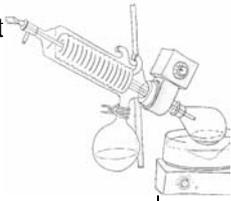
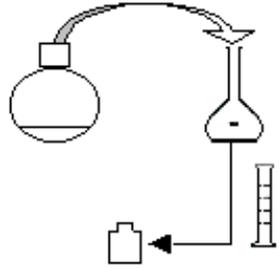
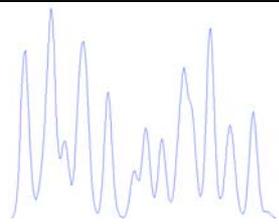
Biomarqueurs	Bioindicateurs	Composés ou produits concernés	Commentaires
Le post marquage au P32 (Adduits d'ADN)	Poissons (perches, brochets, plie, limande...)	HAP	-Coûteux. -Permet de trouver un adduit pour 10 ⁹ nucléotides. -Les adduits peuvent être reliés à l'âge et au sexe de l'organisme, aux saisons, à la température de l'eau, et à la disponibilité de la nourriture -Indiquent une pollution en cours ou récente.
Stress sur stress	Mollusques	Stress par une pollution quelconque	-Facile à réaliser (nécessite très peu de matériels). -Ne définit pas l'origine du stress.
Indices(LSI, CF, IGS) ; étendue de croissance	Poissons	Différents stress	-Assez simple d'utilisation. -Pas très précis (donnent juste une idée générale).
Stabilité lysosomale	Poissons	Polluants	Pas très précise.
Rouge neutre	Moules, poissons	PAH, PCB, pesticides organochlorés, métaux...	-S'effectue sur un très petit échantillon de cellules -Ne nuit pas à l'animal. -Il est très sensible.
Biomarqueurs morphologiques	Poissons	Polluants	Pas très précis (donnent une information sur l'état général de l'organisme).
Consommation d'O ₂	Poissons	Métaux lourds	Pour des expériences à court terme.
Fréquence cardiaque	Crabes	Pétrole	Ne suffit pas à lui seul.
TEQ	Poissons	PCB, PAH, Dioxines.	-Possède de nombreuses lacunes. -Encore controversée.

ANNEXE 3 : Protocoles expérimentaux des trois méthodes mis en place au laboratoire

Etapes		Matériels et produits	Mode opératoire
1. Solubilisation du produit chimique à l'Ultra-turrax		Ultra-turrax Bécher en verre de 200 mL 5g de produit chimique 100 mL d'eau	Agitation à 10000 tr/min pendant 5min
2. Filtration de la phase aqueuse		Entonnoir Filtre plissé Whatman 2V Ampoule à décanter de 250 mL Seringue Etalon interne	Filtration de la solution (eau + produit chimique en suspension) Récupération de la phase aqueuse, pesée de celle-ci et ajout de l'étalon interne (x μ L)
3. Extraction liquide-liquide		Eprouvette graduée Ballon de 100 mL Entonnoir Coton lavé au préalable au Soxhlet (2h au CH_2Cl_2) Na_2SO_4 anhydre passé au préalable (4h à 400°C) 30 mL de CH_2Cl_2	Ajout du solvant d'extraction Agitation manuelle de 2 min Décantation Séchage de la phase organique sur sulfate de sodium anhydre
Cette étape d'extraction est renouvelée 2 fois et les 3 phases organiques sont regroupées.			
4. Evaporation de l'échantillon		Evaporateur rotatif	Evaporation à l'évaporateur rotatif
5. Préparation de l'échantillon		Fiole de 10 mL Vial de 2 mL Eprouvette CH_2Cl_2	Transfert de l'échantillon du ballon dans une fiole jaugée de 10 mL Ajustement à 10 mL dans la fiole Prise d'un extrait de 2 mL et transfert dans un vial
6. Analyse en Chromatographie en phase gazeuse couplée à un spectromètre de masse (GC-MS)		Chromatogramme	Exploitation des résultats

Etapes		Matériels et produits	Mode opératoire
1. Solubilisation du produit chimique au Shake-flask		Shake-flask Erlenmeyers bouchés 5g de produit chimique 100 mL d'eau	Agitation latérale à 200 tr/min et 35 mm d'amplitude Prélèvement d'un triplicat au temps voulu
2. Filtration de la phase aqueuse		Entonnoir Filtre plissé Whatman 2V Ampoule à décantier de 250 mL Seringue Etalon interne	Filtration de la solution (eau + produit chimique en suspension) Récupération de la phase aqueuse, pesée de celle-ci et ajout de l'étalon interne (x µL)
3. Extraction liquide-liquide		Eprouvette graduée Ballon de 100 mL Entonnoir Coton lavé au préalable au Soxhlet (2h au CH ₂ Cl ₂) Na ₂ SO ₄ anhydre passé au préalable (4h à 400°C) 30 mL de CH ₂ Cl ₂	Ajout du solvant d'extraction Agitation manuelle de 2 min Décantation Séchage de la phase organique sur sulfate de sodium anhydre
Cette étape d'extraction est renouvelée 2 fois et les 3 phases organiques sont regroupées.			
4. Evapor l'échan		Evaporateur rotatif	Evaporation à l'évaporateur rotatif
5. Préparation de l'échantillon		Fiole de 10 mL Vial de 2 mL Eprouvette CH ₂ Cl ₂	Transfert de l'échantillon du ballon dans une fiole jaugée de 10 mL Ajustement à 10 mL dans la fiole Prise d'un extrait de 2 mL et transfert dans un vial
6. Analyse en chromatographie en phase gazeuse couplée à un spectromètre de masse (GC-MS)		Chromatogramme	Exploitation des résultats

Etapes		Matériels et produits	Mode opératoire
1. Préparation du support pour la diffusion moléculaire	 <p>Billes de verre+produit+ CH_2Cl_2</p>	<p>25 g de billes de verre propres (passées 4h à 400°C) de 0,2 mm de \varnothing Ballon de 100 mL Evaporateur rotatif 5% en masse de produit chimique 50 mL de CH_2Cl_2</p>	<p>Mélange, dans le ballon, des billes de verre, du produit chimique et du CH_2Cl_2 Evaporation du solvant</p>
2. Montage de la colonne	 <p>Coton+eau+billes colonne</p>	<p>Colonne à chromatographie Billes de verre polluées de 0,2 mm de \varnothing Billes de verre propres Coton lavé au préalable au Soxhlet (2h au CH_2Cl_2) Eau</p>	<p>Remplissage de la colonne, préalablement garnie de coton et d'eau, par les billes de verre polluées et par des billes de verre propres Mise en équilibre du système pendant une nuit</p>
3. Solubilisation du produit chimique dans la colonne	 <p>Colonne chargée Pompe péristaltique Réservoir d'eau</p>	<p>Pompe péristaltique Ampoule à décanter de 250 mL Colonne chargée Réservoir d'eau</p>	<p>Passage d'un courant d'eau à travers la colonne Récupération de cette solution saturée dans l'ampoule à décanter Changement d'ampoule toutes les 4h</p>
4. Extraction liquide-liquide	 <p>CH_2Cl_2 Na_2SO_4 coton</p>	<p>Eprouvette graduée Ballon de 100 mL Entonnoir Coton lavé au préalable au Soxhlet (2h au CH_2Cl_2) Na_2SO_4 anhydre passé au préalable (4h à 400°C) 30 mL de CH_2Cl_2</p>	<p>Pesée de la phase aqueuse et ajout de l'étalon interne (x μL) Ajout du solvant d'extraction Agitation manuelle de 2 min Décantation Séchage de la phase organique sur sulfate de sodium anhydre</p>

<p>Cette étape d'extraction est renouvelée 2 fois et les 3 phases organiques sont regroupées.</p>			
<p>5. Evaporation de l'échant</p> 		Evaporateur rotatif	Evaporation à l'évaporateur rotatif
<p>6. Préparation de l'échantillon</p> 		<p>Fliale de 10 mL Vial de 2 mL Eprouvette CH₂Cl₂</p>	<p>Transfert de l'échantillon du ballon dans une fiole jaugée de 10 mL Ajustement à 10 mL dans la fiole Prise d'un extrait de 2 mL et transfert dans un vial</p>
<p>7. Analyse en chromatographie en phase gazeuse couplée à un spectromètre de masse (GC-MS)</p> 		Chromatogramme	Exploitation des résultats

ANNEXE 4 : publications, posters et proceedings

Résumé

L'accroissement du trafic maritime des substances chimiques a justifié que le *Cedre* mette en place, depuis plusieurs années, un programme d'études pour mieux connaître leur comportement en mer en cas de déversements accidentels. Le naufrage du chimiquier *Eiwa Maru* (2002) contenant 5000 T de xylène à 20 milles au large de Tokyo, et, plus près de nos côtes, le naufrage de l'*Ievoli Sun* (2000) et l'accident du *Bow Eagle* (2002) viennent rappeler la réalité de ce besoin en soulignant l'insuffisance des données disponibles et surtout des capacités à prédire rapidement et de façon fiable le comportement et le devenir de produits chimiques déversés en mer. Evaluer la menace pour les intervenants et pour l'environnement, ainsi que l'intérêt et les possibilités de lutter contre la pollution ont été appréhendés.

Pour répondre à cette problématique, un programme expérimental a été lancé au *Cedre* avec pour objectif de caractériser le comportement de produits chimiques en mer en étudiant tout particulièrement leurs cinétiques de dispersion, d'émulsification, et d'évaporation. L'identification d'un stress lié à une pollution accidentelle à l'aide du biomarqueur NRRT a été étudié sur la moule (*Mytilus edulis*).

L'ensemble de ce travail a été réalisé à trois échelles : détermination des principales caractéristiques physico-chimiques des produits retenus au laboratoire puis, études *in situ* (en rade abri de Brest) de leur comportement sur une période de 5 jours (suivis des différentes cinétiques dans des conditions représentatives d'une réalité accidentelle), et enfin, validation à grande échelle avec des déversements de 2 tonnes en mer ouverte.

Mots-Clés : Produits chimiques, huiles végétales, dispersion naturelle, émulsification, experimentation en mer, biomarqueur, NRRT.

Abstract

Large volumes of chemicals are produced each year. Shipment of these chemicals by boats and barge transiting along coastal marine route are numerous. Recent examples of chemical spills as *Eiwa Maru* (2002) sinking with 5000 T of xylène from 20 nm of Tokyo and less far from our coastline the *Ievoli Sun* (2000) which sank and release 1000 T of styren has raised concern about the general lack of information of the fate of chemicals at sea and the impact on fauna and flora.

The goal of this study is to characterize the behaviour of some selected chemicals at sea in order to evaluate the kinetic of natural dispersion, emulsification and evaporation. This study is done in three scale : in laboratory with a new methodology created for this purpose, in a pilot scale (in Brest Harbour) and in open sea. In order to complete this physico chemical study, a biological test was also performed to evaluate the impact of chemicals on mussels (*mytilus edulis*), the lysosomal membrane stability is assessed by the NRRT assay.

Key words : chemicals, vegetable oil, natural dispersion, emulsification, field trial, biomarker, NRRT.