



HAL
open science

Devenir et impact des contaminants dans l'environnement : application à la gestion des sédiments et des boues d'épuration. Contribution à l'élaboration d'une méthodologie de caractérisation de l'écotoxicité des sédiments dulçaquicoles contaminés : intérêt de nouveaux outils écotoxicologiques. Avancement des travaux à fin 2013

Nicolas Manier

► **To cite this version:**

Nicolas Manier. Devenir et impact des contaminants dans l'environnement : application à la gestion des sédiments et des boues d'épuration. Contribution à l'élaboration d'une méthodologie de caractérisation de l'écotoxicité des sédiments dulçaquicoles contaminés : intérêt de nouveaux outils écotoxicologiques. Avancement des travaux à fin 2013. INERIS. 2014, 22p. hal-03977117

HAL Id: hal-03977117

<https://hal.science/hal-03977117v1>

Submitted on 7 Feb 2023

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

2013 – Domaine 13 - Action B



Devenir et impact des contaminants dans l'environnement : application à la gestion des sédiments et des boues d'épuration

**Contribution à l'élaboration d'une
méthodologie de caractérisation de
l'écotoxicité des sédiments dulçaquicoles
contaminés : intérêt de nouveaux outils
écotoxicologiques**

Avancement des travaux à fin 2013

Nicolas MANIER (INERIS)

Mars 2014

- **AUTEURS**

Nicolas MANIER, Ingénieur de l'unité « Expertise et Essais en Écotoxicologie » - INERIS,
nicolas.manier@ineris.fr

- **CORRESPONDANTS**

Onema : Olivier PERCEVAL, olivier.perceval@onema.fr

- **AUTRES CONTRIBUTEURS**

Camille MELINE, Technicienne de l'unité « Expertise et Essais en Écotoxicologie » - INERIS,
camille.meline@ineris.fr

Pascal PANDARD, Responsable de l'unité « Expertise et Essais en Écotoxicologie » - INERIS,
pascal.pandard@ineris.fr

Approbation INERIS	Approbation ONEMA
M. Eric THYBAUD Direction des Risques Chroniques 17/03/2014	M. Olivier PERCEVAL Direction de l'action scientifique et technique JJ/MM/AAAA

Droits d'usage : [par ex. accès libre ou accès réservé à XXX]

Niveau géographique : [un seul choix entre : mondial, national, régional, départemental, communal]

Couverture géographique : [administrative : indiquer le ou les pays, région, département ou commune ;
citations locales : indiquer les noms de cours d'eau, plan d'eau, masse d'eau, bassin hydrographique]

Niveau de lecture : [plusieurs choix possibles entre : scolaires, citoyens, professionnels, experts]

Référence INERIS du document : DRC-13-136875-13811A

SOMMAIRE

1. RAPPEL DES OBJECTIFS	4
2. PRÉSENTATION DES ORGANISMES ET DES PROTOCOLES D'ESSAI	5
2.1. Essai d'inhibition de la croissance et de la reproduction de <i>Caenorhabditis elegans</i>	5
2.1.1. Description et élevage de l'organisme	5
2.1.2. Principe de l'essai	6
2.1.3. Déroulement de l'essai.....	6
2.2. Essai de mortalité et d'inhibition de la croissance de <i>Heterocypris incongruens</i>	8
2.2.1. Description et élevage de l'organisme	8
2.2.2. Principe de l'essai	8
2.2.3. Déroulement de l'essai.....	8
3. SUBSTRATS DE RÉFÉRENCE	11
4. SUBSTANCES CHIMIQUES DE RÉFÉRENCE	11
5. SÉDIMENTS NATURELS	12
6. RÉSULTATS	12
6.1. Substrats de référence	12
6.2. Substances chimiques de référence	15
6.3. Sédiments naturels.....	17
7. BILAN	19
8. REFERENCES	20
9. LISTE DES TABLEAUX	21
10. LISTE DES FIGURES	21

1. RAPPEL DES OBJECTIFS

Au cours de ces dernières années, différentes méthodologies d'évaluation de l'écotoxicité des sédiments ont été proposées avec des objectifs de natures diverses :

- Pour caractériser les matériaux de dragage et orienter le scénario de gestion à terre de ces derniers (e.g. étude CETMEF/VNF/CEMAGREF/ENTPE),
- Pour évaluer le danger des matériaux dragués au sens de la réglementation déchets dangereux (e.g. groupe de travail MEEDDAT « Dangerosité des sédiments » relatif à l'application de la propriété de danger H14),
- Pour caractériser de façon exhaustive l'écotoxicité des sédiments en place (e.g. ANR PRECODD DIESE).

Depuis ces travaux, de nouveaux outils de caractérisation des dangers des sédiments ont été normalisés à l'ISO ou sont en passe de l'être. C'est le cas des essais sur :

- Nématodes : détermination de l'effet toxique d'échantillons de sédiment et de sol sur la croissance, la fertilité et la reproduction de *Caenorhabditis elegans* (NF ISO 10872 :2010) ;
- Ostracodes : détermination de la toxicité des sédiments d'eau douce envers *Heterocypris incongruens* (NF ISO 14371:2012) ;
- Bactéries : détermination de l'inhibition de l'activité déshydrogénase d'*Arthrobacter globiformis* — essai de contact sur solide avec le colorant redox résazurine (ISO/CD 18187) ;
- Macrophytes : détermination de l'effet toxique des sédiments sur la croissance de *Myriophyllum aquaticum* (NF ISO 16191:2014).

Le présent projet se propose ainsi d'évaluer l'applicabilité effective de ces protocoles d'essai pour la caractérisation de l'écotoxicité des sédiments en place. Les résultats de ce travail permettront d'autre part, de juger de la pertinence et de la sensibilité de ces organismes par rapport aux essais plus classiquement réalisés, tels que les essais sur hyalélles ou larves de chironomes. Le travail devra finalement permettre d'établir des recommandations pour l'intégration de ces nouveaux outils dans les batteries d'essais pour la caractérisation de l'écotoxicité des sédiments potentiellement contaminés. Récemment, des approches similaires considérant certains de ces nouveaux protocoles d'essai ont été abordées (Höss *et al.* 2010 ; Feiler *et al.* 2013). Les résultats publiés par ces auteurs donnent un premier aperçu de l'intérêt et de l'applicabilité de ces essais (robustesse, critères et seuils de toxicité) et confirment la pertinence de ce type d'approche pour la caractérisation de l'écotoxicité des sédiments en place.

Au cours de l'année 2013, les travaux ont porté sur l'appropriation de deux des protocoles d'essai proposés : l'essai d'inhibition de la croissance et de la reproduction des nématodes (*Caenorhabditis elegans*) et l'essai de mortalité et d'inhibition de la croissance des ostracodes (*Heterocypris incongruens*), avec comme objectifs :

- de mettre en place des protocoles pour chacun des deux essais ;
- de définir le ou les substrats artificiels à utiliser en tant que référence dans les études et de disposer d'information en ce qui concerne les différents critères d'effets mesurés ;
- de renseigner sur la sensibilité des deux organismes utilisés au regard de différentes substances chimiques de référence ;
- de caractériser l'écotoxicité de sédiments naturels à l'aide de ces deux essais.

2. PRÉSENTATION DES ORGANISMES ET DES PROTOCOLES D'ESSAI

2.1. ESSAI D'INHIBITION DE LA CROISSANCE ET DE LA REPRODUCTION DE *CAENORHABDITIS ELEGANS*

2.1.1. Description et élevage de l'organisme

Les nématodes font partie des organismes métazoaires. Ils sont abondants, riches en espèces et présents de façon ubiquitaire dans des environnements très diversifiés tels que les eaux douces ou les eaux saumâtres mais aussi dans les sédiments et les sols (Yeats, 1981 ; Traunspurger *et al.*, 2002). Les espèces non parasites jouent un rôle fondamental dans les écosystèmes puisqu'ils interviennent dans la décomposition de la matière organique et de la litière (Sohlenius, 1980 ; Freckmann *et al.*, 1990). D'autre part, certains nématodes se nourrissent de bactéries et interviennent, par conséquent, dans la régulation des activités microbiennes.

Parmi les nématodes, *Caenorhabditis elegans* est un organisme très utilisé en biologie. Il fait partie de la famille des Rhabditidae, de la classe Secernentea. C'est un ver non segmenté dont les adultes font environ 1 à 1,5 mm de long. Dans la nature, cet invertébré vit dans l'eau interstitielle des sols et sédiments et se retrouve sur tous les continents (Kiontke & Sudhaus, 2006).

Le cycle biologique de *C. elegans* au laboratoire (Figure 1) a une durée approximative de 72 heures de l'œuf à l'adulte fécond, lorsque ceux-ci sont maintenus à une température de $20 \pm 1^\circ\text{C}$. Ce cycle biologique est composé de cinq stades à partir de l'œuf : quatre stades larvaires (appelés stades L1, L2, L3 et L4) séparés par des mues et un stade adulte fécond permettant aux individus hermaphrodites de se reproduire. Il est ainsi possible de disposer d'une nouvelle génération de nématodes tous les trois jours. Sous certaines conditions de stress, tel que le manque de nourriture, les larves de stade L1 peuvent évoluer vers un stade L2 intermédiaire appelé stade « Dauer ». Sous cette forme, les larves ont la possibilité de survivre durant plusieurs semaines. Un nouvel apport nutritif permet de poursuivre le développement vers les stades supérieurs. Pour des raisons pratiques, les nématodes sont maintenus en élevage au stade « Dauer ». Ceci permet de réduire la fréquence de repiquage des organismes et de disposer d'individus synchrones pour la réalisation des essais.

La variété N2 (Bristol) de type sauvage est recommandée par la norme ISO 10812 (2010). Au laboratoire, cette souche est conservée sur boîte de pétri gélosée contenant un milieu de croissance pour les nématodes (NGM : Nematode Growth Medium) et recouverte d'un tapis bactérien (*Escherichia Coli* OP50).

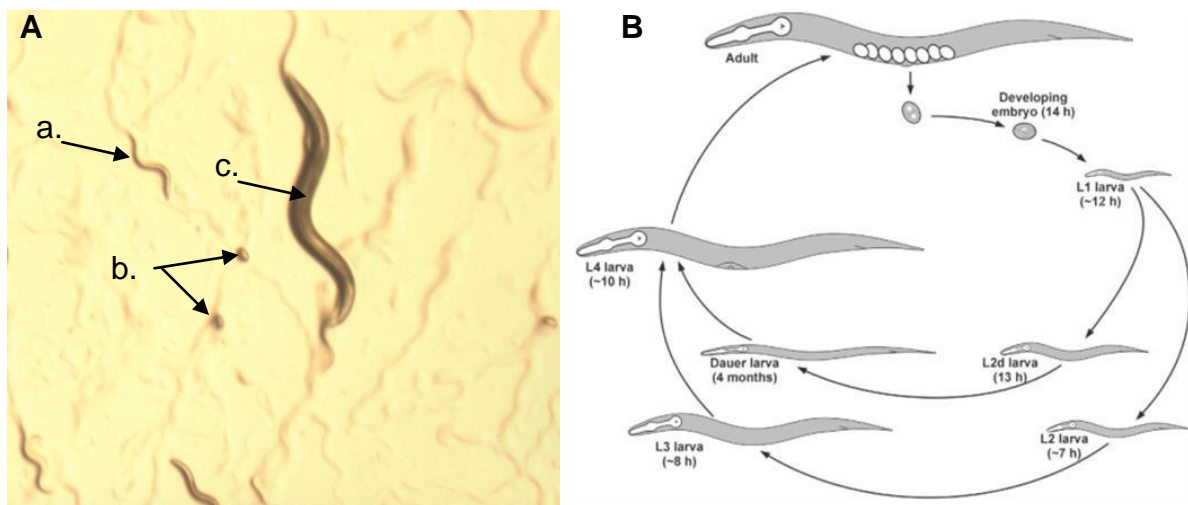


Figure 1 : Illustration de *Caenorhabditis elegans* (A) et de son cycle de vie au laboratoire (B). (a.) juvénile stade L1 ; (b.) œufs ; (c.) adulte hermaphrodite gravide.

2.1.2. Principe de l'essai

Cet essai permet de déterminer le pourcentage de mortalité, d'inhibition de la croissance et/ou de la reproduction du nématode *C. elegans* exposé à des sédiments bruts ou à un milieu aqueux (sans substrat).

Des larves au stade de développement L1 (10 organismes par réplicat / 4 réplicats par condition) sont exposées par contact direct, pendant 96 heures et à 20°C, à un échantillon de sédiment ou à un échantillon aqueux à analyser. Durant cette période, les individus accomplissent un cycle complet de reproduction. Le nombre d'adultes récupéré et la taille de ces adultes constituent les critères de mortalité et de croissance. Le dénombrement des juvéniles produits pendant l'essai permet d'évaluer le paramètre de reproduction.

Le protocole pour la réalisation de cet essai a fait l'objet d'une normalisation à l'ISO : « Détermination de l'effet toxique d'échantillons de sédiment et de sol sur la croissance, la fertilité et la reproduction de *Caenorhabditis elegans*. » (NF ISO 10872 :2010).

2.1.3. Déroulement de l'essai

Le schéma général du déroulement de l'essai est présenté sur la figure 2.

- Synchronisation et exposition des organismes

Trois jours avant la réalisation des essais, une partie des organismes maintenus au stade de développement « Dauer » est placée sur une nouvelle gélose contenant un tapis bactérien (*E. coli* OP50) fraîchement préparé, puis mis à incuber à 20°C. A l'issue de ces trois jours, la filtration à 5 µm des organismes « Dauer » ainsi conditionnés permet de disposer de juvéniles synchrones au premier stade de développement (L1).

L'exposition des organismes est ensuite réalisée à l'aide de plaques multipuits (12 puits) dans lesquelles sont introduits : 500 mg de sédiment à tester, 0.5 ml de milieu nutritif (M9 + bactéries) ainsi que 10 organismes synchrones au premier stade larvaire (L1). Les plaques multipuits sont mises à incuber à 20°C pendant 96 heures et à l'obscurité.

- Extraction et lecture de l'essai

A l'issue de la période d'exposition, un volume de 0.5 mL d'une solution de rose Bengale (0.3 g/L) est ajouté dans chacun des puits. Les plaques subissent un traitement thermique (15 minutes à 80°C) qui permet de tuer les organismes et de les colorer. L'extraction des adultes et des juvéniles de la matrice solide est réalisée par une méthode de flottation, à l'aide d'une solution de silice colloïdale (LUDOX TM50 à 1.13 g/cm³) et de centrifugations successives pour éliminer la phase solide.

Les organismes sont ensuite récupérés dans la solution de LUDOX puis transférés dans une roue de Ward. Les adultes sont dénombrés, puis mesurés (critère de mortalité et de croissance). La présence d'œufs à l'intérieur des organismes est consignée (critère de fertilité). Les jeunes produits pendant la phase d'exposition sont finalement dénombrés (critère de reproduction). L'ensemble de ces opérations sont réalisées sous loupe binoculaire.

- Critères de validité de l'essai

Les critères de validité suivant sont définis par la norme NF ISO 10872 :

- le taux de récupération moyen des organismes contrôles doit être supérieur ou égale à 80% et inférieur ou égal à 120% ;
- le pourcentage moyen de mâles dans les contrôles doit être inférieur ou égal à 10% ;
- la fertilité moyenne des organismes contrôles doit être supérieure ou égal à 80% ;
- la reproduction moyenne des organismes contrôles doit être supérieure ou égale à 30 juvéniles par organisme exposé.

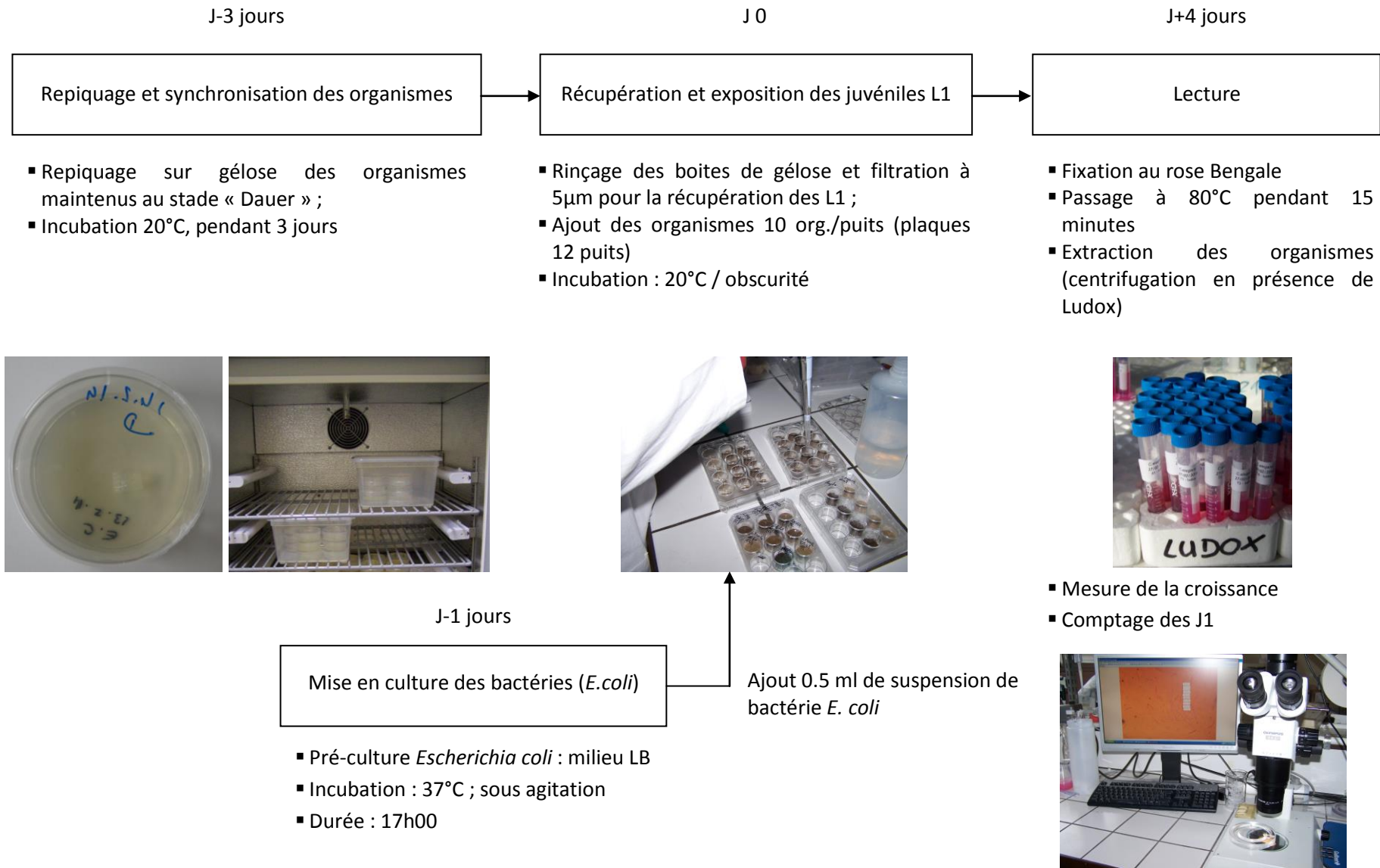


Figure 2 : Schéma général du déroulement de l'essai d'inhibition de la croissance et de la reproduction du nématode

2.2. ESSAI DE MORTALITE ET D'INHIBITION DE LA CROISSANCE DE *HETEROCYPRIS INCONGRUENS*

2.2.1. Description et élevage de l'organisme

Les ostracodes font partie des organismes épibenthiques de la méiofaune. Ils appartiennent à l'embranchement des Arthropodes et au phylum des Crustacés. On les retrouve dans une grande variété de substrats et de milieux aquatiques. Ils présentent une carapace bivalve et possèdent un appendice leur permettant de générer un courant d'eau favorisant les échanges gazeux. Parmi les ostracodes, *Heterocypris incongruens* (figure 3) est une espèce omnivore d'eau douce appartenant à la famille des Cyprididae. Commune en Europe et en Amérique, sa reproduction est parthénogénétique et conduit à la production d'œufs de résistance (kystes). La taille de la larve (nauplius), varie entre 150 et 250 µm. La croissance des nauplii s'effectue par mues jusqu'à l'âge adulte où leur taille peut atteindre 1500 µm.



Figure 3 : Illustration de l'ostracode *Heterocypris incongruens*

Les essais ont été réalisés à partir d'organismes provenant de kystes de résistance fournis par Microbiotest Inc.

2.2.2. Principe de l'essai

Cet essai permet de déterminer le pourcentage de mortalité et/ou d'inhibition de la croissance sur l'ostracode d'eau douce *Heterocypris incongruens* exposé à des sédiments bruts.

Des larves fraîchement écloses (10 nauplii par réplicat / 3 à 6 réplicats par condition) sont exposées par contact direct à un échantillon de sédiment à analyser. Le pourcentage de mortalité des organismes d'essai est déterminé après 6 jours d'exposition. L'inhibition de la croissance des organismes dans l'échantillon de sédiment (par mesure de la longueur des individus en fin d'essai) est déterminée par rapport à celle obtenue avec le sédiment témoin, comme critère d'effet subléthal. Le protocole pour la réalisation de cet essai a récemment fait l'objet d'une normalisation à l'ISO : « Détermination de la toxicité des sédiments d'eau douce envers *Heterocypris incongruens*. » (NF ISO 14371:2012).

2.2.3. Déroulement de l'essai

Le schéma général du déroulement de l'essai est présenté sur la figure 4.

- Eclosion des kystes et nourrissage des nauplii

Les kystes d'*Heterocypris incongruens* sont conservés à $4 \pm 2^\circ\text{C}$ à l'obscurité. L'éclosion est réalisée 52 h avant le début de l'essai. Une quantité suffisante de kystes est ajoutée dans une boîte de pétri en présence d'un volume de 8 mL de milieu d'essai. Les boîtes sont ensuite placées dans une enceinte thermostatée à $25 \pm 1^\circ\text{C}$ sous une illumination constante de 3 000 à 4 000 Lux. Une première alimentation des nauplii a lieu au bout de 48 h d'incubation en ajoutant 1 mL de suspension de spiruline (*Spirulina platensis*) dans la boîte de pétri. Celle-ci est ensuite remise en incubation pendant 4 heures dans les mêmes conditions de luminosité et de température que précédemment.

- Exposition des organismes

L'exposition des organismes est réalisée à l'aide de plaques multipuits (6 puits). Chaque puits contient un volume de 2 mL de suspension algale de *Desmodesmus subspicatus* à une concentration de $1,5 \cdot 10^7$ cellules.mL⁻¹, un volume de 2 mL de milieu d'essai et un volume de 1 mL de sédiment. Dix nauplii, prélevés de façon aléatoire, sont ensuite introduits dans chacun des puits. Les plaques sont incubées pendant une période de six jours à $25 \pm 1^\circ\text{C}$ et à l'obscurité. Pour chaque condition d'essai, 6 réplicats (6 puits) sont réalisés.

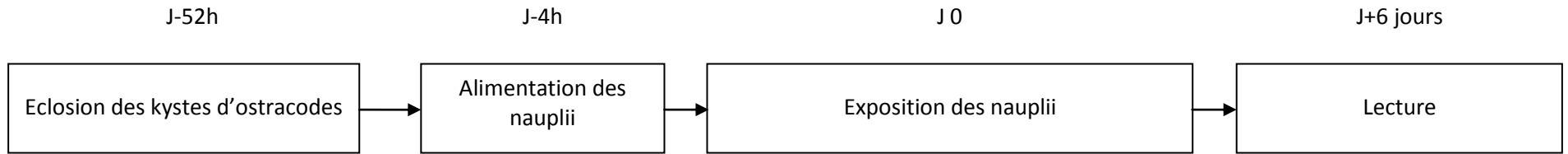
- Récupération et mesure des critères d'effet

A l'issue de la phase d'exposition les organismes vivants sont récupérés par tamisage puis dénombrés. Ils sont ensuite fixés et colorés à l'aide de quelques gouttes de Lugol avant d'être mesurés sous loupe binoculaire en utilisant un logiciel d'analyse d'image.

- Critères de validité de l'essai

Selon la norme NF ISO 14371, l'essai est jugé valide si les conditions suivantes sont remplies :

- le pourcentage de mortalité dans le sédiment de contrôle n'excède pas 20 %;
- l'augmentation moyenne de la longueur des ostracodes dans le sédiment de contrôle est au minimum de 1,5 fois par rapport à la longueur moyenne des organismes au début de l'essai.



- Durée : 48 h
- Milieu EPA / 25°C / 3 à 4 kLux

- Durée : 4h
- *Spirulina platensis*

- Plaque multipuits (6 puits) - 10 org./puits
- 3 à 6 puits par condition
- Nourriture : microalgues (*D. subspicatus*)

- Mortalité
- Mesure de croissance après fixation au Lugol

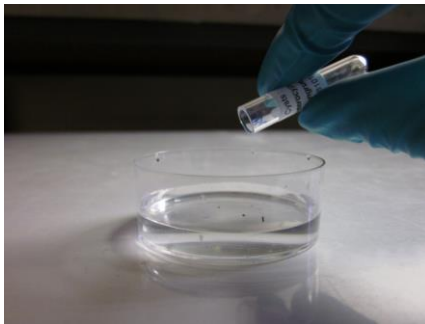


Figure 4 : Schéma général du déroulement de l'essai de mortalité et d'inhibition de la croissance des ostracodes

3. SUBSTRATS DE RÉFÉRENCE

Plusieurs substrats artificiels peuvent être utilisés en tant que sédiment témoin pour la réalisation des essais. Ainsi, le protocole normalisé pour la réalisation de l'essai sur ostracodes recommande l'utilisation d'un sable relativement grossier d'un diamètre moyen de 2 mm (dit « sable de rivière »). Le protocole normalisé pour la réalisation de l'essai sur nématode propose quant à lui un sédiment artificiel de composition plus complexe.

Dans le cadre de ces travaux, différentes matrices artificielles incluant des sables de granulométries différentes, ainsi que des sédiments artificiels déjà préconisés pour d'autres essais d'écotoxicité sédimentaire ont été testés. L'objectif était d'identifier le ou les substrats les plus appropriés pour la réalisation des essais ostracodes et nématodes et éventuellement de définir un substrat commun pour ces deux essais. Le tableau 1 présente les substrats testés.

Tableau 1 : Substrats de référence testés

Substrat de référence	Identification/référence normative	Caractéristiques/composition	
Sables	« Sable de rivière »	Sable quartzique : $\varnothing=2\text{mm}$	
	HN31	Sable quartzique : $\varnothing=0.2$ à 0.5 mm	
	HN38	Sable quartzique : $\varnothing=0.05$ à 0.25 mm	
Sédiments artificiels	OCDE 218	Tourbe à sphaigne :	5%
		Kaolin :	20%
		Sable quartzique (0.05 à 0.2 mm) :	75%
		CaCO ₃ :	0.1%
	NF T90-338-1	Tourbe brune :	6.5%
		Kaolin :	33.25%
Sable quartzique (0.8 à 2 mm) :		60%	
NF ISO 10872	CaCO ₃ :	0.1%	
	Tourbe :	4%	
	CaCO ₃ :	1%	
	Dolomite :	0.5%	
	Fe ₂ O ₃ :	4.5%	
Al ₂ O ₃ :	20%		
	Sable siliceux (0.1 à 0.4 mm) :	70%	

4. SUBSTANCES CHIMIQUES DE RÉFÉRENCE

La sensibilité des organismes a été évaluée à l'aide de substances chimiques de référence parmi celles généralement préconisées pour les essais d'écotoxicité :

- Le chlorure d'hexadécylbenzyltriméthylammonium monohydrate (BAC-16)
- Le sulfate de cuivre pentahydraté (CuSO₄, 5H₂O)
- L'acide borique (H₃BO₃)
- Le 3,5 dichlorophénol (3,5 DCP)

Il est à noter que pour les ostracodes, le sulfate de cuivre pentahydraté est actuellement la substance chimique recommandée par la norme NF ISO 14371 (2012) en tant que substance de référence ; le BAC-16 étant la substance de référence préconisée par la norme NF ISO 10872 (2010) pour la validation de l'essai nématodes.

5. SÉDIMENTS NATURELS

Dix sédiments naturels provenant de sites potentiellement contaminés ou non ont été testés au cours de l'année 2013 (tableau 2). Une première série de prélèvements a été réalisée en mai 2013. Les sédiments prélevés lors de cette série proviennent de différents sites soumis à une pression minière. Une seconde série de prélèvements a été réalisée en octobre 2013. Les sédiments prélevés lors de cette série proviennent de deux cours d'eau soumis à une pression industrielle impliquant des résidus issus d'industries de production de matières premières pharmaceutiques (site Bolbec (76)) et de production d'intermédiaires de synthèse destinés principalement à l'industrie pharmaceutique et de quelques médicaments (site de Beuvry-la-forêt (59)). Les sédiments du site «Bolbec » ont été prélevés à proximité de la source potentielle de rejet (Bolbec Usine) et en aval (environ 1.5 km) du site (Bolbec Piscine). Les sédiments du site de Beuvry-la-forêt ont été prélevés en amont de la source potentielle de rejet et en aval de cette source. Le sédiment d'un site « référence » (Cressonnière d'Houdancourt (60)), non soumis à une pression anthropique importante, a également été prélevé.

Traitement préalable à la réalisation des essais d'écotoxicité :

Les sédiments prélevés ont été conservés à -20°C pendant moins de 3 mois avant la réalisation des essais. La décongélation a été effectuée à température ambiante. Une fois décongelés, les sédiments ont été homogénéisés, puis l'eau de ressuage a été éliminée. Ils ont ensuite été débarrassés des éléments grossiers (cailloux, débris végétaux, invertébrés), puis tamisés à 4 mm.

Tableau 2 : Sédiments naturels testés

Nom du site	Contamination potentielle	Période de prélèvement	Obs. visuelle – texture/couleur/présence de matière organique
Etang St-Pierre Etang Noir Madic La Jonchère St-Maurice Malessard	Métallique	Mai 2013	Sableuse/brun/quelque débris végétaux Sableuse/noire/débris végétaux importants Limoneuse/noire/débris végétaux importants Argileuse/brun clair/quelque débris végétaux Limoneuse/brun foncé/débris végétaux importants
Bolbec (Piscine) Bolbec (Usine) Beuvry-la-forêt (amont) Beuvry-la-forêt (aval)	Industrie pharmaceutique	Octobre 2013	Argileuse/brun foncé/invertébrés (gammare et sangsues) et débris végétaux importants Argileuse/brun clair/quelques débris végétaux Argileuse/brun foncé/ quelque débris végétaux Argileuse/noire/débris végétaux importants
Cressonnière Houdancourt	Site « référence »	Octobre 2013	Sableuse/brun clair/absence de débris organiques visibles

6. RÉSULTATS

6.1. SUBSTRATS DE REFERENCE

Les résultats obtenus pour les différents substrats de référence testés sont présentés dans les tableaux 3 et 4, pour les essais menés sur les ostracodes et les nématodes, respectivement.

Concernant l'essai de mortalité et d'inhibition de la croissance des ostracodes, les résultats obtenus montrent que, d'une façon générale, l'utilisation de sable en tant que substrat de référence n'est pas appropriée, quelle que soit la granulométrie utilisée. En ce qui concerne le sable de rivière, seul deux essais sur les 10 réalisés ont permis de valider le critère de mortalité (< 20% de mortalité à la fin de l'essai), avec 8.3% et 10% de mortalité observée. Sur ces deux essais, les taux de croissance des ostracodes étaient supérieurs à 1.5, et indiquent malgré tout, une bonne croissance des organismes pendant l'essai. Parmi les dix essais menés, six essais ont entraîné une mortalité complète des organismes. Des résultats similaires ont été obtenus avec les autres sables considérés (HN31 et HN38). Ainsi, aucun des sept essais menés sur le sable HN31 n'a permis d'obtenir moins de 20 % de mortalité des ostracodes. La majorité des essais menés (6 sur 7) ont entraîné 100% de mortalité chez les ostracodes.

Les essais réalisés sur les sédiments artificiels ont, au contraire, permis de définir un sédiment dont la composition permet de maintenir les organismes en vie et permet un taux de croissance supérieur à 1.5 pendant la durée de l'essai. Il s'agit du sédiment défini dans la ligne directrice OCDE 218 (proposé pour la réalisation des essais sur chironomes). Sur les 13 essais menés avec ce sédiment, un seul n'a pas rempli le critère de validité pour la mortalité (avec 36.7% de mortalité). Tous les autres essais réalisés ont satisfait à ce critère et ont permis d'atteindre un taux de croissance des organismes compris entre 1.6 et 4.4 (taux de croissance moyen = 2.9). Le coefficient de variation calculé pour ce critère est de 30.5%. Les résultats obtenus sur les autres sédiments artificiels n'ont pas permis de satisfaire aux critères de validité de l'essai, à l'exception d'un seul essai mené sur le sédiment artificiel proposé par la norme NF T90-338-1, pour la réalisation des essais sur les hyalèlles. De la même façon que pour les sables, ces sédiments artificiels ne peuvent être retenus comme substrat de référence pour la réalisation de l'essai de mortalité et d'inhibition de la croissance des ostracodes.

Compte tenu de ces résultats, les essais menés par la suite ont été réalisés en considérant le sédiment artificiel défini par la ligne directrice OCDE 218.

Ces différents substrats ont également été utilisés pour l'essai sur les nématodes. Les résultats observés (tableau 4) montrent que l'utilisation de sable d'une granulométrie moyenne et l'utilisation de sable grossier ne permettent pas de satisfaire au bon développement des organismes dans ces conditions. Une mortalité importante des organismes (>80 %) a été observée. D'autre part, la croissance des organismes survivants a été quasiment nulle pour ces substrats. Le sable HN38 a, quant à lui, permis de valider l'essai.

Les sédiments artificiels de référence ont, d'une façon générale, permis la survie, la croissance et la reproduction des nématodes. D'autre part, les critères de validité recommandés par la norme NF ISO 10872 ont été remplis pour chacune de ces matrices. Une légère différence en termes de croissance et de reproduction a cependant été observée en fonction du sédiment artificiel considéré. En comparaison avec le sédiment NF ISO 10872, la croissance et la reproduction des organismes sont apparues légèrement plus importantes dans le sédiment NF T90-338-1 et légèrement plus faible dans le sédiment OCDE 218. Les croissances mesurées pour ces matrices restent néanmoins cohérentes au regard des connaissances acquises chez cet organisme en milieu aqueux (Milieu M9 ; croissance moyenne comprise entre 914 μ m et 1414 μ m ; valeurs rapportées pour 32 essais indépendants) et terrestre (sol LUFA ; croissance moyenne comprise entre 847 μ m et 1261 μ m ; valeurs rapportées pour 14 essais indépendants). Elles correspondent respectivement aux valeurs croissance limites haute et basse que l'on peut rencontrer. La reproduction moyenne des organismes après exposition aux sédiments artificiels NF T90-338-1 et OCDE 218 suivent la même tendance que les résultats de croissance observés et se situent dans les limites hautes et basses des valeurs de reproduction moyenne auxquelles l'on peut s'attendre en milieu aqueux (milieu M9 ; reproduction moyenne comprise entre 51 et 213 juvéniles/adulte introduit) et en milieu terrestre (sol LUFA ; reproduction moyenne comprise entre 101 et 214 juvéniles/adulte introduit).

Compte tenu de ces résultats, le sable HN38 et les sédiments artificiels NF T90-338-1, OCDE 218 et NF ISO 10872 pourraient être considérés comme adéquats pour la réalisation de l'essai d'inhibition de la croissance et de la reproduction des nématodes. La variabilité observée en termes de croissance et de reproduction en fonction des sédiments testés devra cependant être confirmée par la suite. Notamment, il conviendra de confirmer les valeurs de croissance et de reproduction légèrement plus faible obtenues avec le sédiment OCDE 218, sédiment potentiellement utilisable en tant que substrat de référence commun à l'essai ostracodes.

Tableau 3 : Substrats de référence - résultats obtenus pour l'essai de mortalité et d'inhibition de la croissance des ostracodes

Substrat de référence		Nb d'essais réalisés	Nb d'essais valides	Mortalité (%)		Taux de croissance	
				min	max	min	max
Sables	Sable de rivière (Ø=2mm)	10	2	8.3	100.0	2.4	3.5
	HN31 (Ø=0.2 à 0.5 mm)	7	0	23.3	100.0	3.2 ^a	
	HN38 (Ø=0.05 à 0.25 mm)	7	1	0.0	100.0	2.6 ^a	
Sédiments artificiels	OCDE 218 (Chironomes)	13	12	0.0	36.7	1.6	4.4
	NF T90-338-1 (Hyalèlles)	3	1	10	100.0	2.8 ^a	
	NF ISO 10872 (Nématodes)	3	0	36.7	96.7	2.7	2.9

a: une seule valeur

Tableau 4 : Substrats de référence – résultats obtenus pour l'essai de mortalité, d'inhibition de la croissance et de la reproduction des nématodes

Substrat de référence		Mortalité (%)		Croissance (µm)		Reproduction ^a	
		moyenne	Ec-type	moyenne	Ec-type	moyenne	Ec-type
Sables	Sable de rivière (Ø=2mm)	85.0	24.0	177.0	48.0	0.0	0.0
	HN31 (Ø=0.2 à 0.5 mm)	98.0	5.0	223.0	nc	0.0	0.0
	HN38 (Ø=0.05 à 0.25 mm)	5.0	6.0	1133.0	18.0	94.0	16.0
Sédiments artificiels	OCDE 218 (Chironomes)	3.0	5.0	1043.0	25.0	83.0	38.0
	NF T90-338-1 (Hyalèlles)	0.0	0.0	1388.0	31.0	143.0	26.0
	NF ISO 10872 (Nématodes)	3.0	5.0	1200.0	20.0	133.0	35.0

a : nombre de juvéniles par organisme introduit ; les valeurs grisées sont présentées à titre informatif au regard du faible nombre d'organismes ayant survécu

6.2. SUBSTANCES CHIMIQUES DE REFERENCE

Les résultats des essais menés sur les différentes substances chimiques de référence sont résumés par les tableaux 5, 6 et 7.

Les essais ostracodes ont tous été réalisés en considérant le sédiment artificiel de l'OCDE 218 comme substrat d'essai. Les substances à tester ont été préparées dans le milieu constituant la phase aqueuse du système d'essai.

Les valeurs de $CE_{50\text{mortalité}}$ ont été définies pour les quatre substances sélectionnées. Les résultats obtenus sur le sulfate de cuivre sont apparus hétérogènes. Une valeur de $CE_{50\text{mortalité}}$ égale à 4.27 mg/L avait été calculée lors du premier essai. Une absence de toxicité marquée vis-à-vis de ce critère a été observée par la suite. Le 3,5 dichlorophénol est apparu comme étant la substance la plus toxique vis-à-vis des ostracodes ($CE_{50\text{mortalité}} < 6$ mg/L). Concernant le critère de croissance (résultats non rapportés), pour les concentrations n'ayant pas entraîné de mortalité des ostracodes, la croissance des organismes était similaire à la croissance observée dans le contrôle, quelle que soit la substance testée.

Les essais nématodes ont été réalisés soit en l'absence de substrat artificiel (exposition à la phase aqueuse uniquement), soit en considérant le sédiment artificiel proposé par la norme NF ISO 10872 en tant que substrat d'essai. Dans le second cas, le sédiment artificiel a été dopé par chacune des substances en considérant les recommandations de la norme NF ISO 10872. Les résultats obtenus pour cet essai montrent un effet plus marqué lors des expositions par voie liquide en comparaison avec les expositions aux sédiments dopés. Le 3,5 dichlorophénol est également apparu comme étant la substance entraînant le plus d'effets inhibiteurs sur les critères de croissance et de reproduction des organismes, que ce soit lors des essais réalisés en colonne d'eau uniquement ou sur sédiment artificiel dopé. L'acide borique n'a au contraire pas entraîné d'effets inhibiteurs significatifs. D'une façon générale, une plus grande sensibilité paramètre de reproduction en comparaison avec le paramètre de croissance des organismes a été observée. Cependant, au regard des valeurs de CE_{50} calculées, la gamme de sensibilité restent relativement similaire pour ces deux critères d'effet.

Tableau 5 : Mortalité des ostracodes exposés aux différentes substances de référence

substances	substrat		CE_{50} en mg/l [$IC_{95\%}$]	CE_{10} en mg/l [$IC_{95\%}$]
Sulfate de cuivre	OCDE 218	Essai n°1	4.27 [3.9-5.4]	3.8 [3.4-5.2]
	OCDE 218	Essai n°2	>20	Non calculable
	OCDE 218	Essai n°3	>20	Non calculable
BAC-16	OCDE 218	Essai n°1	>10	Non calculable
	OCDE 218	Essai n°2	27.7 [22-36]	14.5 [8-25]
3,5 DCP	OCDE 218	Essai n°1	4.9 [4-6]	1.9 [2-3]
	OCDE 218	Essai n°2	5.6 [5-6]	2.8 [2.6-4]
Ac. borique	OCDE 218	Essai n°1	CE_{50} entre 160 et 400	Non calculable
	OCDE 218	Essai n°2	301 [275-334]	225 [182-303]

Tableau 6 : Inhibition de la croissance des nématodes exposés aux différentes substances de référence

substances	substrat		CE ₅₀ mg/l [IC _{95%}]	CE ₁₀ mg/l [IC _{95%}]
Sulfate de cuivre	milieu M9	Essai n°1	> 100	Non calculable
	milieu M9	Essai n°1	16.1 [15.9-16.3]	9.8 [8.9 - 10.3]
BAC-16	milieu M9	Essai n°2	8.3 [8.1-8.5]	5.3 [5.0 - 5.7]
	milieu M9	Essai n°3	10.8 [10.6-11]	6.4 [6.1 - 6.7]
3,5 DCP	milieu M9	Essai n°1	>5 mg/L	>5 mg/L
Ac. borique	milieu M9	Essai n°1	> 1000	CE ₁₀ entre 400 et 1000
substances	matrice artificielle		CE ₅₀ mg/kg [IC _{95%}]	CE ₁₀ mg/kg [IC _{95%}]
Sulfate de cuivre	ISO 10872	Essai n°1	> 1000	312 [200-489]
BAC-16	ISO 10872	Essai n°1	> 1000	> 1000
3,5 DCP	ISO 10872	Essai n°1	35.4 [32.9-42.5]	26.4 [24.3-37]
Ac. borique	ISO 10872	Essai n°1	> 1000	> 1000

Tableau 7 : Inhibition de la reproduction des nématodes exposés aux différentes substances de référence

substances	substrat		CE ₅₀ mg/l [IC _{95%}]	CE ₁₀ mg/l [IC _{95%}]
Sulfate de cuivre	milieu M9	Essai n°1	Non calculable	Non calculable
	milieu M9	Essai n°1	11.4 [10.9-12.4]	9.8 [15-16.2]
BAC-16	milieu M9	Essai n°2	5.1 [4.7-5.4]	3.4 [3-4.1]
	milieu M9	Essai n°3	6.6 [5.6-7.3]	4.9 [5.6-7.3]
3,5 DCP	milieu M9	Essai n°1	3.2 [2.1-4.8]	0.6 [0.1-1.7]
Ac. borique	milieu M9	Essai n°1	CE ₅₀ entre 400 et 1000	CE ₁₀ entre 400 et 1000
substances	matrice artificielle		CE ₅₀ mg/kg [IC _{95%}]	CE ₁₀ mg/kg [IC _{95%}]
Sulfate de cuivre	ISO 10872	Essai n°1	> 1000	411 [159-836]
BAC-16	ISO 10872	Essai n°1	881 [737-1142]	439 [234-883]
3,5 DCP	ISO 10872	Essai n°1	29.2 [27.6-31.3]	24.2 [22.7-27.5]
Ac. borique	ISO 10872	Essai n°1	> 1000	> 1000

6.3. SEDIMENTS NATURELS

Le tableau 8 présente les résultats obtenus pour les essais ostracodes et nématodes réalisés sur les sédiments naturels. Deux séries d'essais ont été menés en 2013. La première série correspond aux sédiments provenant de sites potentiellement contaminés en éléments métalliques. Pour cette série, seul l'essai sur ostracodes a été réalisé. Les résultats obtenus indiquent une augmentation significative de la mortalité des ostracodes (entre 53% et 100% de mortalité) pour trois des cinq sédiments testés. Pour les sédiments n'ayant pas induit de mortalité, aucun effet inhibiteur concernant la croissance des organismes n'a cependant été observé. Au contraire, le taux de croissance des organismes exposés à ces sédiments était systématiquement supérieur au taux de croissance observé pour les organismes exposés au substrat de référence (OCDE 218). Il est en revanche du même ordre de grandeur en comparaison à celui des organismes exposés au sédiment provenant du site de « référence » (Cressonnière Houdancourt).

Les essais menés sur les sédiments de la seconde série n'ont pas permis de mettre en évidence d'effet marqué sur la mortalité des ostracodes. D'autre part, de la même façon que pour la première série, le taux de croissance des organismes en fin d'essai était plus important pour les sédiments naturels, par rapport à celui observé dans le substrat artificiel (OCDE 218) et du même ordre de grandeur que celui des organismes exposés au sédiment provenant du site de « référence ».

Les résultats obtenus pour les essais nématodes montrent une augmentation de la mortalité et une inhibition de la croissance et de la reproduction des organismes exposés au sédiment prélevé en aval du rejet potentiel du site de Beuvry-la-forêt. En revanche, aucun effet significatif n'a été observé pour les essais menés sur le sédiment prélevé en amont de ce même site. Concernant les autres sédiments, nous n'avons pas mis en évidence d'augmentation significative de la mortalité des nématodes. D'autre part, la reproduction des organismes a été significativement plus importante en comparaison avec les organismes exposés substrat artificiel (ISO 10872), avec en moyenne 160 à 166 juvéniles par organisme adulte pour les sédiments provenant des sites de Bolbec (usine et piscine). Cependant, le nombre de juvéniles par adulte se trouve être du même ordre de grandeur en comparaison avec les résultats obtenus pour le sédiment provenant du site de « référence » (Cressonnière Houdancourt). Ce constat, similaire à ce qui avait été observé pour les ostracodes, met en évidence les limites de l'utilisation de substrats artificiels témoins pour ces essais, et conduit finalement à s'interroger sur le choix de la matrice « contrôle » à utiliser dans le cadre de l'étude de l'écotoxicité des sédiments en place.

Tableau 8 : Résultats obtenus pour les essais nématodes et ostracodes réalisés sur les sédiments naturels

Sédiments	Nématodes									Ostracodes				
	Mortalité (%)		Croissance (µm)			Reproduction			Mortalité (%)		Taux de croiss.			
	Moyenne	Ec-type	Moyenne	Ec-type	%CV	Moyenne	Ec-type	%CV	Moyenne	Ec-type	Moyenne	Ec-type	%CV	
Contrôle (série 1)	-	-	-	-	-	-	-	-	3.3	5.2	1.93	0.09	4.5	
Etang St-Pierre	-	-	-	-	-	-	-	-	20.0	35.2	2.43*	0.24	9.8	
Etang Noir	-	-	-	-	-	-	-	-	53.3*	23.4	3.48*	0.26	7.6	
Madic	-	-	-	-	-	-	-	-	100.0*	0.0	nc	nc	nc	
La Jonchère St-Maurice	-	-	-	-	-	-	-	-	3.3	5.2	2.52*	0.16	6.5	
Malessard	-	-	-	-	-	-	-	-	73.3*	10.3	1.54*	0.08	5.1	
Contrôle (série 2)	2.5	5.0	1150.8	36.4	3.2	120.5	6.6	5.5	5.0	8.4	1.88	0.10	5.4	
Bolbec (Piscine)	2.5	5.0	1166.5	67.2	5.8	160.1*	23.0	14.4	18.3*	16.0	3.15*	0.11	3.6	
Bolbec (Usine)	5.0	10.0	1132.5	42.3	3.7	166.2*	31.8	19.2	0.0	0.0	2.77*	0.09	3.1	
Beuvry-la-forêt (amont)	10.0	14.1	1262.8	70.9	5.6	127.5	19.8	15.6	10.0	11.0	3.40*	0.10	2.9	
Beuvry-la-forêt (aval)	40.0	40.8	1009.9*	45.0	4.5	89.1	25.0	28.1	5.0	5.5	3.37*	0.13	3.9	
Cress. Houdancourt (site de référence)	0.0	0.0	1291.0*	39.6	3.1	189.5*	8.2	4.3	5.0	5.5	3.84*	0.18	4.7	

* différences significatives par rapport au contrôle au risque de 5% (test de Mann et Whitney) ; nc : non calculable
 les valeurs grisées sont présentées à titre informatives au regard du faible nombre d'organismes ayant survécu

7. BILAN

Les travaux menés au cours de l'année 2013 ont permis la mise en place des protocoles pour la réalisation de l'essai de mortalité et d'inhibition de la croissance des ostracodes et de l'essai d'inhibition de la croissance et de la reproduction des nématodes, dans un contexte de caractérisation de l'écotoxicité des sédiments en place.

Les résultats obtenus concernant les substrats artificiels ont montré que l'utilisation de sable n'était pas une matrice appropriée pour la réalisation des essais ostracodes. Le sédiment artificiel proposé par la ligne directrice OCDE 218 a permis, au contraire, d'obtenir des résultats valides et répétables en comparaison avec les autres substrats testés. Il convient par conséquent de s'interroger quant à la pertinence des informations indiquées dans le texte normatif actuel, notamment en ce qui concerne le choix du substrat de référence à utiliser pour la réalisation de l'essai.

Concernant les essais sur nématodes, l'utilisation de sable grossier ou ayant granulométrie moyenne n'ont pas permis de satisfaire aux critères de validité. En revanche, le sable HN38, ainsi que l'ensemble des sédiments artificiels testés ont permis la survie, la croissance et la reproduction des nématodes. L'utilisation du sédiment artificiel OCDE 218 en tant que sédiment commun aux essais sera à confirmer par la suite.

Les premières séries d'essais menées sur les sédiments naturels ont permis de discriminer les différents sédiments testés en termes d'écotoxicité (Beuvry-la-forêt amont vs Beuvry-la-forêt aval). Néanmoins, l'utilisation d'un substrat artificiel en tant que sédiments de contrôle s'est révélé être limitant au regard des résultats obtenus pour les paramètres de croissance des ostracodes, de croissance et de reproduction des nématodes pour les organismes exposés aux sédiments naturels potentiellement contaminés ou non. Il conviendrait par conséquent pour ce type d'approche, d'inclure un sédiment naturel provenant d'un site de « référence », en complément des substrats artificiels actuellement recommandés.

Les travaux obtenus sur ces deux essais seront poursuivis et complétés au cours de l'année 2014 par la mise en place et la validation des essais sur les bactéries (*Arthrobacter globiformis*) et les végétaux sédimentaires (*Myriophyllum aquaticum*).

8. REFERENCES

- Feiler U, Höss S, Ahlf W, Gilberg D, Hammers-Wirtz M, Hollert H, Meller M, Neumann-Hensel H, Ottermanns R, Seiler TB, Spira D, Heininger P.** 2013. Sediment contact tests as a tool for the assessment of sediment quality in german waters. *Environmental Toxicology and Chemistry*. 32 :144-155
- Freckman DW, Baldwin JG.** 1990. «Nematoda». In: Dindal DI, editor. *Soil biology guide*. New York, John Wiley and Sons. 155-200.
- Höss S, Ahlf W, Fahnenstich C, Gilberg D, Hollert H, Malbey K, Meller M, Hammers-Wirtz M, Heininger P, Neumann-Hensel H, Ottermanns R, Ratte HT, Seiler TB, Spira D, Weber J, Feiler U.** 2010. Variability of sediment-contact tests in freshwater sediments with low-level anthropogenic contamination – determination of toxicity thresholds. *Environmental Pollution*. 158 :2999-3010
- ISO/CD 18187.** (2013). Qualité du sol -- Qualité des échantillons solides -- Essai de contact en utilisant l'activité déshydrogénase de *Arthrobacter globiformis*.
- Kiontke K. and Sudhaus W.** 2006. In : "Ecology of *Caenorhabditis* Species." *WormBook Online Review of C. elegans Biology*. (<http://www.wormbook.org>)
- NF ISO 10872.** (2010). Qualité de l'eau -- Détermination de l'effet toxique d'échantillons de sédiment et de sol sur la croissance, la fertilité et la reproduction de *Caenorhabditis elegans* (nématodes)
- NF ISO 14371.** (2012). Qualité de l'eau -- Détermination de la toxicité des sédiments d'eau douce envers *Heterocypris incongruens* (Crustacea, Ostracoda)
- NF ISO 16191.** (2014). Qualité de l'eau -- Détermination de l'effet toxique des sédiments sur la croissance de *Myriophyllum aquaticum*
- NF T90-338-1.** 2010. Qualité de l'eau – Détermination de la toxicité des sédiments d'eaux douces vis-à-vis de *Hyalella azteca* – Partie 1 sédiments naturels
- OCDE** ligne directrice n° 218. 2004. Essai de toxicité sur les chironomes dans un système eau-sédiment chargé.
- Sohlenius B.** 1980. Abundance, biomass and contribution to energy flow by soil nematodes in terrestrial ecosystems. *Journal of Nematology*. 11: 86-196.
- Traunspurger W.** 2002. «Nematoda». In : Rundle S.D., Robertson A., Schmid-Araya J., editors. *Freshwater meiofauna. Biology and ecology*. Leiden: Blackhuys, 63-104.
- Yeats GW;** 1981. Nematode populations in relation to soil environmental factors". *Pedobiologia*. 22: 312-338.

9. LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Substrats de référence testés

Tableau 2 : Sédiments naturels testés

Tableau 3 : Substrats de référence - résultats obtenus pour l'essai de mortalité et d'inhibition de la croissance des ostracodes

Tableau 4 : Substrats de référence – résultats obtenus pour l'essai de mortalité, d'inhibition de la croissance et de la reproduction des nématodes

Tableau 5 : Mortalité des ostracodes exposés aux différentes substances de référence

Tableau 6 : Inhibition de la croissance des nématodes exposés aux différentes substances de référence

Tableau 7 : Inhibition de la reproduction des nématodes exposés aux différentes substances de référence

Tableau 8 : Résultats obtenus pour les essais nématodes et ostracodes réalisés sur les sédiments naturels

10. LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Illustration de *Caenorhabditis elegans* (A) et de son cycle de vie au laboratoire (B). (a.) juvénile stade L1 ; (b.) œufs ; (c.) adulte hermaphrodite gravide.

Figure 2 : Schéma général du déroulement de l'essai d'inhibition de la croissance et de la reproduction du nématode

Figure 3 : Illustration de l'ostracode *Heterocypris incongruens*

Figure 4 : Schéma général du déroulement de l'essai de mortalité et d'inhibition de la croissance des ostracodes

Onema

Hall C – Le Nadar
5, square Félix Nadar
94300 Vincennes

01 45 14 36 00

www.onema.fr

Ineris

Parc Technologique Alata
BP 2
60550 Verneuil-en-Halatte

03 44 55 66 77

www.ineris.fr