



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. Rapport final

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. Rapport final. Ineris. 2015, 49p. hal-03977642

HAL Id: hal-03977642

<https://hal.science/hal-03977642>

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.

Public Domain

RAPPORT D'ÉTUDE
DRC-15-136875-12589A

18/12/2015

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**

Rapport final

Avec le soutien financier de



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**

Rapport final

Liste des personnes ayant participé à l'étude :

Nicolas MANIER, Camille MELINE, Manon THEVENIN, Charline SUAIRE et
Pascal PANDARD

PRÉAMBULE

Le présent rapport a été établi sur la base des informations fournies à l'INERIS, des données (scientifiques ou techniques) disponibles et objectives et de la réglementation en vigueur.

La responsabilité de l'INERIS ne pourra être engagée si les informations qui lui ont été communiquées sont incomplètes ou erronées.

Les avis, recommandations, préconisations ou équivalents qui seraient portés par l'INERIS dans le cadre des prestations qui lui sont confiées, peuvent aider à la prise de décision. Etant donné la mission qui incombe à l'INERIS de par son décret de création, l'INERIS n'intervient pas dans la prise de décision proprement dite. La responsabilité de l'INERIS ne peut donc se substituer à celle du décideur.

Le destinataire utilisera les résultats inclus dans le présent rapport intégralement ou sinon de manière objective. Son utilisation sous forme d'extraits ou de notes de synthèse sera faite sous la seule et entière responsabilité du destinataire. Il en est de même pour toute modification qui y serait apportée.

L'INERIS dégage toute responsabilité pour chaque utilisation du rapport en dehors de la destination de la prestation.




	Rédaction	Vérification	Approbation
NOM	Nicolas MANIER	Pascal PANDARD	Eric THYBAUD
Qualité	Ingénieur de l'unité « Expertise et essais en écotoxicologie »	Responsable de l'unité « Expertise et essais en écotoxicologie »	Responsable du pôle « Dangers et impact sur le vivant »
Visa			

TABLE DES MATIÈRES

1.	INTRODUCTION ET RAPPEL DES OBJECTIFS	6
2.	MATERIELS ET METHODES	7
2.1	Présentation des organismes et des protocoles d'essai.....	7
2.2	Sédiments	7
2.2.1	Prélèvements des sédiments	7
2.2.2	Présentation des sédiments collectés	8
2.2.3	Caractérisation des matrices sédimentaires	9
2.2.4	Traitement préalable à la réalisation des essais d'écotoxicité	9
3.	CARACTERISATION DES SEDIMENTS COLLECTES	10
3.1	Granulométrie et paramètres géochimiques.....	10
3.2	Contamination des sédiments.....	11
4.	CARACTERISATION DE L'ECOTOXICITE DES SEDIMENTS	13
4.1	Robustesse et seuil de significativité des bioessais appliqués aux sédiments naturels	13
4.1.1	Robustesse des critères d'effets suivis	13
4.1.2	Valeurs limites de toxicité	14
4.2	Ecotoxicité des sédiments et complémentarité des bioessais.....	16
5.	CONCLUSIONS ET RECOMMANDATIONS	21
6.	REFERENCES.....	23
7.	LISTE DES TABLEAUX ET DES FIGURES.....	24
8.	LISTE DES ANNEXES	25

1. INTRODUCTION ET 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. 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/FDIS 18187) ;
- Macrophytes : détermination de l'effet toxique des sédiments sur la croissance de *Myriophyllum aquaticum* (NF ISO 16191:2014).

Bien que récemment standardisés, peu de travaux renseignant sur l'utilisation de ces nouveaux protocoles d'essai dans un contexte de caractérisation de l'écotoxicité des sédiments sont disponibles (Höss *et al.* 2010 ; Feiler *et al.* 2013). Le présent projet avait pour objectif d'évaluer l'applicabilité effective de ces nouveaux protocoles d'essai dans ce contexte et de juger de la pertinence et de la sensibilité de ces organismes par rapport aux essais plus classiquement réalisés (essais sur larves de chironomes notamment). La sensibilité des organismes vis-à-vis de substances chimiques de référence, la question des substrats proposés en tant que témoins ont été discutés précédemment. Les résultats de ces travaux ont fait l'objet des deux premiers rapports d'avancement de 2013 et 2014 (DRC13-136875-13811A et DRC-15-136875-04705A).




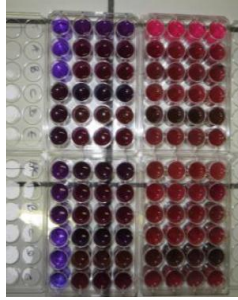

Au cours de l'année 2015, les travaux portant sur l'utilisation de ces bioessais pour la caractérisation des sédiments ont été finalisés. Une dernière campagne de prélèvement de sédiments a été effectuée. L'ensemble des sédiments prélevés au cours des campagnes de 2014 et 2015 a été testé à l'aide des essais sur *Caenorhabditis elegans* (nématode), *Heterocypris incongruens* (ostracode), *Myriophyllum aquaticum* (macrophyte) et *Arthrobacter globiformis* (bactérie), mais aussi à l'aide de l'essai sur *Chironomus riparius* renseignant sur la mortalité, l'inhibition de la croissance et l'inhibition de l'émergence des larves de diptères. Les sédiments des campagnes de 2014 et 2015 ont également été analysés afin de les caractériser sur un plan physico-chimique (granulométrie, paramètres géochimiques, oligo-éléments) ainsi que sur leur niveau de contamination en polluants principaux (métaux et HAP, essentiellement).

2. MATERIELS ET METHODES

2.1 PRESENTATION DES ORGANISMES ET DES PROTOCOLES D'ESSAI

Le tableau 1 résume les caractéristiques principales de chacun des organismes et bioessais étudiés. Les schémas détaillés des protocoles d'essais sont disponibles en annexe du rapport (annexes 1 à 5).

Tableau 1 : Description des organismes et bioessais utilisés

	<i>Caenorhabditis elegans</i> - Nématode -	<i>Heterocypris incongruens</i> - Ostracode -	<i>Myriophyllum aquaticum</i> - Macrophyte -	<i>Arthrobacter globiformis</i> - Bactérie -	<i>Chironomus riparius</i> - Diptère -
illustration					
Description	Organismes endobenthiques	Organismes épibenthiques commun	Macrophyte d'eau douce se développant dans des milieux stagnants ou à faibles courants	Bactérie aérobie, chimiohétérotrophe de la classe des oxydoréductases	Diptère dont la phase larvaire est principalement endobenthique
Norme	NF ISO 10872	NF ISO 14371	NF ISO 16191	ISO/FDIS 18187	NF T90-339-1
Critères d'effet suivis	- Détermination de la mortalité -Détermination de la croissance des larves -Reproduction des organismes	- Détermination de la mortalité -Détermination de la croissance des nauplius	- Détermination du taux de croissance	- Mesure de l'activité de la déshydrogénase	- détermination de la mortalité des larves après 7 jours - détermination de la croissance des larves après 7 jours - détermination de l'émergence des adultes après 28 jours
Temps exposition	96 heures	6 jours	10 jours	2 heures	7 et 28 jours

2.2 SEDIMENTS

2.2.1 PRELEVEMENTS DES SEDIMENTS

Les sédiments ont été prélevés manuellement à l'aide d'une pelle ou d'une benne (type « Van Veen ») tous deux en acier inoxydable, selon la profondeur de la colonne d'eau à l'endroit souhaité de la zone de prélèvement. Approximativement 3 kg de sédiment provenant des 15 à 25 premiers centimètres ont été prélevés sur chacun des sites. Les sédiments ont été débarrassés des éléments grossiers (cailloux, débris végétaux, invertébrés) sur le terrain et conditionnés dans des barquettes en polypropylène, puis transportés dans des glacières jusqu'au laboratoire. Ils ont ensuite été homogénéisés, tamisés à 4 mm puis conditionnés et stockés à -20°C.

2.2.2 PRESENTATION DES SEDIMENTS COLLECTES

Le tableau 2 résume l'ensemble des matrices sédimentaires qui a été testé à l'aide des différents bioessais. Ces matrices ont été prélevées lors de 3 campagnes de prélèvement distinctes. Seule la campagne d'octobre 2013 n'a pas fait l'objet d'un suivi analytique. Les analyses réalisées sont présentées dans le chapitre suivant (cf. 2.2.3).

Tableau 2 : sédiments collectés lors des campagnes de prélèvement de 2013, 2014 et 2015

Nom du site	ID	Commune	Description du site	Période de prélèvement	Analyses
Bolbec_Piscine_1 (aval du site)	Bol_Pi_1	Bolbec (76)	Industrie pharmaceutique	Octobre 2013	Non
Bolbec_Usine (rejet)	Bol_Usine	Bolbec (76)	Industrie pharmaceutique	Octobre 2013	Non
Beuvry-la-forêt (amont)	BF_Amont	Beuvry-la-forêt (59)	Industrie pharmaceutique	Octobre 2013	Non
Beuvry-la-forêt (aval)	BF_Aval	Beuvry-la-forêt (59)	Industrie pharmaceutique	Octobre 2013	Non
Cressonnière Houdancourt (point 1)	Houd_1	Houdancourt (60)	Site « référence »	Octobre 2013	Non
Cressonnière Vallon du Vivier	VdV	Tancarville (76)	Site « référence »	Septembre 2014	Oui
Cressonnière Houdancourt (point 2)	Houd_2	Houdancourt (60)	Site « référence »	Septembre 2014	Oui
Rivière des Evoisson	RivEv	Bergicourt (80)	Site « DCE »	Septembre 2014	Oui
Sainte Gertrude	StGert	Caudebec-en-Caux (76)	Site « DCE »	Septembre 2014	Oui
Bolbec_Piscine_2 (aval du site)	Bol_Pi_2	Bolbec (76)	Industrie pharmaceutique	Septembre 2014	Oui
La Rhonelle	Rohnelle	Artes (59)	Activités urbaine et agricole	Septembre 2014	Oui
Metaleurop	ME	Evin Malmaison (59)	Site industriel : Métallurgie	Juin 2015	Oui
Rigole du Flot de Wingles (aval de l'ancienne blanchisserie)	FdW	Don (59)	Site industriel : blanchisserie	Juin 2015	Oui
Lac du parc du Héron	Heron	Villeneuve d'Ascq (59)	Bassin de décantation des eaux pluviales	Juin 2015	Oui
La Marque amont (amont de la STEP)	LM_Amont	Villeneuve d'Ascq (59)	Rivière zone périurbaine	Juin 2015	Oui
La marque aval (aval de la STEP)	LM_Aval	Villeneuve d'Ascq (59)	Rivière zone périurbaine	Juin 2015	Oui
Oise – (rejet Oléon)	Oleon_Rej	Compiègne (60)	Site industriel : Bioraffinerie	Juin 2015	Oui

Les sites de collecte ont été déterminés afin de disposer de matrices sédimentaires représentatives à la fois de sédiments pouvant être considérés comme « témoin » mais aussi de sédiments potentiellement contaminés. Ainsi, les sédiments provenant des sites de Tancarville, Houdancourt, Bergicourt et Caudebec-en-Caux ont tous été prélevés à l'écart de zones fortement anthropisées. Les sédiments provenant du site de Bolbec [piscine] ont quant à eux été prélevés en aval (environ 1,5 km) d'un cours d'eau soumis à une pression industrielle (résidus issus d'une industrie de production de matières premières pharmaceutiques). Le site d'Artes [la Rhonelle] est soumis à une activité urbaine importante et une activité agricole intensive. Ce cours d'eau a été précédemment

étudié et considéré comme « site contaminé » par différents auteurs (Sanchez *et al.*, 2007, 2008a, b; Kinani *et al.*, 2010; Creusot *et al.*, 2013 ; Santos *et al.* 2014). Les sites d'Evin-Malmaison [Metaleurop] et de Don [Rigole du Flot de Wingles] sont deux sites ayant subi une pression industrielle impliquant des contaminations métalliques importantes. Le premier se situe aux environs proches de l'ancienne usine métallurgique de Metaleurop (dans le Marais d'Evin à proximité du crassier n°113). Cette zone est historiquement connue pour sa contamination en élément métallique (Cd, Pb, Zn, plus particulièrement). Au niveau du site de Don, les prélèvements ont été réalisés juste en amont d'une ancienne blanchisserie industrielle. Les sédiments des sites de la ville de Villeneuve d'Ascq correspondent d'une part, à des prélèvements réalisés sur la Rivière « La Marque », en amont puis en aval de la station d'épuration traitant les eaux usées de la ville ; et d'autre part, à des prélèvements réalisés au niveau du « Lac du Héron » qui constitue l'un des bassins de rétention et décantation des eaux pluviales de Villeneuve d'Ascq et ses alentours. Enfin le sédiment du site de Compiègne a été collecté sur les bords de l'Oise à proximité immédiate du rejet d'une bioraffinerie.

2.2.3 CARACTERISATION DES MATRICES SEDIMENTAIRES

La granulométrie, la composition géochimique et les teneurs en éléments majeurs et contaminants potentiels des sédiments collectés lors des campagnes de prélèvement de 2014 et 2015 ont été déterminées. Les analyses ont été effectuées par le laboratoire d'analyse des sols de l'INRA d'Arras (LAS) et sont résumées dans le tableau 3.

Tableau 3 : analyses effectuées sur les sédiments des campagnes de prélèvement de 2014 et 2015

Analyse	Méthode suivie
Granulométrie 5 fractions sans décarbonatation	NF X 31-107
Carbone total	NF ISO 10694
Carbone organique	NF ISO 10694
Matière organique	NF ISO 10694
Azote total	NF ISO 13878
Azote nitrique (N de NO ₃ ⁻)	méthode INRA
Azote ammoniacal (N de NH ₄ ⁺)	méthode INRA
Silicium (Si) total après fusion alcaline (ICP-AES)	NF ISO 22036
Eléments totaux : Al, Ca, Fe, K, Mg, Mn, Na, P205 (ICP-AES)	NF ISO 22036
Eléments traces totaux : Co, Cr, Cu, Ni, Zn (ICP-AES)	NF ISO 22036
Eléments traces totaux : Pb, Cd, Tl, Mo (ICP-MS)	NF EN ISO 17294-2
Arsenic (As) total (ICP-MS)	Méthode INRA
16 HAP (naphtalène, acénaphène, fluorène, phénanthrène, anthracène, fluoranthène, pyrène, benzo(a)anthracène, chrysène, benzo(b)fluoranthène, benzo(k)fluoranthène, benzo(a)pyrène, dibenzo(ah)anthracène, benzo(ghi)pérylène, indéno(123,cd)pyrène, acénaphtylène)	XP X 33-012

2.2.4 TRAITEMENT PREALABLE A LA REALISATION DES ESSAIS D'ECOTOXICITE

Les sédiments prélevés ont été congelés et conservés à -20°C 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.

3. CARACTERISATION DES SEDIMENTS COLLECTES

Le détail des résultats des analyses effectuées est disponible dans les annexes 6 à 10 du présent rapport. Afin de caractériser et décrire les sédiments en fonction de leurs propriétés géochimiques, de leur teneur en éléments majeurs et de leur contamination (métaux et HAP), plusieurs analyses en composantes principales (ACP) ont été réalisées.

3.1 GRANULOMETRIE ET PARAMETRES GEOCHIMIQUES

L'ACP réalisée sur les résultats des analyses granulométriques et des paramètres géochimiques (figure 1) permet à l'aide des deux premières composantes (composante F1 [65,5%] et composante F2 [22,5%]) d'identifier les sédiments similaires en ce qui concerne leur texture. Ainsi il est possible de regrouper ensemble les sédiments principalement sableux : *i.e* Bol_Pi_2, Rhonelle, Houd_2, Oleon_Rej, LM_Amont, StGert et VdV. Parmi ces sédiments, deux sous groupes se distinguent : les sédiments présentant une fraction importante de sables grossiers (Houd_2, Rhonelle et Bol_Pi_2) et ceux présentant une fraction plus importante de sable fin (LM_ament, StGert et VdV). Ces trois derniers sédiments ainsi que le sédiment Oleon_Rej se distinguent également par leurs teneurs en matière organique, carbone total et azote total moins importante en comparaison des autres sédiments. A l'opposé de ces sédiments sableux, les sédiments RivEv, FdW et Héron sont marqués par une importante fraction limoneuse et/ou argileuse dans leur composition granulométrique. Ces sédiments sont également caractérisés par des teneurs en matière organique et azote total plus importante. Enfin, les sédiments ME et LM_Aval apparaissent plus équilibrés.

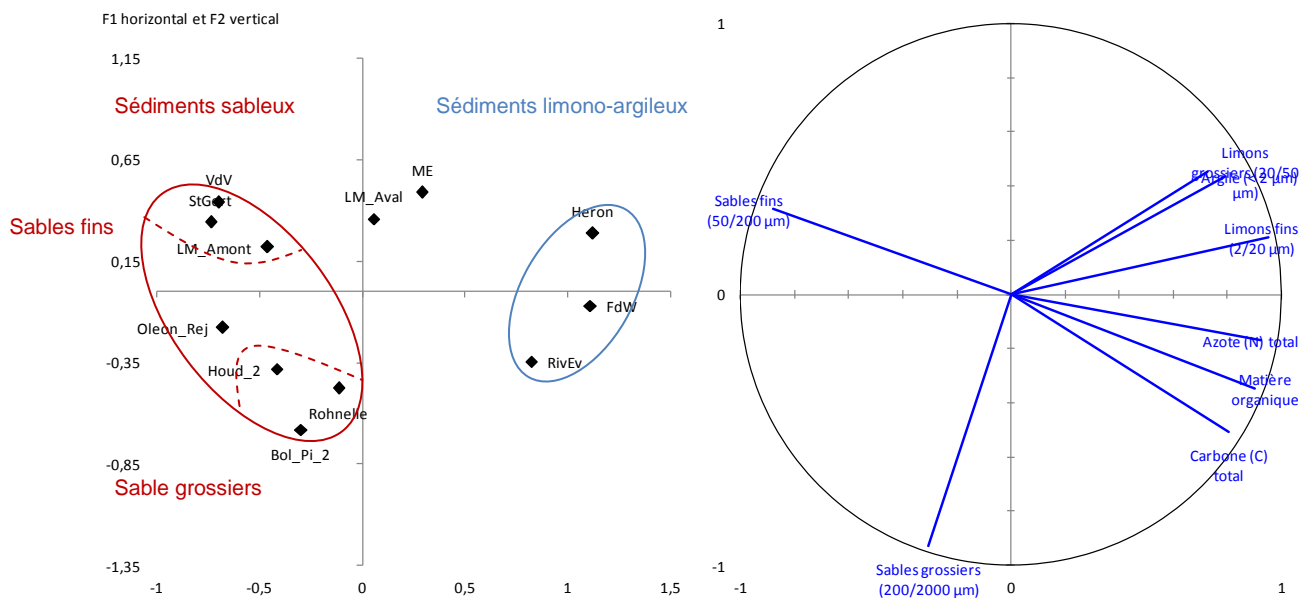


Figure 1 : Représentation des deux premières composantes de l'ACP réalisée sur les résultats de l'analyse granulométrique des sédiments collectés lors des campagnes de prélèvements de 2014 et 2015. A gauche, graphique des individus et à droite, cercle de corrélation des variables. Eigen values : F1 = 65,5% ; F2 = 22,5%. Voir le tableau 2 pour la signification des abréviations.

3.2 CONTAMINATION DES SEDIMENTS

La figure 2 présente les résultats de l'ACP effectuée sur les sédiments en considérant comme variables les teneurs en éléments métalliques, en éléments majeurs, ainsi que les teneurs en HAP. Les variables géochimiques sont également représentées en tant que variables supplémentaires (en rouge sur le graphique des variables) et n'entrent pas directement dans l'analyse.

Sur le premier plan factoriel (composante F1 = teneur en métaux et éléments majeurs; composante F2 = type d'élément), il est possible de distinguer 2 groupes de sédiments. Un premier groupe composé des sédiments LM_Aval, FdW, Bol_Pi_2, Rhonelle et Heron, répartie sur la droite du graphique se caractérise par des sédiments ayant des teneurs en éléments métalliques plus importantes en comparaison avec les sédiments VdV, StGert, RivEv, Houd_2 et Oleon_Rej. Ces derniers, très rapprochés dans l'espace, sont similaires en termes de contamination métallique et se caractérisent par des teneurs faibles aux regards des autres sédiments. A l'exception du sédiment Oleon_Rej ; prélevé au niveau du rejet d'une bioraffinerie, ces sédiments correspondent aux sédiments prélevés à l'écart de zones fortement anthropisées et potentiellement non contaminés. Enfin, toujours sur ce premier plan factoriel, il est à noter la spécificité du sédiment ME qui se distingue des autres sédiments par ses teneurs très élevées en Cd (entre 4 et 40 fois plus élevées en comparaison avec les autres sédiments) et Pb (entre 5 et 60 fois plus élevés en comparaison avec les autres sédiments).

L'analyse du second plan factoriel (Composante F1 et F3) (figure 2, B.) permet de mieux représenter la contamination en HAP. Les sédiments Bol_Pi_2, LM_aval et Rhonelle se distinguent en effet des autres sédiments par leurs teneurs en HAP plus importantes (représentée ici par la somme des 16 HAP mesurés). Ce deuxième plan factoriel permet également de confirmer le regroupement des sédiments ME, Heron et FdW.

Enfin l'analyse du troisième plan factoriel montre une fois de plus la spécificité du sédiment ME, mais aussi celle du sédiment Rhonelle qui, sur ce plan, se distingue par ses fortes teneurs en molybdène, manganèse et P₂O₅.

Tableau 4 : Synthèse des caractéristiques des sédiments collectés.

ID	Texture et propriétés géochimiques	Contamination au regard des analyses
Houd_2	Sableux / faible teneur en MO	Non contaminé (Métaux et HAP)
VdV	Sableux / faible teneur en MO	
StGert	Sableux / faible teneur en MO	
RivEv	Limoneux / forte teneur en MO	
LM_amont	Sableux	
ME	Limoneux et argileux	Dominance Métallique
Heron	Limoneux et argileux	
Bol_Pi_2	Sableux	Dominance HAP
LM_Aval	Sableux et limoneux	Mixte Métaux/HAP
Rhonelle	Sableux	
FdW	Limoneux et argileux	

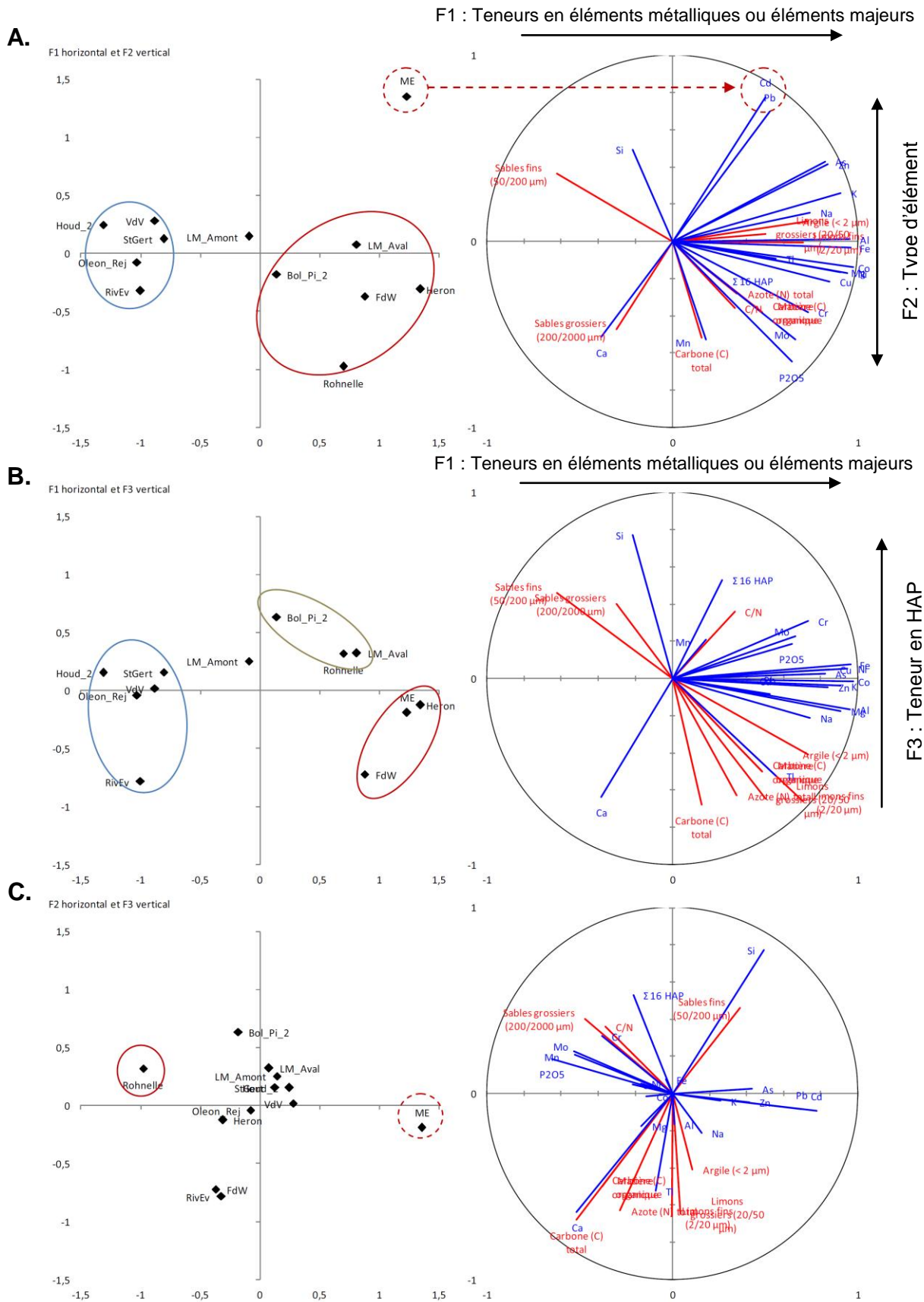


Figure 2 : Analyse en composantes principales des sédiments en fonction de leur concentration en métaux totaux, éléments majeurs et HAP. (A.) plan factoriel F1 et F2; (B.) Plan factoriel F1 et F3; (C.) Plan factoriel F2 et F3]. Eigen values : F1=52% ; F2=17% ; F3=10%. Voir le tableau 2 pour la signification des abréviations

4. CARACTERISATION DE L'ECOTOXICITE DES SEDIMENTS

Les sédiments collectés lors des différentes campagnes de prélèvement ont été testés à l'aide de l'ensemble des bioessais présentés dans le paragraphe 2.1. Les effets observés sont exprimés par rapport au sédiment artificiel de référence correspondant. L'ensemble des données brutes est présenté en annexe 11. Les paragraphes suivants abordent dans un premier temps la robustesse et la significativité de la réponse observée pour chacun des bioessais. Dans un second temps, la réponse des organismes exposés aux différents sédiments et la sensibilité des paramètres biologiques suivis sont discutées.

4.1 ROBUSTESSE ET SEUIL DE SIGNIFICATIVITE DES BIOESSAIS APPLIQUES AUX SEDIMENTS NATURELS

4.1.1 ROBUSTESSE DES CRITERES D'EFFETS SUIVIS

L'utilisation de bioessais pour la caractérisation de l'écotoxicité de matrices naturelles sous-entend que le critère d'effet suivi puisse être suffisamment sensible et spécifique pour répondre à une contamination potentielle, mais aussi suffisamment robuste afin de ne pas être influencé par les propriétés physico-chimiques souvent hétérogènes pour ce type de matrice. La figure 3 présente la variabilité des réponses observées pour chacun des organismes exposés aux sédiments considérés comme non contaminés au regard de la zone de collecte et des résultats analytiques. En l'absence d'une contamination, la réponse des bioessais est apparue variable d'un sédiment à l'autre ainsi que d'un critère à l'autre. C'est particulièrement le cas pour l'essai d'inhibition de la déshydrogénase chez *A. globiformis* ou encore l'inhibition de la reproduction du nématode.

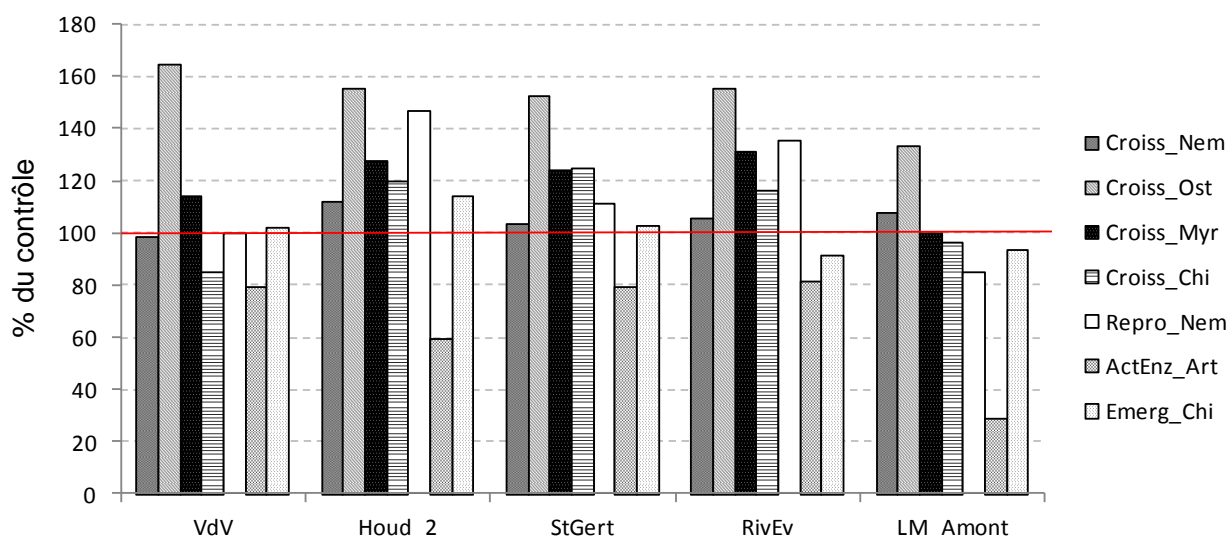


Figure 3 : Variations de l'effet observées (par rapport au sédiment artificiel de référence) après exposition aux différents sédiments naturels provenant des sites non contaminés. Voir tableau 2 pour la signification des abréviations.

La robustesse des critères d'effet suivis a été renseignée pour chacun des bioessais étudiés. Le coefficient de variation calculé à partir des résultats obtenus après exposition aux sédiments considérés comme « non contaminés » permet de renseigner sur la robustesse du critère suivi en intégrant la variabilité inhérente à la matrice. Ainsi, les coefficients de variations « sédiment » (CVs) pour chacun des critères ont été calculés en considérant les résultats obtenus sur les sédiments VdV, StGert, RivEv, Houd_2 et LM_Amont (tableau 5 et tableau 6).

Les CVs calculés pour chacun des critères d'effet sont relativement faibles en ce qui concerne la croissance des nématodes, la croissance de l'ostracode, la croissance du myriophylle, ainsi que la croissance et l'émergence des larves de chironome (CVs [%] de 7,1% ; 13,7% ; 13,7% ; 14,2% et 14,9% ; respectivement). Ce constat indique que pour ces critères, la réponse est peu influencée par les propriétés physico-chimiques des sédiments testés. En revanche, concernant la reproduction du nématode et l'inhibition de l'activité déshydrogénase des bactéries, les coefficients de variations calculés (45% et 42,2%, respectivement) indiquent une forte variabilité de ces critères. Höss et al. (2010) font des constats similaires et rapportent des coefficients de variations relativement proches de ceux calculés ici (CVs calculés sur la réponse des organismes exposés à 9 sédiments considérés comme faiblement contaminés). D'autre part, les résultats obtenus sur la croissance du nématode sont également en accord avec ceux publiés par Höss et al. (2009) qui avaient calculé un coefficient de variation (CVs) de 10,1% à partir des résultats obtenus sur 26 sédiments faiblement contaminés. Enfin, concernant la croissance du chironome, le coefficient de variation calculé ici est à mettre en regard de celui proposé par Reynoldson et al. (2002). Ces auteurs rapportent un coefficient de variation de 16,9% à partir de résultats de croissance obtenus sur 105 sédiments considérés comme non contaminés.

Sur la base des coefficients de variation calculés ici, il est possible de classer la robustesse des critères d'effets suivis de la façon suivante :

Robustesse du critère d'effet		
-		+
→		
Faible	Moyenne	Importante
CVs(%) > 20%	20% > CVs(%) > 10%	CVs(%) < 10%
Survie des Ostracodes	Croissance des Ostracodes	
Inhibition enzymatique chez Arthrobacter	Croissance des Chironomes	Croissance des Nématodes
Reproduction des Nématodes	Emergence des Chironomes	Survie des Chironomes
	Croissance des Myriophylles	

4.1.2 VALEURS LIMITES DE TOXICITE

La caractérisation de l'écotoxicité des matrices sédimentaires nécessite de disposer de valeurs spécifiques à chaque bioessai. Ces valeurs fixent la limite entre l'état de « référence », soit la variabilité liée aux propriétés physico-chimiques des sédiments et l'apparition d'un effet toxique lié à la présence de contaminants (Hunt et al. 2001 ; Reynoldson et al. 2002 ; Thursby et al. 1997). Cette limite de toxicité peut être définie en considérant le coefficient de variation sédiment (CVs) calculé précédemment qui prend en compte à la fois la variabilité biologique du critère suivi, mais aussi la variabilité entraînée par les propriétés intrinsèques des sédiments. D'autre part, Höss et al. (2010) et Feiler et al. (2013) propose le calcul d'un indice complémentaire nommé « IMT » (Inhibition Maximale Tolérable). Cet indice correspond à la somme de la valeur moyenne d'inhibition

calculée sur l'ensemble des sédiments non contaminés et de son écart type. La valeur limite de toxicité étant définie par la suite sur la base de la valeur la plus importante des deux indices calculés. Les tableaux 5 et 6 reprennent ces coefficients/indices et présentent les valeurs limites de toxicité définies dans ce contexte.

Les valeurs limites calculées s'échelonnent de >20% à >60%. Ces valeurs, calculées sur 5 sédiments, sont en accord avec les seuils proposés dans la littérature (Höss et al. 2010). D'autre part, la valeur limite de toxicité calculée pour l'inhibition de l'activité déshydrogénase d'*A. globiformis* exposé à différentes matrices artificielles (sables et sédiments artificiels [voir rapport précédent : DRC-15-136875-04705A]) était de 41% et confirme la valeur calculée ici en considérant les sédiments naturels non contaminés. De la même façon, la valeur limite de toxicité calculée pour la reproduction des nématodes (>50%) est identique à celle proposée par Höss et al. (2010) et se trouve être du même ordre de grandeur que celles proposées pour les invertébrés des sols pour le même critère d'effet (> 50%) (NF ISO 17616).

Tableau 5 : coefficients de variation et indice de robustesse calculés pour le critère de mortalité chez le nématode, l'ostracode et le chironome.

	Nématode	Ostracode	Diptère
	Survie	Survie	Survie
Valeur relative de la réponse par rapport aux sédiments testés ^a (% du contrôle)			
Minimum	57,9	39,2	93,8
Maximum	105,4	101,7	112,1
Moyenne	95,1	89,8	103,7
Ecart-type	16,9	22,6	7,6
CVs (%)	17,8	25,2	7,4
ITM (%)*	20,9	55,5	3,9
Limites de toxicité (% inhibition par rapport au contrôle)	20%	30%	20%

Tableau 6 : coefficient de variation et indice de robustesse calculés pour les critères d'inhibition de l'activité enzymatique, d'inhibition de la croissance et de la reproduction.

	Bactéries	Plantes	Nématodes	Ostracodes	Diptères		
	Activité enzymatique	Croissance	Croissance	Reproduction	Croissance	Croissance Emergence	
Valeur relative de la réponse par rapport aux sédiments testés (% du contrôle)							
Minimum	29,2	91,4	93,1	15	133,2	85,5	85,7
Maximum	127,0	131,5	112,2	157,2	204,3	124,7	128,6
Moyenne	75,9	113,8	104,3	107,2	159,7	109,9	107,0
Ecart-type	32,0	16,4	7,4	48,2	21,8	15,9	16,0
CVs (%)	42,2	14,4	7,1	45,0	13,7	14,2	14,3
IMT (%)*	56,1	2,6	2,0	38,4	[-28.1]	7,7	9,9
Limites de toxicité (% inhibition par rapport au contrôle)	60%	20%	20%	50%	20%	20%	20%
CVs (%) par Höss et al. (2010)	47,8	13,7	12,1	53,5	n.d	n.d	n.d
IMT (%) par Höss et al. (2010)	61,8	9,3	23,4	49,7	n.d	n.d	n.d
Limites de toxicité par Höss et al. (2010)	60%	20%	25%	50%	n.d	n.d	n.d

4.2 ECOTOXICITE DES SEDIMENTS ET COMPLEMENTARITE DES BIOESSAIS

Le tableau 7 résume les résultats obtenus pour l'ensemble des paramètres biologiques suivis. Les résultats sont exprimés en pourcentage d'effet par rapport à la matrice artificielle de référence correspondante. Une valeur négative correspond à une stimulation du critère d'effet. La significativité des effets mesurés est définie en tenant compte des valeurs limites de toxicité déterminées dans le chapitre précédent (Cf. 4.1.2).

Parmi les dix-sept sédiments testés, onze sédiments ont entraîné un effet toxique sur au moins un des paramètres biologiques suivis. Sur les onze sédiments considérés comme potentiellement contaminés, neuf sédiments ont entraîné un effet toxique sur au moins un des paramètres biologiques et cinq sédiments ont entraîné des effets significatifs sur au moins deux critères. Les sédiments Rhonelle et Bol_Pi_1 n'ont en revanche pas entraîné d'effet significatif au regard des valeurs limites de toxicité.

Sur les six sédiments considérés comme « sédiments contrôles », quatre n'ont entraîné aucun effet significatif, quel que soit le paramètre biologique considéré. En revanche, une augmentation significative de la mortalité a été observée chez les ostracodes exposés au sédiment RivEv et une inhibition significative de l'activité déshydrogénase d'*A. globiformis* a été observée après exposition au sédiment LM_ament.

Le sédiment ME ressort par rapport aux autres sédiments testés. Des effets toxiques significatifs ont été observés sur quatre des dix paramètres biologiques suivis et indiquent une augmentation de la mortalité des nématodes (54% par rapport au témoin), une inhibition de l'activité enzymatique mesurée chez *A. globiformis* (78% par rapport au témoin), ainsi qu'une inhibition de la croissance et de la reproduction du nématode (63% et 96% par rapport au témoin, respectivement). Les sédiments LM_aval, prélevé en aval de la STEP et Oleon_Rej, prélevé au niveau du rejet d'une bioraffinerie, ont quand à eux entraîné des effets toxiques sur trois des paramètres biologiques suivis : mortalité des nématodes ; inhibition de la reproduction des nématodes et inhibition de l'activité déshydrogénase d'*A. globiformis*.

Le suivi de l'inhibition de l'activité déshydrogénase chez *A. globiformis* a montré une sensibilité plus importante par rapport aux autres organismes et aux autres critères biologiques suivis. Sur la base de la valeur limite de toxicité déterminée pour ce critère (60% d'inhibition), dix sédiments ont entraîné un effet inhibiteur significatif. Plus précisément, la majorité des sédiments de référence (exception faite du sédiment LM_Amont) n'ont pas entraîné d'effet inhibiteur significatif. En revanche, à l'exception du sédiment Rhonelle, tous les sédiments potentiellement contaminés ont entraîné une inhibition significative de l'activité déshydrogénase de la bactérie. Ainsi malgré la faible robustesse de ce critère et par conséquent une valeur limite de toxicité élevée, ces résultats montrent que l'essai d'inhibition de l'activité déshydrogénase d'*A. globiformis* est relativement sensible par rapport aux autres essais et permet de discriminer les sédiments non contaminés des sédiments potentiellement contaminés.

De la même façon, plusieurs sédiments parmi les plus contaminés (*i.e* ME, LM_Amont, Oleon_Rej) ont entraîné une augmentation significative de la mortalité des nématodes, ainsi qu'une inhibition significative de leur reproduction. Une fois de plus, aucun sédiment de référence n'a entraîné d'effets significatifs au regard des valeurs limites de toxicité définies pour ces critères.

Concernant la croissance des ostracodes, quel que soit le sédiment testé, aucun effet inhibiteur n'a été observé. Au contraire, la croissance des organismes a été fortement stimulée par rapport aux organismes exposés à la matrice artificielle de référence. Cependant, il est à noter que l'effet stimulant est réduit pour les sédiments identifiés

comme contaminés (*i.e.* ME ; FdW et Héron, notamment) en comparaison avec les sédiments prélevés sur les sites de références. Les résultats obtenus concernant la croissance des chironomes vont dans le même sens. Ces observations mettent en avant les limites de l'utilisation d'un sédiment artificiel de référence dans ce contexte et confirment les remarques déjà mentionnées dans les rapports précédents. Les mêmes conclusions peuvent être formulées pour le critère de croissance des chironomes. Il est, par conséquent, difficile de juger de la sensibilité des ces organismes et critères d'effet sur la base de ces résultats.

Enfin concernant l'essai d'inhibition de la croissance du myriophylle, une stimulation importante de la croissance par rapport au sédiment artificiel de référence est observée quel que soit le sédiment testé. En revanche, contrairement aux essais sur les ostracodes et les chironomes, cette stimulation semble indépendante de l'état de contamination des sédiments testés.

Tableau 7 : Ecotoxicité des sédiments testés en fonction des valeurs limites de toxicité. A titre informatif, les sédiments indiqués sur fond rouge correspondent aux sédiments potentiellement contaminés, ceux sur fond vert aux sédiments non contaminés (métaux et HAP). Les valeurs indiquées en rouge indiquent un effet significatif au regard de la valeur limite de toxicité calculée.

Sédiment	Valeurs limites de toxicité (en %)										Nb. Positifs
	20%	30%	20%	60%	20%	25%	50%	20%	20%	20%	
	Nématode	Ostracode	Diptère	Bactérie	Macrophyte	Nématode	Nématode	Ostracode	Diptère	Diptère	
	Mortalité	Mortalité	Mortalité	Inhib. activité enzymatique	Inhibition croissance	Inhibition croissance	Inhibition reproduction	Inhibition croissance	Inhibition croissance	Inhibition émergence	
Bol_Pi_1*	0%	14%	n.d	32%	-7%	-1,4%	-33%	-68%	n.d	n.d	0
Bol_Usine*	3%	0%	n.d	76%	3%	1,6%	-38%	-48%	n.d	n.d	1
BF_Amont*	8%	5%	n.d	89%	-15%	-10%	-6%	-81%	n.d	n.d	1
BF_Aval*	38%	0%	n.d	99%	-8%	12,2%	26%	-79%	n.d	n.d	2
Houd_1*	0%	0%	n.d	-26%	9%	-12%	-57%	-104%	n.d	n.d	0
VdV	0%	0%	4%	21%	-15%	1%	1%	-65%	14%	-2%	0
Houd_2	0%	8%	0%	41%	-28%	-12%	-47%	-56%	-20%	-14%	0
RivEv	0%	61%	0%	19%	-32%	-6%	-35%	-56%	-16%	9%	1
StGert	0%	4%	0%	21%	-24%	-4%	-11%	-52%	-25%	-3%	0
Bol_Pi_2	0%	9%	0%	62%	-25%	-11%	-46%	-52%	-11%	-9%	1
Rhonelle	8%	0%	0%	39%	-29%	-10%	1%	-44%	-15%	3%	0
ME	54%	0%	12%	78%	-30%	63%	96%	-15%	9%	-33%	4
FdW	5%	0%	7%	67%	-26%	1%	0	-2%	-1%	-33%	1
Heron	16%	58%	19%	70%	-48%	4%	-13%	-15%	-8%	-36%	2
LM_Amont	0%	1%	6%	71%	-42%	-8%	15%	-33%	4%	6%	1
LM_Aval	24%	5%	0%	74%	-58%	6%	63%	-24%	2%	-33%	3
Oleon_Rej	41%	0%	0%	76%	-17%	7%	79%	-19%	-3%	-30%	3
Nb. Positifs	4	2	0	10	0	1	3	0	0	0	

* classement *a priori* sur la base des connaissances du site, aucune analyse n'ayant été réalisée sur les sédiments de cette campagne de prélèvement.

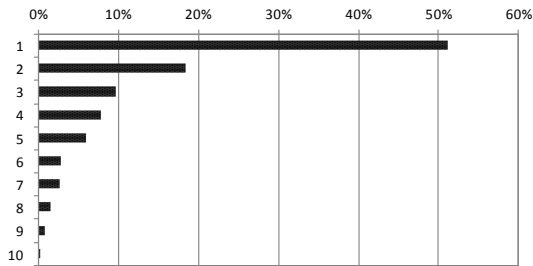
Afin de discuter de l'apport de chacun des bioessais, de la répartition des sédiments en fonction des résultats obtenus et de définir un sous-ensemble de tests ou de critères pertinents pour la caractérisation de l'écotoxicité des sédiments, une ACP normée a été réalisée. Cette ACP considère comme variables les résultats obtenus pour chacun des critères d'effet mesurés (figure 4). La réalisation de l'ACP s'affranchit de la significativité du test et prend en compte l'ensemble des variations observées sur le critère suivi (inhibition et stimulation par rapport au sédiment artificiel de référence). Dans un but explicatif, les variables correspondant à la contamination en métaux, en HAP et aux propriétés physico-chimiques des sédiments sont également présentées en tant que variables complémentaires.

Le résultat de cette ACP montre dans un premier temps que la variation du pourcentage d'effet observé pour la majorité des critères suivis est corrélée positivement avec le premier axe de l'ACP qui représente plus de 50% de la variabilité du jeu de données (le second axe représente 18 % de la variabilité). C'est sur le premier axe que l'on retrouve également, corrélées de façon positive, les teneurs en métaux mesurées dans les sédiments. En revanche, les teneurs en HAP sont très peu représentées sur cette ACP et ne semblent pas être explicatif des variations biologiques observées.

On note une forte corrélation entre les critères : mortalité des nématodes, inhibition de la croissance des nématodes, inhibition de la reproduction des nématodes et inhibition de la croissance des chironomes, tous fortement influencés par les teneurs en Cd, Pb et As dans les sédiments. Ainsi, sur la base de ces résultats, les variations observées dans la réponse de ses 4 critères apporteraient une information redondante. Les variations observées pour l'inhibition de la croissance du myriophylle et la mortalité des ostracodes ne semblent en revanche pas corrélées avec l'axe 1. Enfin la spécificité de l'inhibition de l'émergence des chironomes, corrélée de façon négative avec l'axe 1, serait à mettre en lien avec l'absence de sensibilité de ce critère.

Logiquement les sédiments identifiés comme potentiellement contaminés sont regroupés ensemble (en rouge) sur la carte des individus, de même que les sédiments identifiés comme sédiments non contaminés sont regroupés ensemble (en vert sur le graphique des individus). Cette ACP permet également de faire ressortir le sédiment ME pour lequel les effets sont les plus marqués (inhibition les plus importantes ou stimulation les plus faibles par rapport au sédiment artificiel de référence).

Importance relative des axes factoriels



Effets inhibiteurs



F1 horizontal et F2 vertical

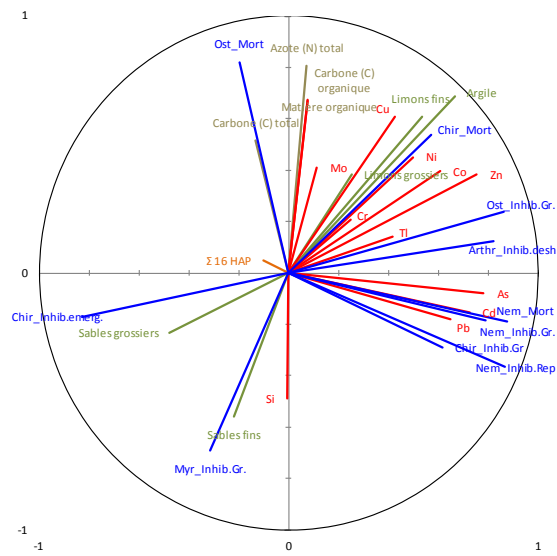
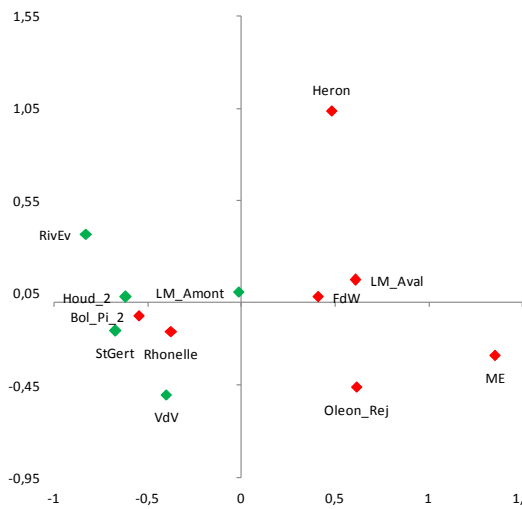


Figure 4 : Représentation des deux premières composantes de l'ACP réalisée sur les résultats obtenus pour chacun des paramètres biologiques suivis. Eigen values : F1=51% ; F2=18%. Voir les tableaux 1 et 2 pour la signification des abréviations.

5. CONCLUSIONS ET RECOMMANDATIONS

Le travail réalisé au cours des 3 années a permis de renseigner sur l'utilisation de nouveaux protocoles d'essai (essais sur *Caenorhabditis elegans* [nématode], *Heterocypris incongruens* [ostracode], *Myriophyllum aquaticum* [macrophyte] et *Arthrobacter globiformis* [bactérie]) pour la caractérisation de l'écotoxicité des sédiments en place. Ce rapport fait suite aux rapports DRC13-136875-13811A et DRC-15-136875-04705A qui reprennent dans le détail la mise en place et la validation de chacun des bioessais étudiés. A l'issue de ce travail, l'écotoxicité de sédiments naturels a ainsi été caractérisée à l'aide de ces outils. Au total, dix-sept sédiments, collectés lors de trois campagnes de prélèvements, ont été testés. A titre de comparaison, l'essai plus commun de mortalité, d'inhibition de la croissance et de l'émergence des chironomes a été également appliqué. Ce travail a permis de renseigner, dans ce contexte, sur la robustesse et la sensibilité de chacun des critères d'effet suivi. Le tableau 8 résume les principales conclusions et recommandations.

Ainsi, l'essai d'inhibition de l'activité déshydrogénase d'*Arthrobacter globiformis* ressort par rapport aux autres bioessais étudiés. Bien que sa robustesse soit faible (CVs > 40%), les résultats obtenus, tenant compte de la valeur limite de toxicité, ont permis de mettre en évidence un effet significatif de la majorité des sédiments contaminés par rapport aux sédiments non contaminés. Il est cependant important de rappeler que l'étape préalable de désactivation des sédiments, indispensable à la réalisation de l'essai, reste à optimiser (voir rapport DRC-15-136875-04705A). L'inefficacité, de cette désactivation pourrait expliquer la variabilité importante observée sur les sédiments non contaminés. L'amélioration de cette étape permettrait par conséquent, d'améliorer la robustesse du test dans ce contexte.

En comparaison, le suivi de l'inhibition de la croissance chez les macrophytes, les ostracodes et les chironomes a permis de mettre en évidence des variations du taux de croissance par rapport au sédiment artificiel de référence. Cependant, aucun effet significatif au regard des valeurs limites de toxicité calculés n'a été observée. Pour ces essais, les matrices artificielles utilisées en tant que sédiment de référence apparaissent, dans ce contexte, peu performantes au regard des taux de croissance observés dans les sédiments naturel, quel que soit le sédiment testé (contaminé ou non). Il apparaît par conséquent nécessaire de définir un sédiment artificiel de référence dont la composition permettrait une croissance optimale des organismes et dans le cas le plus favorable de disposer de sédiments naturel non contaminé ayant des propriétés physico-chimiques proches des sédiments à tester.

L'analyse en composantes principales réalisée montre une bonne corrélation dans la variation des critères d'effet biologiques suivis chez le nématode (mortalité, croissance et reproduction) et du critère de croissance suivi chez le chironome. Compte tenu (i) de l'inadéquation du sédiment artificiel de référence pour les chironomes dans ce contexte et (ii) de la sensibilité plus importante apportée par le critère de reproduction des nématodes, il semblerait judicieux de privilégier ce dernier critère au dépend des autres.

Finalement, sur la base de ce travail, l'essai d'inhibition de la croissance des myriophylles n'apparaît pas pertinent pour la caractérisation de l'écotoxicité des sédiments en place. En revanche, les bioessais sur le nématode (*C. elegans*; paramètre de reproduction notamment) et sur la bactérie (*A. globiformis*; inhibition de l'activité déshydrogénase) peuvent être recommandés dans ce contexte.

Tableau 8 : Résumé des conclusions et recommandations quand à l'utilisation des bioessais pour la caractérisation des sédiments dulçaquicoles

Organismes	Texte normatif	Applicabilité technique ^a	Critère d'effet	Valeur limite de toxicité calculée	Robustesse	Limitations/recommandations
<i>A. globiformis</i> (bactérie)	ISO/FDIS 18187	oui	Inhibition de l'activité déshydrogénase	60%	Faible	Interférence possible avec matrice sédimentaire Etape de désactivation thermique à optimiser
			Survie	20%	Moyenne	-
<i>C. elegans</i> (nématode)	NF ISO 10872	oui	Inhibition de la croissance	25%	Importante	-
			Inhibition de la reproduction	50%	Moyenne	-
<i>M. aquaticum</i> (Macrophyte)	NF ISO 16191	oui	Inhibition de la croissance	20	Moyenne	Faible pertinence du sédiment artificiel dans ce contexte Peu performant au regard des taux de croissance mesuré dans les sédiments naturels non contaminés
			Survie	30%	Faible	-
<i>H. incongruens</i> (Ostracode)	NF ISO 14371	oui	Inhibition de la croissance	20%	Moyenne	Faible pertinence du sédiment artificiel dans ce contexte Peu performant au regard des taux de croissance mesuré dans les sédiments naturels non contaminés
			Survie	20%	Importante	Critère peu sensible
<i>C. riparius</i> (diptère)	NF T90-339-1	oui	Inhibition de la croissance	20%	Moyenne	Faible pertinence du sédiment artificiel dans ce contexte Peu performant au regard des taux de croissance mesuré dans les sédiments naturels non contaminés
			Inhibition de l'émergence	20%	Moyenne	Critère peu sensible

a. Applicabilité technique aux sédiments naturels

6. REFERENCES

- Creusot N**, Budzinski H, Balaguer P, Kinani S, Porcher J-M, Aït-Aïssa S. 2013. Effect-directed analysis of endocrine-disrupting compounds in multi-contaminated sediment: Identification of novel ligands of estrogen and pregnane X receptors. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*. 405:2553-2566.
- 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 water. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 32:144-155
- Feiler U**, Ratte M, Arts G, Bazin C, Brauer F, Casado C, Dören L, Eklund D, Gilberg D, Grote M, Gonsior G, Hafner C, Kopf W, Lemnitzer B, Liedtke A, Matthias U, Okos E, Pandard P, Scheerbaum B, Schmitt-Jansen M, Stewart K, Teodorovic I, Wenzel A, Pluta HJ. 2014. Inter-laboratory trial of a standardized sediment contact test with the aquatic plant *Myriophyllum aquaticum* (ISO 16191). *Environmental Toxicology and Chemistry* 33:662-670
- Höss S**, Ahlf W, Fahnenstich C, Gilberg D, Hollert H, Melbye 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
- Hunt JW**, Anderson BS, Phillips BM, Newman J, Tjeerdema R, Fairey R, Puckett HM, Stephenson M, Smith RW, Wilson CJ, Taberski KM. 2001. Evaluation and use of sediment toxicity sites for statistical comparison in regional assessments. *Environmental Toxicology and Chemistry* 20:1266-1275
- ISO/FDIS 18187**. (2015) Qualité du sol -- Essai de contact des échantillons solides en utilisant l'activité déshydrogénase de *Arthrobacter globiformis*
- Kinani S**, Bouchonnet S, Creusot N, Bourcier S, Balaguer P, Porcher JM, Aït-Aïssa S. 2010. Bioanalytical characterisation of multiple endocrine and dioxin-like activities in sediments from reference and impacted small rivers. *Environmental Pollution* 158:74–83.
- 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 ISO 17616**. (2008) Qualité du sol -- Lignes directrices pour l'évaluation des essais appliqués dans le domaine de la caractérisation écotoxicologique des sols et des matériaux du sol
- NF T90-339-1**. (2010). Qualité de l'eau - Détermination de la toxicité des sédiments d'eau douce vis-à-vis de *Chironomus riparius* - Partie 1 : sédiments naturels
- Reynoldson TB**, Thompson SP, Milani SP. 2002. Integrating multiple toxicological endpoints in a decision-making framework for contaminated sediments. *Human and Toxicological Risk Assessment* 8:1569-1584
- Sanchez W**, Aït-Aïssa S, Palluel O, Ditche JM, Porcher JM. 2007. Preliminary investigation of multi-biomarker responses in three-spined stickleback (*Gasterosteus aculeatus* L.) sampled in contaminated streams. *Ecotoxicology* 16:279–287.
- Sanchez W**, Katsiadaki I, Piccini B, Ditche JM, Porcher JM. 2008b. Biomarker responses in wild three-spined stickleback (*Gasterosteus aculeatus* L.) as a useful tool for freshwater biomonitoring: A multiparametric approach. *Environment International* 34:490–498.

Sanchez W, Piccini B, Ditché J-M, Porcher J-M. 2008a. Assessment of seasonal variability of biomarkers in three-spined stickleback (*Gasterosteus aculeatus* L.) from a low contaminated stream: implication for environmental biomonitoring. *Environment International* 34:791–798.

Santos R, Joyeux A, Palluel O, Palos-Ladeiro M, Besnard A, Blanchard C, Porcher JM, Bony S, Devaux A, Sanchez W. 2014. Characterization of a genotoxicity biomarker in three-spined stickleback (*Gasterosteus aculeatus* L.): biotic variability and integration in a battery of biomarkers for environmental monitoring. *Environmental Toxicology* DOI 10.1002.

Thursby G, Heltshe J, Scott KJ. 1997. Revised Approach to toxicity test acceptance criteria using statistical performance assessment. *Environmental Toxicology and Chemistry* 16:1322-1329

7. LISTE DES TABLEAUX ET DES FIGURES

Repère	Désignation	pages
Tableau 1	Description des organismes et bioessais utilisés	7
Tableau 2	sédiments collectés lors des campagnes de prélèvement de 2013, 2014 et 2015	8
Tableau 3	analyses effectuées sur les sédiments des campagnes de prélèvement de 2014 et 2015	9
Tableau 4	Synthèse des caractéristiques des sédiments collectés	11
Tableau 5	coefficients de variation et indice de robustesse calculés pour le critère de mortalité chez le nématode, l'ostracode et le chironome	15
Tableau 6	coefficient de variation et indice de robustesse calculés pour les critères d'inhibition de l'activité enzymatique, d'inhibition de la croissance et de la reproduction	15
Tableau 7	Ecotoxicité des sédiments testés en fonction des valeurs limites de toxicité	18
Tableau 8	Résumé des conclusions et recommandations quand à l'utilisation des bioessais pour la caractérisation des sédiments dulçaquicoles	22

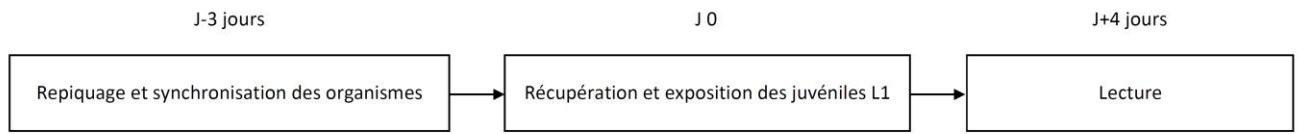
Repère	Désignation	pages
Figure 1	Représentation des deux premières composantes de l'ACP réalisée sur les résultats de l'analyse granulométrique des sédiments collectés lors des campagnes de prélèvements de 2014 et 2015	10
Figure 2	Analyse en composante principale des sédiments en fonction de leur concentration en métaux totaux, éléments majeurs et HAP	12
Figure 3	variations de l'effet observées (par rapport au sédiment artificiel de référence) après exposition aux différents sédiments naturels provenant des sites non contaminés.	13
Figure 4	Analyse en composante principale	20

8. LISTE DES ANNEXES

Repère	Désignation	pages
Annexe 1	Protocole pour la réalisation de l'essai de mortalité et d'inhibition de la croissance et de la reproduction des nématodes (<i>C. elegans</i>)	27
Annexe 2	Protocole pour la réalisation de l'essai de mortalité et d'inhibition de la croissance des ostracodes (<i>H. incongruens</i>)	29
Annexe 3	Protocole pour la réalisation de l'essai d'inhibition de la croissance des macrophytes d'eau douce (<i>M. aquaticum</i>)	31
Annexe 4	Protocoles pour la réalisation de l'essai d'inhibition de l'activité déshydrogénase chez la bactérie (<i>A. globiformis</i>)	33
Annexe 5	Protocoles pour la réalisation de l'essai de mortalité et d'inhibition de la croissance et de l'émergence des larves de diptères (<i>C. riparius</i>)	35
Annexe 6	Résultats de l'analyse granulométrique réalisée sur les sédiments collectés lors des campagnes de 2014 et 2015	37
Annexe 7	Teneur en métaux dans les sédiments collectés lors des campagnes de prélèvements de 2014 et 2015	39
Annexe 8	Teneur en éléments majeurs dans les sédiments collectés lors des campagnes de prélèvements de 2014 et 2015	41
Annexe 9	Teneur en HAP dans les sédiments collectés lors des campagnes de prélèvements de 2014 et 2015	43
Annexe 10	Teneur en matière organique, carbone et azote dans les sédiments collectés lors des campagnes de prélèvement de 2014 et 2015	45
Annexe 11	Effets observés (pourcentage par rapport au sédiment artificiel de référence correspondant) pour chaque paramètre biologique suivi.	47

ANNEXE 1

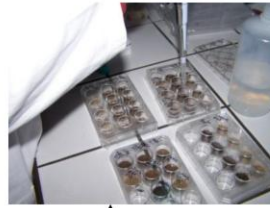
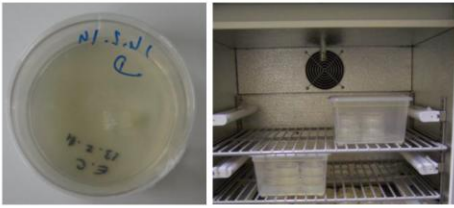
Protocole pour la réalisation de l'essai de mortalité et d'inhibition de la croissance et de la reproduction des nématodes (*C. elegans*)



- Repiquage sur gélose des organismes maintenus au stade « Dauer » ;
- Incubation 20°C, pendant 3 jours

- Rinçage des boîtes de gélose et filtration à 5µm pour la récupération des L1 ;
- Ajout des organismes 10 org./puits (plaques 12 puits)
- Incubation : 20°C / obscurité

- Fixation au rose Bengale
- Passage à 80°C pendant 15 minutes
- Extraction des organismes (centrifugation en présence de Ludox)



- Pré-culture *Escherichia coli* : milieu LB
- Incubation : 37°C ; sous agitation
- Durée : 17h00

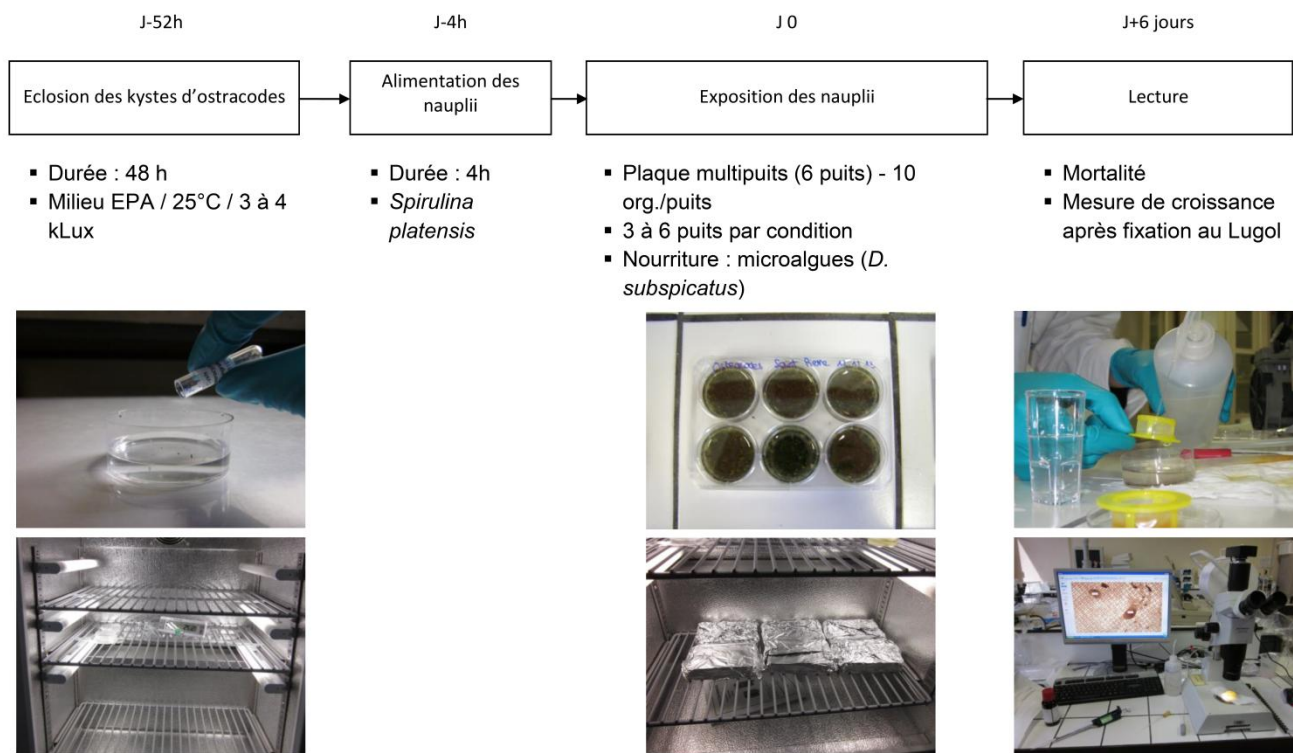
Ajout 0.5 ml de suspension de bactérie *E. coli*

- Mesure de la croissance
- Comptage des J1



ANNEXE 2

Protocole pour la réalisation de l'essai de mortalité et d'inhibition de la croissance
des ostracodes (*H. incongruens*)

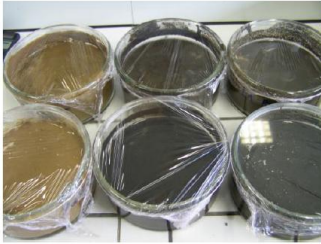


ANNEXE 3

Protocole pour la réalisation de l'essai d'inhibition de la croissance des
macrophytes d'eau douce (*M. aquaticum*)

J -8 à J0

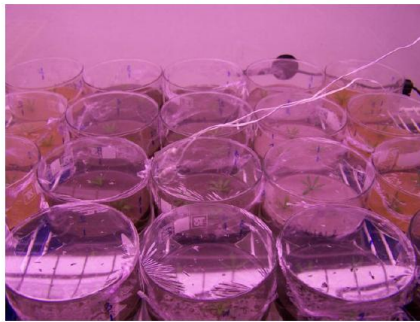
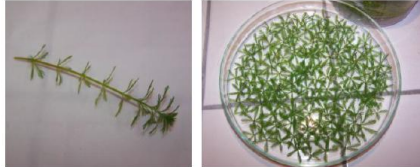
Conditionnement de la matrice artificielle témoin / préparation des sédiments à tester



J0

Collecte des organismes synchrones et exposition des verticilles

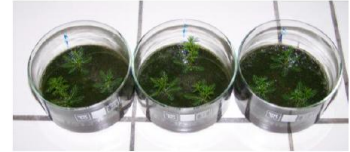
- Collecte des organismes âgés de 21 ± 3 jours ;
- Récupération, pesée et sélection des verticilles ayant une biomasse fraîche de 25 ± 6 mg ;
- Mise en contact avec les sédiments à tester ;
- Exposition en condition contrôlée ($24 \pm 1^\circ\text{C}$; éclairage continu : $60 - 75 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$).



J10

Fin de la phase d'exposition

- Récupération des plantes âgées de 10 jours ;
- Rinçage à l'eau pour éliminer l'excédent de sédiment ;
- Pesée de la biomasse fraîche.



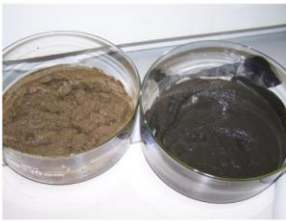
ANNEXE 4

Protocoles pour la réalisation de l'essai d'inhibition de l'activité déshydrogénase
chez la bactérie (*A. globiformis*)

J -1

Conditionnement de la matrice artificielle témoin / préparation des sédiments à tester

- Détermination du taux d'humidité ;
- Détermination du pH ;
- Homogénéisation.



J 0

Répartition dans les plaques (test - plaques A & B)

- Hydratation des substrats (33%) ;
- Ajout de 600 mg de sédiment par puits.

Préparation de l'organisme d'essai

- Reconstitution de la souche lyophilisée par 0,5 mL d'eau stérile glacée et repos pendant 30 minutes à 4°C ± 3°C ;
- Répartition de 0,4 mL de l'inoculum dans les plaques « test » ;
- Répartition de 0,4 mL de milieu d'essai (milieu B) dans les plaques A et B.



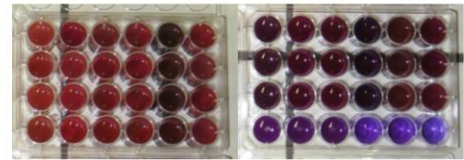
Cycle de désactivation des sédiments

- Chauffage des plaques à 85°C pendant 10 minutes ;
- Refroidissement des plaques sur bain de glace pendant 15 minutes ;

Deux cycles consécutifs sont réalisés.

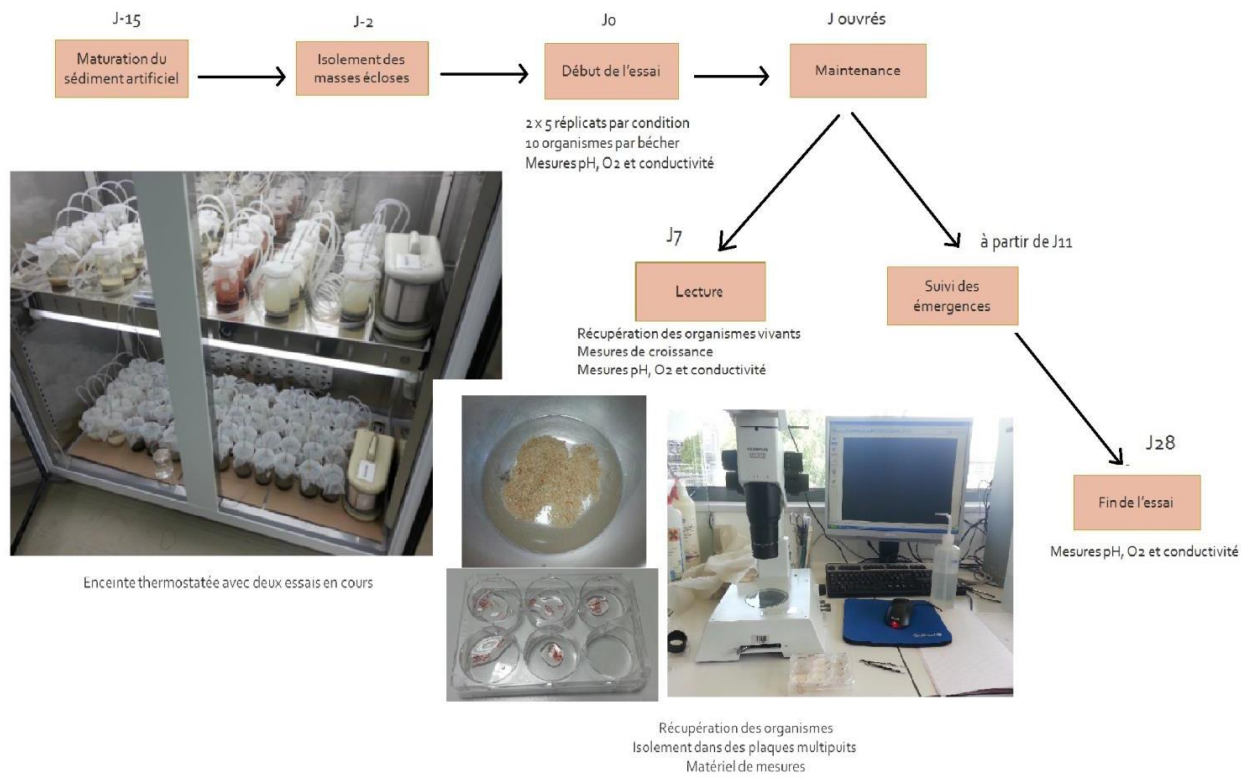
Incubation et lecture de l'activité déshydrogénase

- Incubation des plaques à 30°C pendant 2h ;
- Mesure de la fluorescence à 590 nm (après excitation à 535 nm) toutes les 15 minutes pendant 60 minutes.



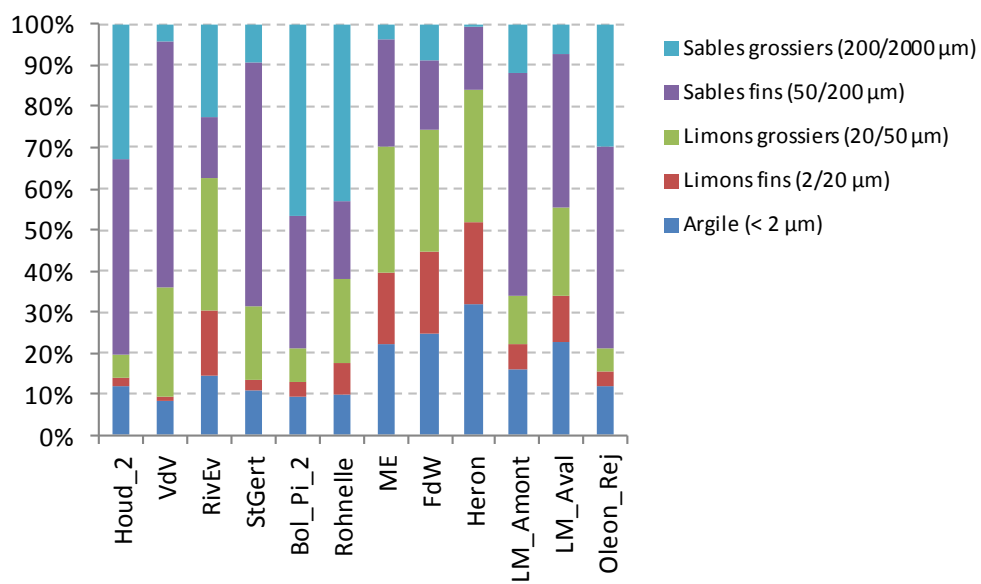
ANNEXE 5

Protocoles pour la réalisation de l'essai de mortalité et d'inhibition de la croissance
et de l'émergence des larves de diptères (*C. riparius*)



ANNEXE 6

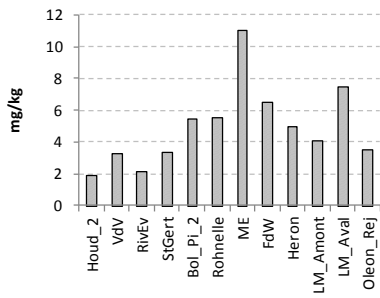
Résultats de l'analyse granulométrique réalisée sur les sédiments collectés lors
des campagnes de prélèvements de 2014 et 2015



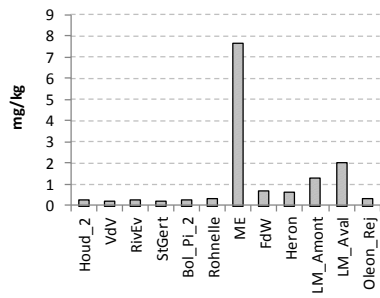
ANNEXE 7

Teneur en métaux dans les sédiments collectés lors des campagnes de
prélèvements de 2014 et 2015

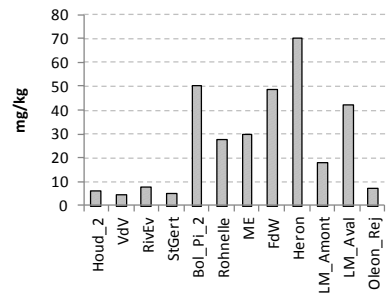
Arsenic (As)



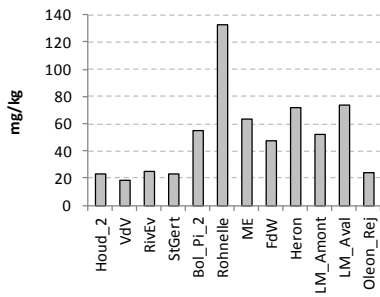
Cadmium (Cd)



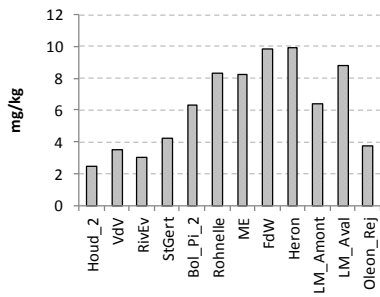
Cuivre (Cu)



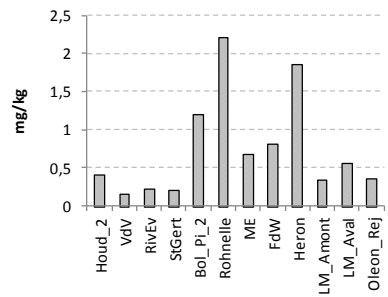
Chrome (Cr)



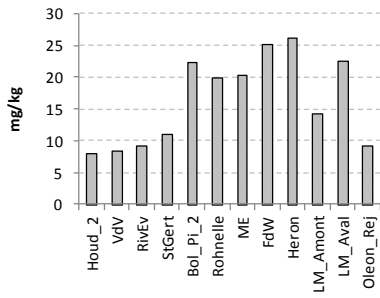
Cobalt (Co)



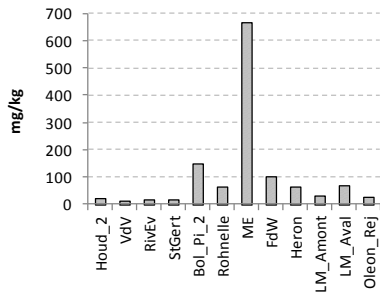
Molybdène (Mo)



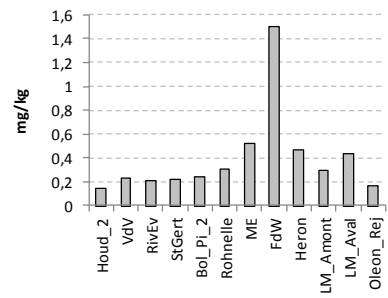
Nickel (Ni)



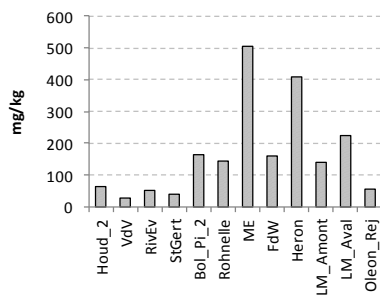
Plomb (Pb)



Thallium (Tl)



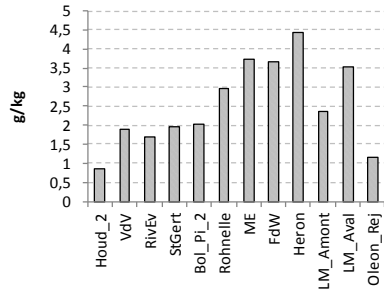
Zinc (Zn)



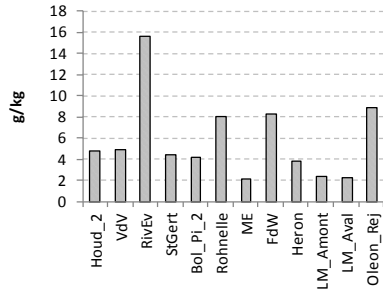
ANNEXE 8

Teneur en éléments majeurs dans les sédiments collectés lors des campagnes de prélèvements de 2014 et 2015

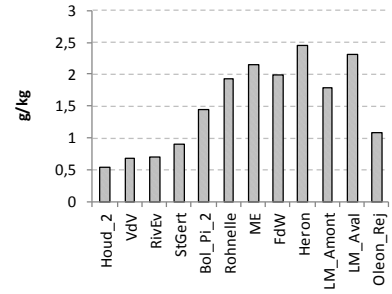
Aluminium (Al)



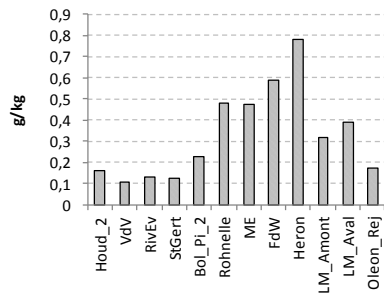
Calcium (Ca)



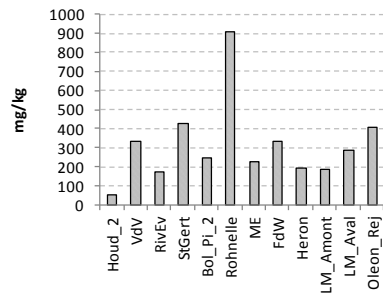
Fer (Fe)



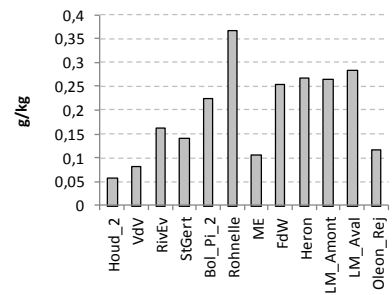
Magnésium (Mg)



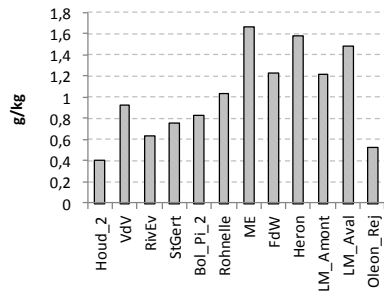
Manganèse (Mn)



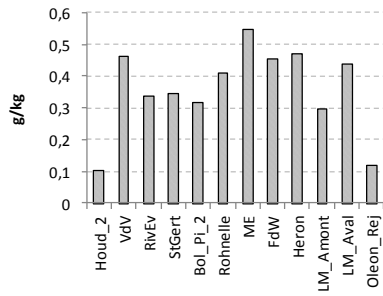
Phosphore (P2O5)



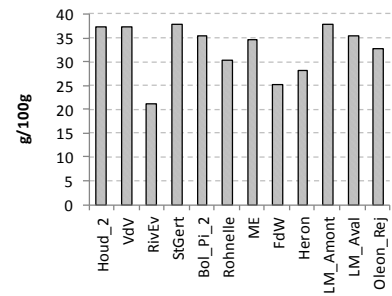
Potassium (K)



Sodium (Na)



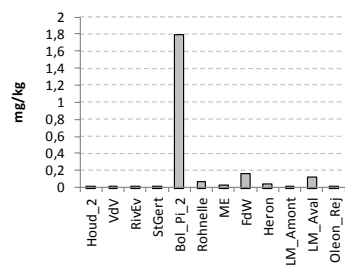
Silicium (Si)



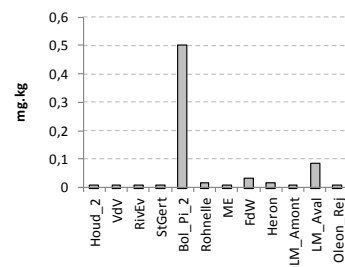
ANNEXE 9

Teneur en HAP dans les sédiments collectés lors des campagnes de
prélèvements de 2014 et 2015

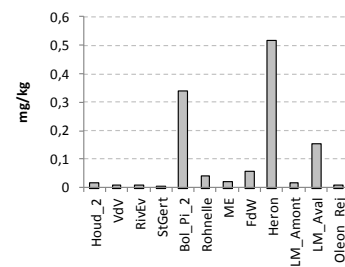
Naphtalène



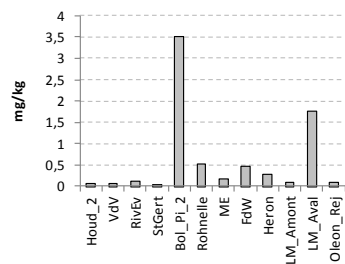
Acénaphthène



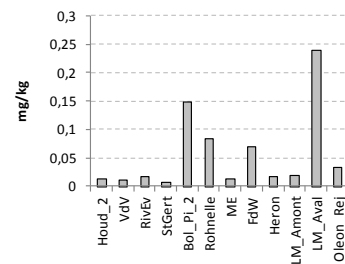
Fluorène



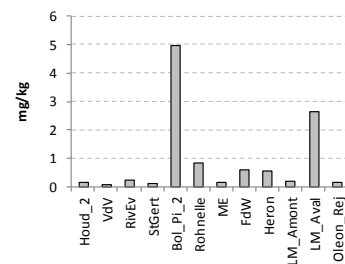
Phénanthrène



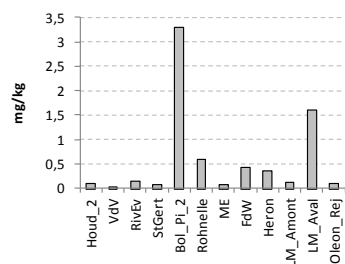
Anthracène



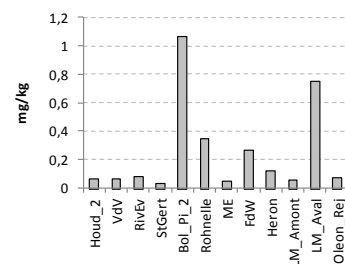
Fluoranthène



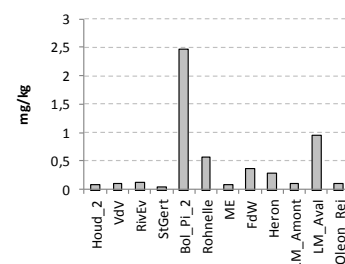
Pyrène



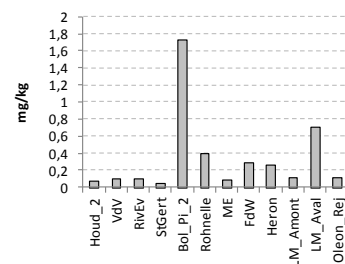
Benzo(a)anthracène



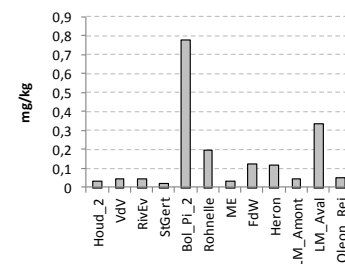
Chrysène



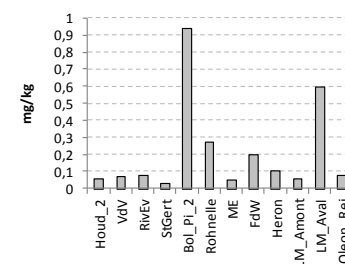
Benzo(b)fluoranthène



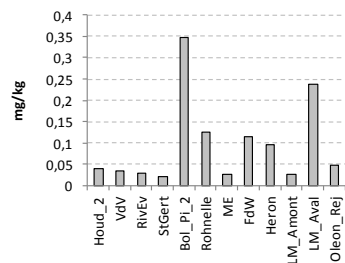
Benzo(k)fluoranthène



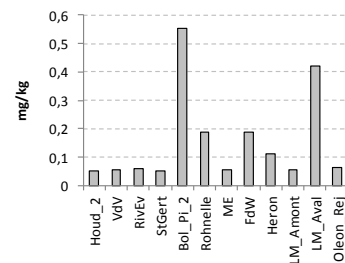
Benzo(a)pyrène



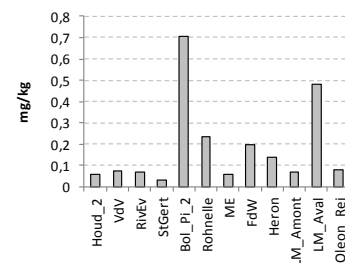
Dibenzo(ah)anthracène



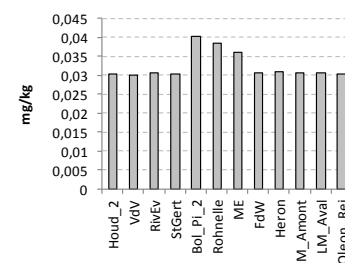
Benzo(ghi)peryène



Indéno(123 cd)pyrène



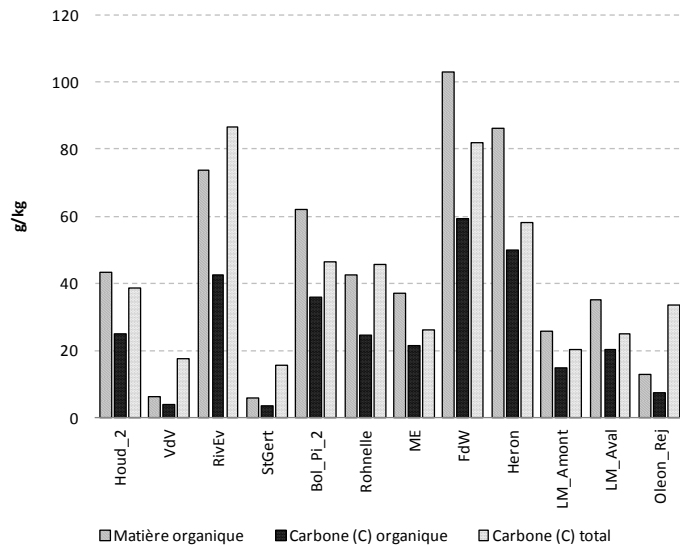
Acénaphthylène



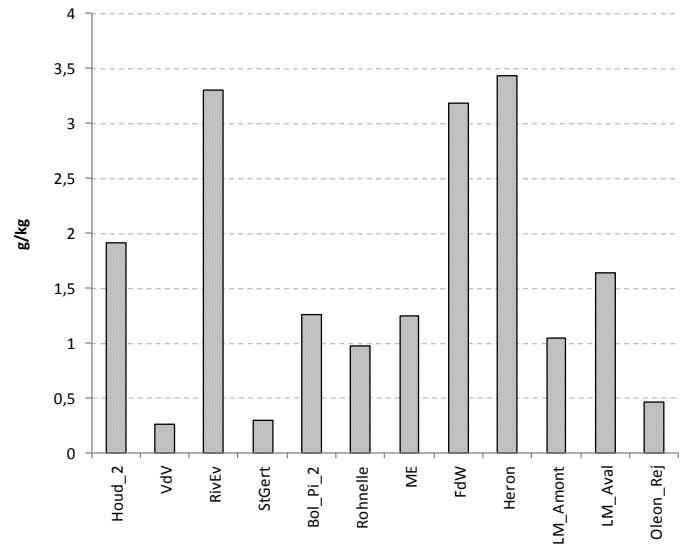
ANNEXE 10

Teneur en matière organique, carbone et azote dans les sédiments collectés lors
des campagnes de prélèvements de 2014 et 2015

Teneur en carbone et matière organique



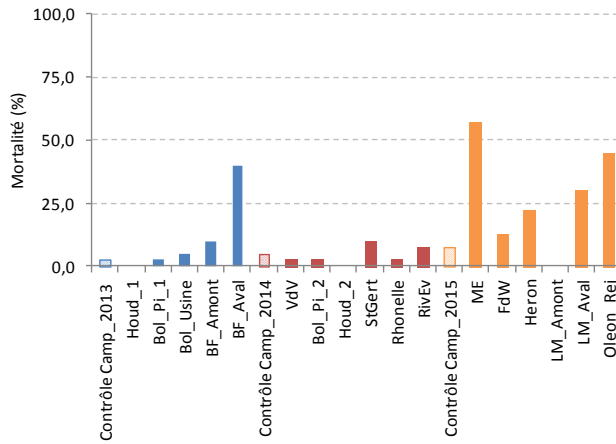
Azote (N) total



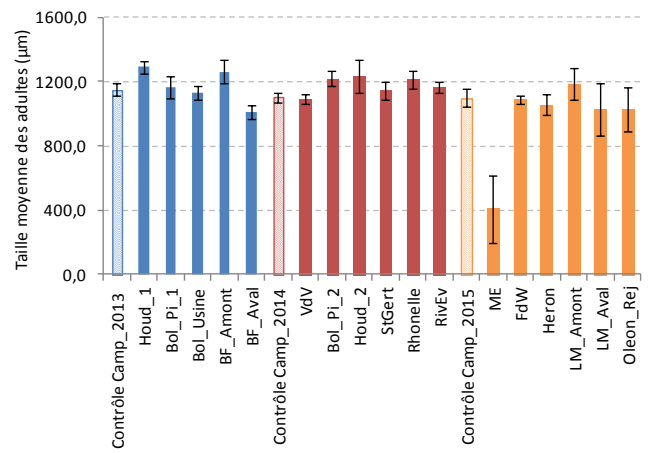
ANNEXE 11

Effets observés (pourcentage par rapport au sédiment artificiel de référence correspondant) pour chaque paramètre biologique suivi

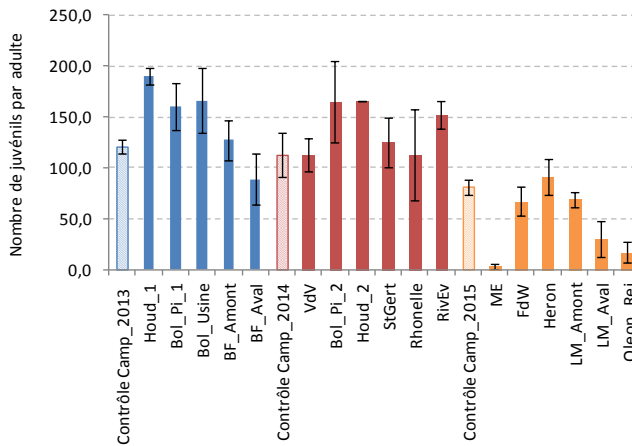
Mortalité des Nématodes



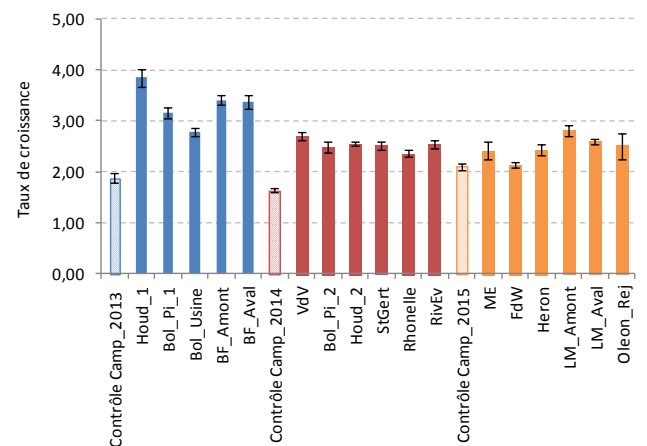
Croissance des nématodes



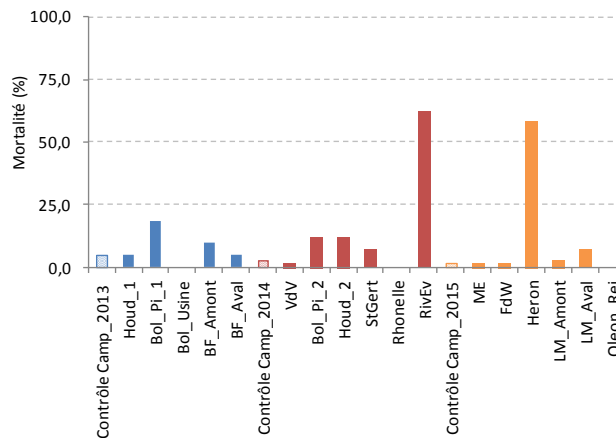
Reproduction des nématodes



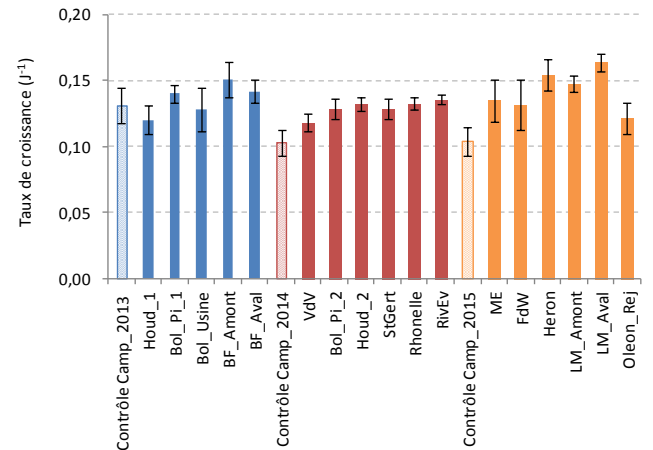
Croissance des Ostracodes



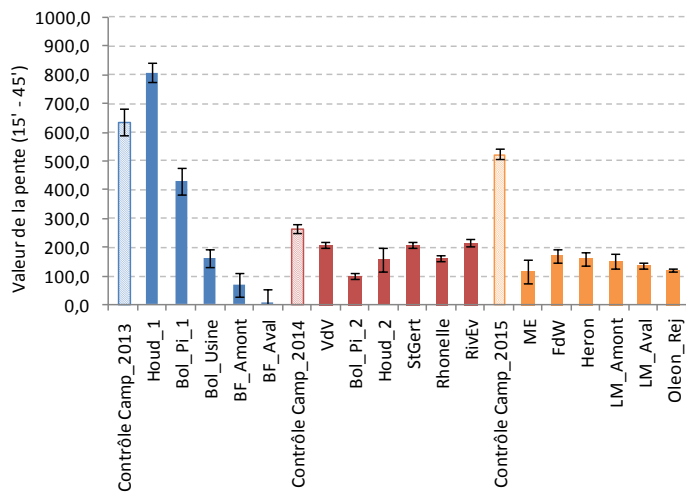
Mortalité des Ostracodes



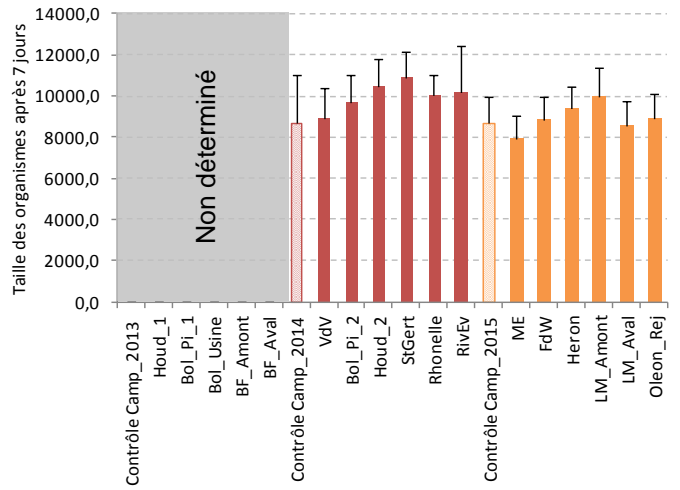
Croissance de Myriophyllum



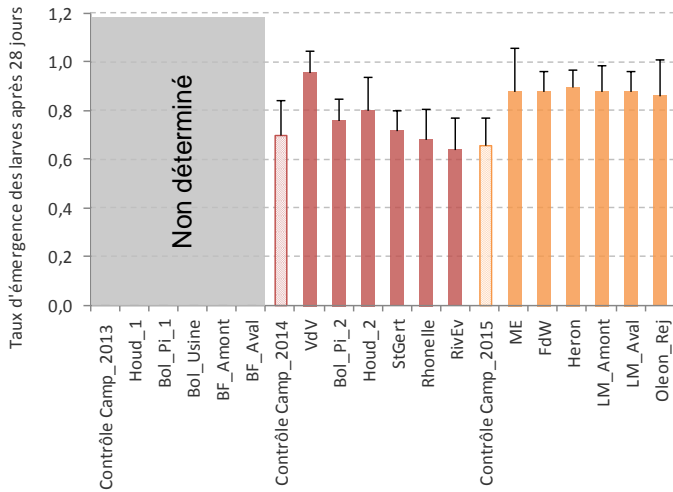
Activité enzymatique chez Arthrobacter



Croissance des Chironomes



Emergence des larves de Chironomes



Mortalité des Chironomes

