



**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 2014**

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 2014. Ineris. 2015, 31p. hal-04008919

**HAL Id: hal-04008919**

**<https://hal.science/hal-04008919>**

Submitted on 28 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.

RAPPORT D'ÉTUDE  
DRC-15-136875-04705A

10/06/2015

**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**

**Avancement des travaux à fin 2014**

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**

**Avancement des travaux à fin 2014**

Liste des personnes ayant participé à l'étude :

Nicolas MANIER, Camille MELINE, Manon THEVENIN, Pascal PANDARD

## PRÉAMBULE

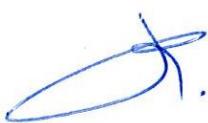
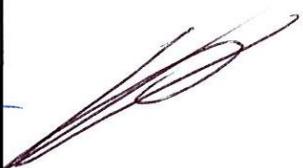
Le présent rapport a été établi sur la base des informations fournies à l'INERIS, des données (scientifiques ou techniques) disponibles et objectives et de la réglementation en vigueur.

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

<b>1.</b>	<b>RAPPEL DES OBJECTIFS</b> .....	<b>4</b>
<b>2.</b>	<b>PRÉSENTATION DES ORGANISMES ET DES PROTOCOLES D'ESSAI</b> .....	<b>6</b>
2.1	Essai d'inhibition de la croissance de <i>Myriophyllum aquaticum</i> .....	6
2.1.1	Description et culture de l'organisme .....	6
2.1.2	Principe de l'essai .....	7
2.1.3	Déroulement de l'essai .....	7
2.2	Essai d'inhibition de l'activité déshydrogénase de la bactérie <i>Arthrobacter globiformis</i> .....	9
2.2.1	Description et conditionnement de la souche bactérienne .....	9
2.2.2	Principe de l'essai .....	9
2.2.3	Déroulement de l'essai .....	10
<b>3.</b>	<b>SUBSTRATS DE RÉFÉRENCE</b> .....	<b>12</b>
<b>4.</b>	<b>SUBSTANCES CHIMIQUES DE RÉFÉRENCE</b> .....	<b>12</b>
<b>5.</b>	<b>SÉDIMENTS</b> .....	<b>13</b>
<b>6.</b>	<b>RÉSULTATS</b> .....	<b>14</b>
6.1	Substrats de référence .....	14
6.2	Substances chimiques de référence .....	16
6.3	Sédiments .....	18
6.4	Questionnement sur la désactivation des sédiments naturels dans le cadre de l'essai d'inhibition de la déshydrogénase chez <i>A. globiformis</i> .....	23
<b>7.</b>	<b>BILAN</b> .....	<b>26</b>
<b>8.</b>	<b>REFERENCES</b> .....	<b>27</b>
	<b>LISTE DES TABLEAUX</b> .....	<b>29</b>
	<b>LISTE DES FIGURES</b> .....	<b>29</b>

# 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).

Bien que récemment standardisés, peu de travaux concernant l'applicabilité effective de ces nouveaux protocoles d'essai pour la caractérisation de l'écotoxicité des sédiments en place sont disponibles.

Le présent projet se propose donc d'appliquer ces nouveaux protocoles dans un contexte de caractérisation de l'écotoxicité des sédiments en place. Les résultats de ce travail permettront de juger de la pertinence et de la sensibilité de ces organismes par rapport aux essais plus classiquement réalisés, tels que les essais sur 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 proposées (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 certains 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 avaient 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*). La sensibilité des organismes vis-à-vis de substances chimiques de référence, la question des substrats proposés en tant que témoins et l'utilisation de ces bioessais pour la caractérisation de l'écotoxicité de sédiments naturels avaient été renseignés.

Ces travaux ont été poursuivis au cours de l'année 2014, en considérant les protocoles pour la réalisation des essais d'inhibition de la croissance de *Myriophyllum aquaticum* et d'inhibition de l'activité déshydrogénase de la bactérie *Arthrobacter globiformis*.

Pour ces deux essais, les travaux engagés ont permis de rendre compte de la réponse et de la sensibilité des organismes :

- à différentes matrices artificielles, potentiellement utilisables en tant que sédiment de contrôle dans les essais.
- à différentes substances chimiques, potentiellement utilisables en tant que substances de références pour évaluer la sensibilité des organismes utilisés et des protocoles d'essai appliqués.

Par ailleurs, les essais sur les sédiments provenant de la campagne de prélèvement de 2013 ont été complétés par les essais sur *Myriophyllum aquaticum* et *Arthrobacter globiformis*. Une nouvelle campagne de prélèvement a été réalisée en 2014 sur certains des sites de la campagne 2013, complétée par de nouveaux sites. L'ensemble des sédiments prélevés a été testé à l'aide des essais sur *Caenorhabditis elegans* (nématode), *Heterocypris incongruens* (ostracode), *Myriophyllum aquaticum* (macrophyte) et *Arthrobacter globiformis* (bactérie).

## 2. PRÉSENTATION DES ORGANISMES ET DES PROTOCOLES D'ESSAI

### 2.1 ESSAI D'INHIBITION DE LA CROISSANCE DE *MYRIOPHYLLUM AQUATICUM*

#### 2.1.1 DESCRIPTION ET CULTURE DE L'ORGANISME

*Myriophyllum aquaticum* (myriophylle du Brésil ou myriophylle aquatique) est une plante dicotylédone aquatique largement répandue dans les milieux d'eau douce (lacs, étangs, cours d'eau à faible débit). Ces macrophytes jouent un rôle structurel et fonctionnel important dans les milieux aquatiques. Elles sont fortement impliquées dans le cycle des éléments nutritifs et la production primaire et fournissent habitat et nourriture à de nombreux autres organismes.

*Myriophyllum aquaticum* possède une partie immergée et une partie émergée (figure 1); elle se fixe sur les sédiments par l'intermédiaire de son système racinaire. La plante se développe en verticilles de 4 à 6 feuilles autour de la tige. Elle est caractérisée par un important potentiel de régénération et une croissance par multiplication végétative (développement d'un individu autonome à partir d'une portion de l'appareil végétatif de la plante mère).

Au laboratoire, les plantes sont cultivées de façon synchrone par repiquage des verticilles ou des têtes provenant de la culture précédente sur un substrat artificiel préalablement reconstitué. Un arrosage à l'aide d'une solution nutritive (solution de Steinberg) est réalisé en moyenne tous les deux jours.

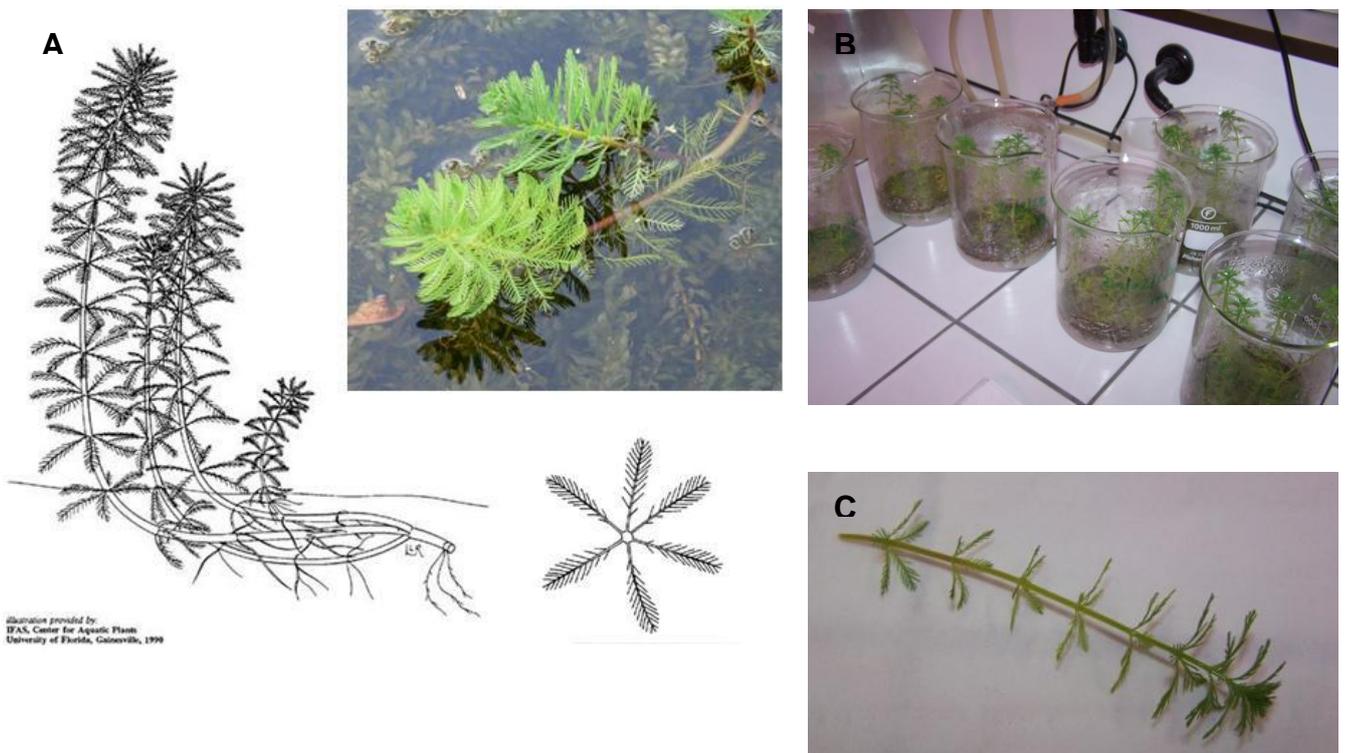


Figure 1 : Illustrations de *Myriophyllum aquaticum* (A), culture de la souche (B) et collecte des tiges pour les essais (C).

### 2.1.2 PRINCIPE DE L'ESSAI

Des verticilles préalablement récoltés d'une culture synchrone sont mis en contact pendant dix jours avec des sédiments naturellement contaminés ou artificiellement enrichis à l'aide de la substance à étudier. L'exposition des verticilles est assurée à la fois par l'eau interstitielle et les particules de sédiment elles-mêmes. A l'issue de cette phase d'exposition, la biomasse fraîche produite est mesurée et le taux de croissance journalier est calculé. Les effets sur sa croissance sont déterminés par comparaison avec les plantes exposées à un sédiment témoin.

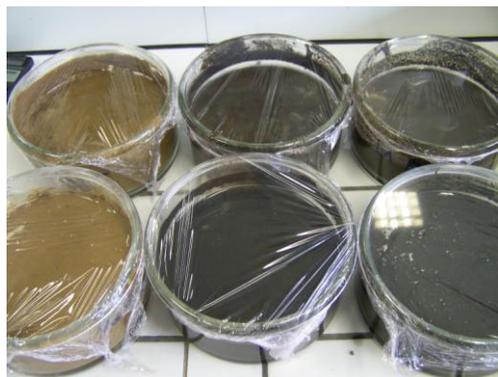
Le protocole pour la réalisation de cet essai a fait l'objet d'une normalisation à l'ISO : « Détermination de l'effet toxique des sédiments sur la croissance de *Myriophyllum aquaticum* » (NF ISO 16191:2014).

### 2.1.3 DEROULEMENT DE L'ESSAI

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

## J -8 à J0

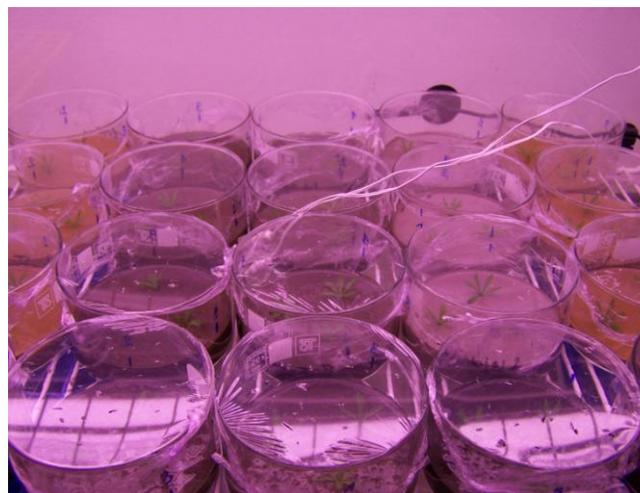
Conditionnement de la matrice artificielle témoin / préparation des sédiments à tester



## J0

Collecte des organismes synchrones et exposition des verticilles

- Collecte des organismes âgés de  $21 \pm 3$  jours ;
- Récupération, pesée et sélection des verticilles ayant une biomasse fraîche de  $25 \pm 6$  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.



Figure 2 : Schéma général du déroulement de l'essai d'inhibition de la croissance de *Myriophyllum aquaticum*.

## 2.2 ESSAI D'INHIBITION DE L'ACTIVITE DESHYDROGENASE DE LA BACTERIE *ARTHROBACTER GLOBIFORMIS*

### 2.2.1 DESCRIPTION ET CONDITIONNEMENT DE LA SOUCHE BACTERIENNE

*Arthrobacter globiformis* (souche ATCC 8010) est une bactérie aérobie chimio-hétérotrophe de la classe des oxydoréductases. Son habitat le plus courant est le sol mais elle est également retrouvée dans les sédiments ainsi que dans les eaux usées.

### 2.2.2 PRINCIPE DE L'ESSAI

L'essai consiste à mesurer de façon indirecte l'activité déshydrogénase de la bactérie *Arthrobacter globiformis* par réduction de résazurine en rézorufine (figure 3). La bactérie *Arthrobacter globiformis* est directement exposée aux sédiments à tester. L'incubation est réalisée à 30°C pendant 2h. A l'issue de cette phase d'exposition de la résazurine est ajoutée puis la formation de rézorufine est suivie par mesure de la fluorescence émise à 590 nm (après excitation à 535 nm) toutes les 15 minutes pendant 1 heure.

L'inhibition de l'activité déshydrogénase est estimée par comparaison des pentes de fluorescence calculées entre 15 et 45 minutes de temps de contact pour le sédiment témoin et les sédiments à tester.

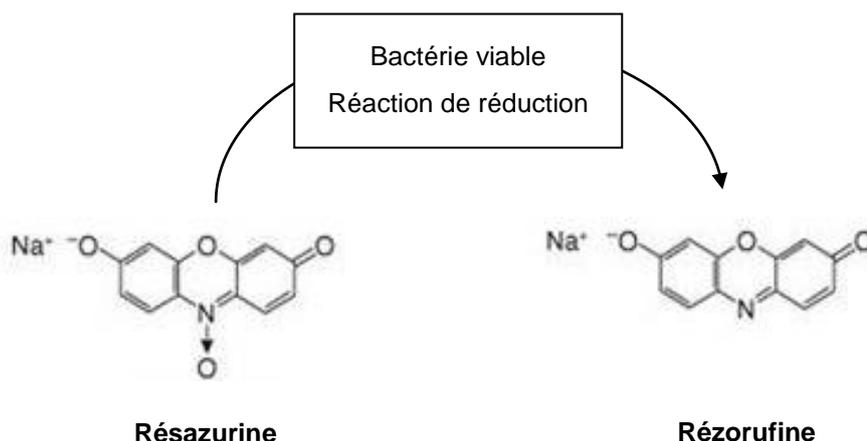


Figure 3 : Schéma de la réaction suivie pour l'essai d'inhibition de l'activité déshydrogénase d'*Arthrobacter globiformis*.

Une étape préalable de désactivation des échantillons à tester est réalisée en effectuant deux cycles « chaud-froid » : 10 minutes à 85°C suivi de 15 minutes dans un bain de glace. Ce traitement thermique est recommandé afin d'éliminer, dans la mesure du possible, l'activité déshydrogénase potentiellement intrinsèque aux échantillons à tester.

Ainsi, le design expérimental comprend en plus des sédiments à tester et du sédiment de contrôle, deux « blanc », dénommés « blanc A » et « blanc B » :

- Le « blanc A », correspondant aux sédiments non ensemencés et ayant subi les cycles thermiques, permet de déterminer l'activité déshydrogénase intrinsèque restante après l'étape de désactivation ;

- Le « blanc B », correspondant aux sédiments non ensemencés et n'ayant pas subi les cycles thermiques de désactivation, permet d'estimer l'activité déshydrogénase intrinsèque aux sédiments à tester.

L'efficacité de l'étape de désactivation est appréciée par la comparaison des blancs A et B. L'activité déshydrogénase résiduelle intrinsèque aux sédiments à tester est soustraite de l'activité mesurée au cours de l'essai avec *Arthrobacter globiformis*.

### 2.2.3 DEROULEMENT DE L'ESSAI

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

**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.

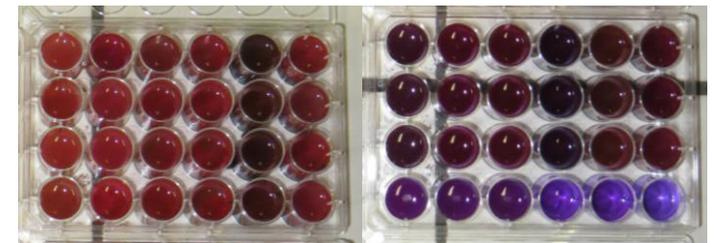


Figure 4 : Schéma général du déroulement de l'essai d'inhibition de l'activité déshydrogénase chez *Arthrobacter globiformis*.

### 3. SUBSTRATS DE RÉFÉRENCE

De la même façon que pour les travaux réalisés en 2013 sur les ostracodes et les nématodes, différents substrats artificiels utilisés en tant que « sédiments » contrôles dans les essais ont été testés. L'objectif étant d'identifier le ou les substrats les plus appropriés pour la réalisation des essais. Le tableau 1 reprend la composition des substrats testés.

Tableau 1 : Substrats artificiels testés

Substrat de référence	Identification/référence normative	Caractéristiques/composition	
<b>Sables</b>	« Sable de rivière »	Sable quartzique : Ø=2mm	
	HN31	Sable quartzique : Ø=0,2 à 0,5 mm	
	HN38	Sable quartzique : Ø=0,05 à 0,25 mm	
<b>Sédiments artificiels</b>	OCDE 218 & NF ISO 16191	Tourbe à sphaigne :	5%
		Kaolin :	20%
		Sable quartzique (0,05 à 0,2 mm) :	75%
		CaCO <sub>3</sub> :	0,1%
	NF T90-338-1	Tourbe brune :	6,5%
		Kaolin :	33,25%
		Sable quartzique (0,8 à 2 mm) :	60%
		CaCO <sub>3</sub> :	0,1%
	NF ISO 10872	Tourbe :	4%
		Dolomite :	0,5%
Fe <sub>2</sub> O <sub>3</sub> :		4,5%	
Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub> :		20%	
Sable siliceux (0,1 à 0,4 mm) :		70%	
	CaCO <sub>3</sub> :	1%	

### 4. SUBSTANCES CHIMIQUES DE RÉFÉRENCE

Cinq substances chimiques parmi celles généralement préconisées en tant que « substances de référence » ont été utilisées pour caractériser la sensibilité d'*Arthrobacter globiformis*.

- Le chlorure d'hexadécylbenzyltriméthylammonium monohydraté (BAC-16)
- Le sulfate de cuivre pentahydraté (CuSO<sub>4</sub>, 5H<sub>2</sub>O)
- Le sulfate de zinc (ZnSO<sub>4</sub>)
- L'acide borique (H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>)
- Le 3,5 dichlorophénol (3,5 DCP)

Pour l'essai sur *Myriophyllum aquaticum* seul le 3,5 DCP a été testé.

## 5. SÉDIMENTS

Au cours de l'année 2014, une troisième campagne de prélèvement de sédiments a été réalisée. Six sédiments provenant de six sites différents ont été collectés. Pour rappel, cinq sédiments provenant de sites potentiellement contaminés ou non avaient été testés sur les nématodes et sur les ostracodes au cours de l'année 2013. Ces cinq sédiments ont également été testés à l'aide des essais sur *Myriophyllum aquaticum* et *Arthrobacter globiformis*.

Les sédiments prélevés lors de la 3<sup>ème</sup> campagne proviennent pour la plupart de sites considérés comme non contaminés compte tenu de leur localisation à l'écart de zone fortement anthropisées. Le sédiment provenant du site d'Houdancourt [cressonnière point 2] doit être distingué de celui prélevé lors de la 2<sup>ème</sup> campagne [cressonnière point 1]. Ces prélèvements proviennent en effet du même site mais n'ont pas été collectés au même endroit et présentent visuellement des différences importantes en terme de texture et de teneur probable en matière organique. 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 impliquant des 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). L'ensemble des sédiments testés est présenté dans le tableau 2.

Des analyses physico-chimiques sont prévues sur l'ensemble de ces sédiments et devront permettre de les caractériser en termes de texture, caractéristiques physico-chimiques et polluants potentiels.

### Traitement préalable à la réalisation des essais d'écotoxicité :

Les sédiments prélevés ont été 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. Ils ont ensuite été débarrassés des éléments grossiers (cailloux, débris végétaux, invertébrés), puis tamisés à 4 mm.

Tableau 2 : Sédiments naturels testés sur l'année 2014

Nom du site	Contamination potentielle	Période de prélèvement	Essais réalisés en 2014
Bolbec (Piscine / aval du site)			
Bolbec (Usine)	Industrie	Octobre	<i>Arthrobacter globiformis</i>
Beuvry-la-forêt (amont)	pharmaceutique	2013	<i>Myriophyllum aquaticum</i>
Beuvry-la-forêt (aval)			[essais ostracodes et nématodes réalisés sur l'année 2013]
Cressonnière Houdancourt (point 1)	Site « référence »	Octobre 2013	
Cressonnière Vallon du Vivier	Site « référence »	Septembre 2014	
Cressonnière Houdancourt (point 2)	Site « référence »	Septembre 2014	
Rivière des Evoisson (Bergicourt)	Site « DCE »	Septembre 2014	<i>Arthrobacter globiformis</i> <i>Myriophyllum aquaticum</i>
Sainte Gertrude (Caudebec-en-Caux)	Site « DCE »	Septembre 2014	<i>Heterocypris incongruens</i> <i>Caenorhabditis elegans</i>
Bolbec (Piscine / aval du site)	Industrie pharmaceutique	Septembre 2014	
La Rhonelle (Artes)	Activités urbaine et agricole	Septembre 2014	

## 6. RÉSULTATS

### 6.1 SUBSTRATS DE REFERENCE

Le protocole existant pour la réalisation de l'essai d'inhibition de la croissance de *Myriophyllum aquaticum* recommande l'utilisation d'un sédiment artificiel reconstitué, tel que décrit dans la norme NF ISO 16191, correspondant au sédiment artificiel proposé par la ligne directrice OCDE 218 (essai de toxicité sur les chironomes). Les résultats de croissance obtenus sur ce substrat artificiel, sur les autres sédiments artificiels testés (sédiment NF T90 338-1 et NF ISO 10872) ainsi que sur des sables de différentes granulométries sont présentés dans la figure 5. Quel que soit le substrat testé, la croissance mesurée après 10 jours a été suffisante pour satisfaire le critère de validité actuellement proposé par la norme NF ISO 16191 : taux de croissance journalier supérieur à 0,09. Pour cette série d'essais, les taux de croissance journalier mesurés se situent entre 0,092 (mesuré pour le sédiment artificiel NF ISO 16191) et 0,110 (mesuré pour le sable de rivière). Compte tenu de ces résultats ces différentes matrices peuvent être considérées comme adéquates pour la réalisation de l'essai d'inhibition de la croissance de *Myriophyllum aquaticum*. Les résultats obtenus indiquent aussi que la composition du substrat a peu d'influence sur la production de biomasse de *Myriophyllum aquaticum* et suggèrent une certaine robustesse de l'essai. Cependant, il est important de noter que pour certaines de ces matrices, des signes de phytotoxicité autre qu'une inhibition de la croissance tels que le jaunissement des nouvelles tiges et feuilles au cours de l'essai ont été observés. C'est le cas notamment des plantules s'étant développées dans les différents sables et le sédiment NF ISO 10872 (Cf. figure 6, à titre d'exemple).

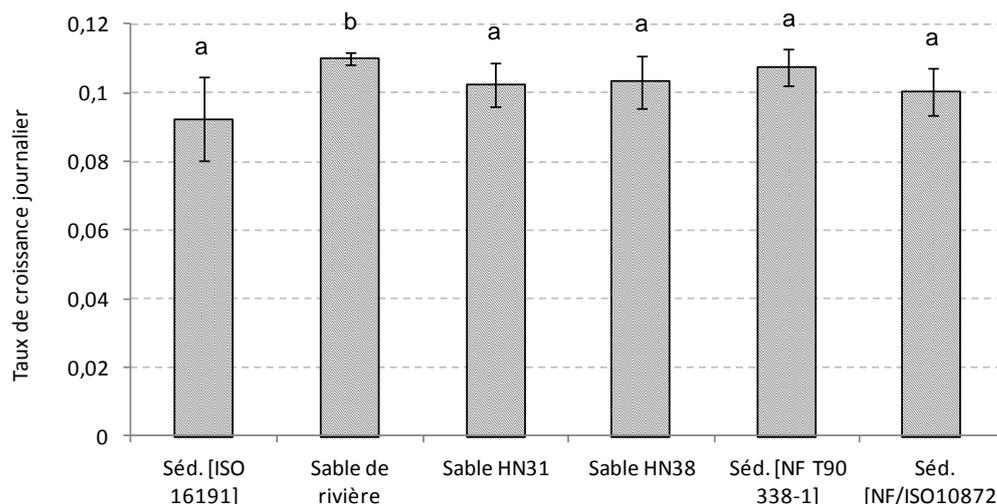


Figure 5 : Croissance de *Myriophyllum aquaticum* en fonction du substrat artificiel de référence. Des lettres différentes indiquent une différence statistiquement significative ( $p=0,05$  ; ANOVA suivi du test de Tukey pour les comparaisons multiples).



Figure 6 : Photo de *Myriophyllum aquaticum* s'étant développé sur différentes matrices artificielles. A. Sédiment artificiel NF ISO 16191/OCDE 218 ; B. sédiment artificiel NF T90 338-1 ; C. sable HN31

Concernant l'essai sur *Arthrobacter globiformis*, un sable quartzique similaire au sable HN38 est proposé comme substrat de référence. De la même façon que pour l'essai sur *Myriophyllum aquaticum*, les différents substrats cités précédemment ont été testés. Les résultats obtenus (tableau 3) montrent que les activités déshydrogénase de la bactérie mesurées dans le sable HN31 et le sable de rivière sont similaires à l'activité déshydrogénase mesurée pour le sable HN38. La répétition de certains de ces essais montre également une bonne reproductibilité de la réponse en condition témoin (pente moyenne =  $394 \pm 72$  ;  $\Delta = 18\%$ ). En revanche, lorsque l'essai a été mené en utilisant un sédiment artificiel comme substrat, l'activité déshydrogénase mesurée était systématiquement inférieure à celle mesurée pour les sables. Des différences en fonction du sédiment artificiel utilisé sont, d'autre part, été observées. Le sédiment artificiel proposé par la norme NF T90 338-1 apparaît le moins approprié. La pente correspondant à la courbe de fluorescence mesurée correspondant à la transformation de la résazurine en rézorufine se situe entre 65 et 79 pour les deux essais menés avec ce sédiment. Elle se situe entre 265 et 481 pour les essais menés sur le sable HN38. Ceci correspond à une inhibition de 82% de l'activité déshydrogénase dans ces conditions en comparaison avec les essais réalisés avec le sable HN38. Pour information complémentaire, ces valeurs apparaissent également faible au regard d'autres substrats témoin, notamment lorsque l'essai est utilisé pour évaluer la toxicité des sols. Dans ce contexte, un sol naturel de référence (sol LUFA 2.2) est utilisé. Les valeurs de pente mesurées lors de trois essais indépendants se situent entre 314 et 412.

Ces résultats soulignent l'importance du choix du substrat témoin à utiliser dans le cas de l'essai d'inhibition de l'activité déshydrogénase d'*Arthrobacter globiformis*. Si les différentes granulométries de sable testées n'ont pas eu d'influence sur le résultat, en revanche, des compositions plus complexes de substrats artificiels ont conduit à une diminution importante de l'activité déshydrogénase par rapport à celle mesurée dans les sables.

Tableau 3 : Activité déshydrogénase mesurée chez *Arthrobacter globiformis* en fonction du substrat artificiel témoin

	Sable de rivière	Sable HN31	Sable HN38	Sédiment artif. [NF T90 338-1]	Sédiment artif. [NF ISO 10872]	Sédiment artif. [OCDE 218] / [NF ISO 16191]
Essai 1	311	419	265	79	180	201
Essai 2	349	-	346	65	179	201
Essai 3	-	-	344	-	-	-
Essai 4	-	-	481	-	-	-
Essai 5	-	-	440	-	-	-
Essai 6	-	-	427	-	-	-
Essai 7	-	-	328	-	-	-
Essai 8	-	-	385	-	-	-
Essai 9	-	-	481	-	-	-
Essai 10	-	-	448	-	-	-

## 6.2 SUBSTANCES CHIMIQUES DE REFERENCE

Les résultats des essais menés sur les différentes substances chimiques de référence sont résumés dans les tableaux 4 et 5.

Le tableau 4 présente les résultats obtenus concernant l'inhibition de l'activité déshydrogénase d'*Arthrobacter globiformis* exposée aux différentes substances chimiques de référence. Les essais ont tous été réalisés en considérant le sable HN38 comme substrat d'essai. Huit essais indépendants ont été menés avec le 3,5 DCP. Les valeurs de  $CE_{50}$  calculées pour l'inhibition de l'activité déshydrogénase sont apparues homogènes et se situent entre 36 mg et 63 mg de 3,5 DCP /kg de substrat (équivalent sec). Les essais menés avec le sulfate de cuivre indiquent également une homogénéité de la réponse obtenue. Contrairement au 3,5 DCP et au sulfate de cuivre, les résultats des essais menés avec le BAC-16 et le zinc sont apparues plus hétérogènes avec dans certains cas une absence d'effet après exposition à 800 mg de BAC-16 /kg de substrat (équivalent sec) et dans d'autres cas une inhibition complète de l'activité déshydrogénase à 600 mg de BAC /kg de substrat (équivalent sec). Pour le sulfate de zinc, les valeurs de  $CE_{50}$  se situent entre 32,8 mg Zn /kg de substrat (équivalent sec) et 90,4 mg Zn /kg de substrat (équivalent sec). A titre d'information supplémentaire, des essais concernant le BAC avaient été menés en considérant un sol naturel comme substrat de référence (sol LUFA 2.2). Dans ce contexte l'inhibition de l'activité déshydrogénase se situait entre 51% et 71% (moyenne = 63 ; Ec-Type = 6,2) après exposition à 600 mg BAC /kg sol (équivalent sec). Enfin, les essais menés avec l'acide borique n'ont pas permis de mettre en évidence une inhibition marquée de l'activité déshydrogénase après exposition à 1000 mg Ac. borique /kg de substrat (équivalent sec).

Le tableau 5 résume les résultats d'inhibition de la croissance de *Myriophyllum aquaticum* obtenus pour les essais menés avec le 3,5 DCP. Un premier essai préliminaire a permis de montrer une absence complète de développement du myriophylle après exposition au 3,5 DCP dans des concentrations égales à 800 et 400 mg 3,5 DCP /kg de substrat (équivalent sec) et 70% d'inhibition après exposition à 100 mg 3,5 DCP /kg de substrat (équivalent sec). Un deuxième essai a permis de définir une valeur de  $CE_{50}$  égale à 102 mg 3,5 DCP /kg de substrat (équivalent sec). Après exposition à 60 et 120 mg 3,5 DCP /kg de substrat (équivalent sec), l'inhibition de croissance mesurée étaient de 25% et 55%, respectivement. Ces résultats sont en accord avec les résultats obtenus lors de l'essai circulaire qui avaient montré une inhibition de l'ordre de 35%  $\pm$  15% après exposition à 90 mg 3,5 DCP /kg de substrat (équivalent sec), dans des conditions similaires (Feiler *et al.*, 2014).

Tableau 4 : Inhibition de l'activité déshydrogénase d'*Arthrobacter globiformis* exposée à différentes substances chimiques de référence. Les valeurs indiquées correspondent à la concentration en substance ayant entraînée une inhibition de la moitié de l'activité déshydrogénase par rapport au témoin (CE<sub>50</sub>)

substances	substrat		CE <sub>50</sub> en mg/kg [IC <sub>95%</sub> ]
3,5 DCP	HN38	Essai n°1	44,9 [42-48,8]
		Essai n°2	36,3 [33,7-40,1]
		Essai n°3	54,1 [47,4-62,5]
		Essai n°4	54,5 [49,3-58,9]
		Essai n°5	56,1 [51,7-62,1]
		Essai n°6	63,0 [56,7-71,8]
		Essai n°7	43,0 [45,5-53,4]
		Essai n°8	49,5 [45,5-53,4]
BAC-16	HN38	Essai n°1	< 600 (100% d'inhibition à 600)
		Essai n°2	Pas d'effet à 800
Sulfate de cuivre	HN38	Essai n°1	110,1 [103,9-119,4]
		Essai n°2	116,2 [100,3-125,9]
Sulfate de zinc	HN38	Essai n°1	83,8 [74,2-92,3]
		Essai n°2	32,8 [30,2-36,2]
		Essai n°3	90,4 [86,7-94,6]
Ac. borique	HN38	Essai n°1	17,1% inh. à 1000 mg/kg

Tableau 5 : Inhibition de la croissance de *Myriophyllum aquaticum* exposée au 3,5 DCP

substrat		Concentrations testées (mg/kg équivalent sec)	Résultats
NF ISO 16191 (correspondant à OCDE 218)	Essai n°1	100-400-1600	70,3% d'inhibition à 100 mg/kg Inhibition complète à 400 et 1600 mg/kg
	Essai n°2	120-60-30-15-7.5	CE <sub>50</sub> = 101,8 [82,9-125,4]

## 6.3 SEDIMENTS

Au cours de l'année 2014 une nouvelle campagne de prélèvement de sédiments a été réalisée. Les six sédiments prélevés ont été testés en appliquant les bioessais mis en place en 2013 (nématodes et ostracodes) et ceux mis en place en 2014 (myriophylles et bactéries). L'essai d'inhibition de la croissance de *Myriophyllum aquaticum* a également été appliqué aux sédiments de la deuxième campagne de prélèvement 2013 (initialement testés à l'aide des essais nématodes et ostracodes, cf. rapport d'avancement 2013 ; DRC-13-136875-13811A).

L'ensemble des résultats obtenus sur les sédiments des campagnes 2 (2013) et 3 (2014) pour l'essai de mortalité, d'inhibition de la croissance et de la reproduction du nématode est présenté sur la figure 7. Les sédiments de la troisième campagne n'ont pas entraîné de mortalité significative des nématodes. D'autre part, la croissance et la reproduction des organismes n'a pas été affectée. Pour rappel seul un sédiment de la deuxième campagne de prélèvement (sédiment « Beuverie-La-forêt contaminé », prélevé en aval du rejet potentiel du site de Beuvry-la-forêt) avait entraîné des effets significatifs vis-à-vis du nématode. En revanche, comme pour la deuxième campagne de prélèvement, la reproduction des organismes a, dans certains cas, été plus importante que celle observée avec le sédiment artificiel témoin (113 juvéniles/adulte). C'est notamment le cas pour les sédiments prélevés sur les sites de Bolbec [piscine] (165 juvéniles/adulte), site de Bergicourt [Rivière des Evoisson] (152 juvéniles/adulte) et site d'Houdancourt [cressonnière] (166 juvéniles/adulte). Pour information complémentaire, la reproduction moyenne donnée par le suivi historique (depuis 2013) de l'essai nématode mené avec le sédiment artificiel témoin est de 112 juvéniles ( $\pm 21$ ) par adulte (valeurs obtenues pour 7 essais indépendants). En l'absence de matrice solide, les données historiques indiquent une reproduction moyenne de 135 juvéniles ( $\pm 27$ ) par adulte (valeurs moyenne correspondant à 20 essais indépendants). Les résultats obtenus sur les sédiments naturels se situent par conséquent dans la borne haute de ce que l'on est en droit d'attendre en ce qui concerne la reproduction de ces organismes dans ces conditions expérimentales.

Les résultats supplémentaires obtenus sur les sédiments de la 3<sup>ème</sup> campagne de prélèvement pour l'essai de mortalité et d'inhibition de la croissance des ostracodes sont présentés dans la figure 8. Au regard de ces résultats, seul le sédiment provenant du site de Bergicourt [Rivière des Evoisson] a entraîné une mortalité significativement plus importante en comparaison avec le substrat témoin et les autres sédiments testés. Aucune inhibition significative de la croissance des organismes n'a été observée, quel que soit le sédiment testé. En revanche, les taux de croissance mesurés sur les sédiments naturels sont tous statistiquement supérieurs à ceux observés lorsque les organismes ont été placés en présence du substrat artificiel (OCDE 218). La même tendance était observée pour les essais menés sur les sédiments des deux premières campagnes de prélèvement.

L'ensemble des résultats obtenus sur les sédiments de cette troisième campagne de prélèvement confirme les observations faites précédemment et souligne que l'utilisation d'un sédiment artificiel unique en tant que témoins (tel que recommandé dans les textes normatifs), pour les bioessais nématodes et ostracodes, n'est pas suffisant dans le contexte de la caractérisation de l'écotoxicité des sédiments en place.

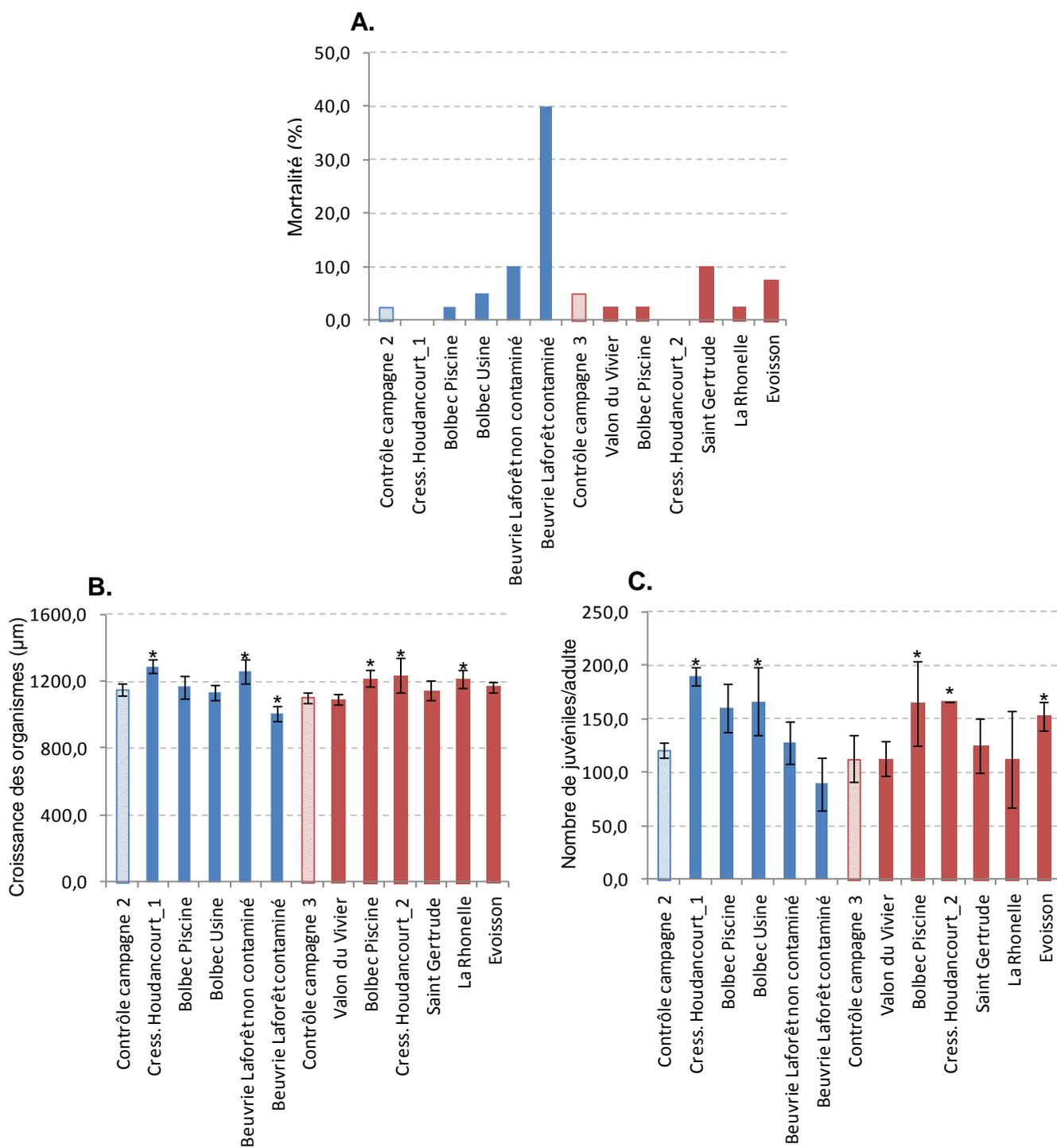


Figure 7 : Résultats de l'essai nématode réalisé sur les sédiments prélevés lors des campagnes 2 et 3. A. mortalité observée ; B. croissance des organismes ; C. reproduction des organismes. \* résultats sur la croissance et la reproduction statistiquement différents en comparaison avec le témoin respectif ( $p=0,05$ , test-t de Bonferroni).

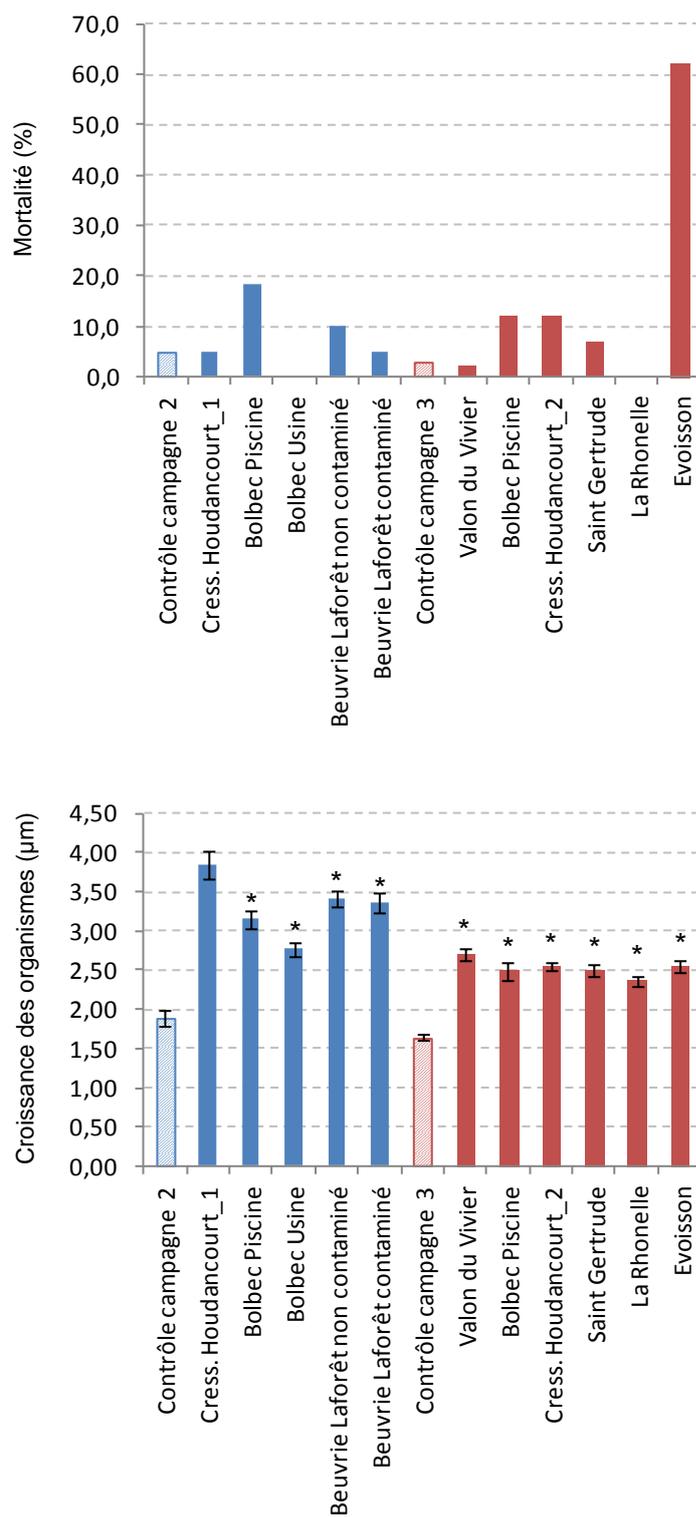


Figure 8 : Résultats de l'essai sur ostracodes réalisé sur les sédiments prélevés lors des campagnes 1, 2 et 3. A. mortalité des organismes ; B. croissance des organismes. \* résultats sur la croissance statistiquement différents en comparaison avec le témoin respectif (p=0,05, test-t de Bonferroni).

Les résultats concernant l'inhibition de la croissance de *Myriophyllum aquaticum* après exposition aux sédiments des deuxième et troisième campagnes de prélèvement sont présentés dans la figure 9.

D'une façon générale, aucune inhibition significative n'a été observée en comparaison avec la croissance mesurée sur les plantes exposées au substrat témoin (sédiment NF ISO 16191:2014 équivalent au sédiment OCDE 218). Quel que soit le sédiment testé (sites témoins ou potentiellement contaminés), le taux de croissance journalier moyen mesuré se situe entre 0,10 et 0,15. Il est à rappeler qu'aucune inhibition significative de la croissance n'avait été observée lors de la deuxième campagne de prélèvement, quelque soit l'origine du sédiment.

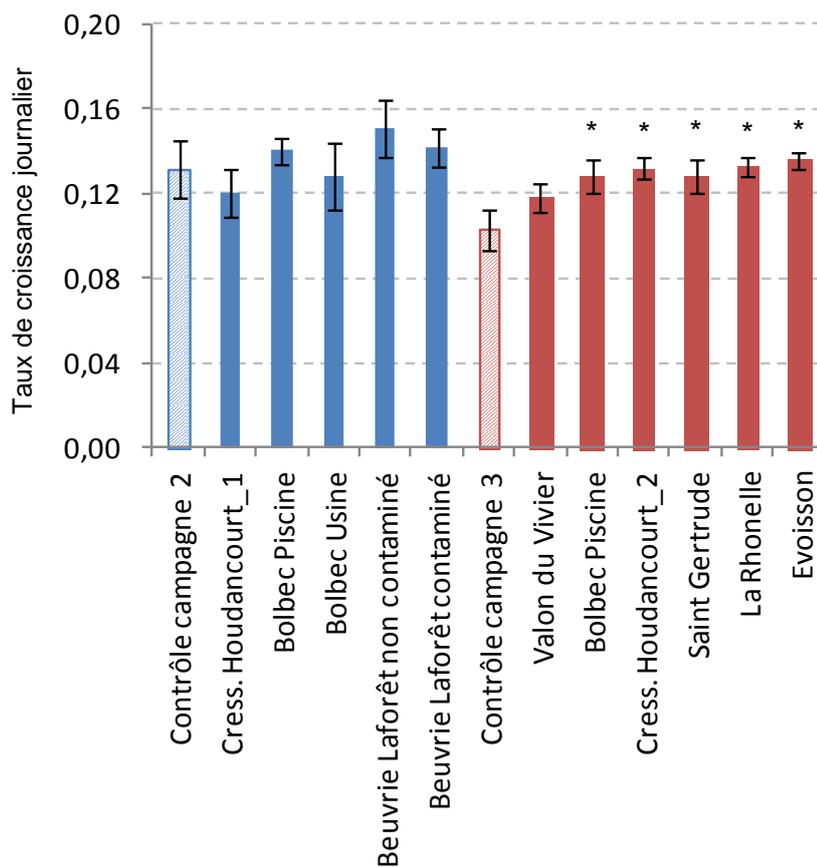


Figure 9 : Inhibition de la croissance de *Myriophyllum aquaticum* après exposition aux sédiments des campagnes 2 et 3. \* résultats statistiquement différents en comparaison avec le témoin respectif ( $p=0,05$ , test-t de Bonferroni).

La figure 10 présente les résultats obtenus concernant l'activité déshydrogénase de la bactérie *Arthrobacter globiformis* exposée aux différents sédiments des 2<sup>ème</sup> et 3<sup>ème</sup> campagnes de prélèvement (les résultats de ces deux séries d'essais sont à considérer de façon indépendante ; la mesure de fluorescence n'ayant pas été réalisée avec le même appareillage).

A l'exception du site Houdancourt [cressonnière point1], les pentes calculées pour les sédiments des deux campagnes sont toutes inférieures à celles calculées pour le substrat témoin (sable HN38). Pour les sédiments de la 2<sup>ème</sup> campagne, les plus fortes inhibitions ont été observées après exposition aux sédiments provenant des sites de Beuvrie Laforêt [contaminé], Beuvrie Laforêt [non contaminé] et Bolbec [usine], avec respectivement 99%, 89% et 75% d'inhibition de l'activité déshydrogénase. Le sédiment du site Bolbec [piscine] a entraîné quand à lui 32% d'inhibition.

Pour les prélèvements de la 3<sup>ème</sup> campagne, l'inhibition de l'activité déshydrogénase la plus importante a été observée pour le sédiment provenant du site de Bolbec [piscine] et correspond à une inhibition de 62%. Les sédiments prélevés sur les sites d'Houdancourt [cressonnière point 2] et d'Artes [la Rhonelle] ont également entraîné une inhibition significative, de l'ordre de 40% de l'activité déshydrogénase de la bactérie.

Pour l'ensemble de ces essais, il est cependant nécessaire de noter que la désactivation des sédiments à tester n'a pas été complète et une activité importante avant introduction de la bactérie a pu être mesurée. Ce point est traité dans la partie 6.4.

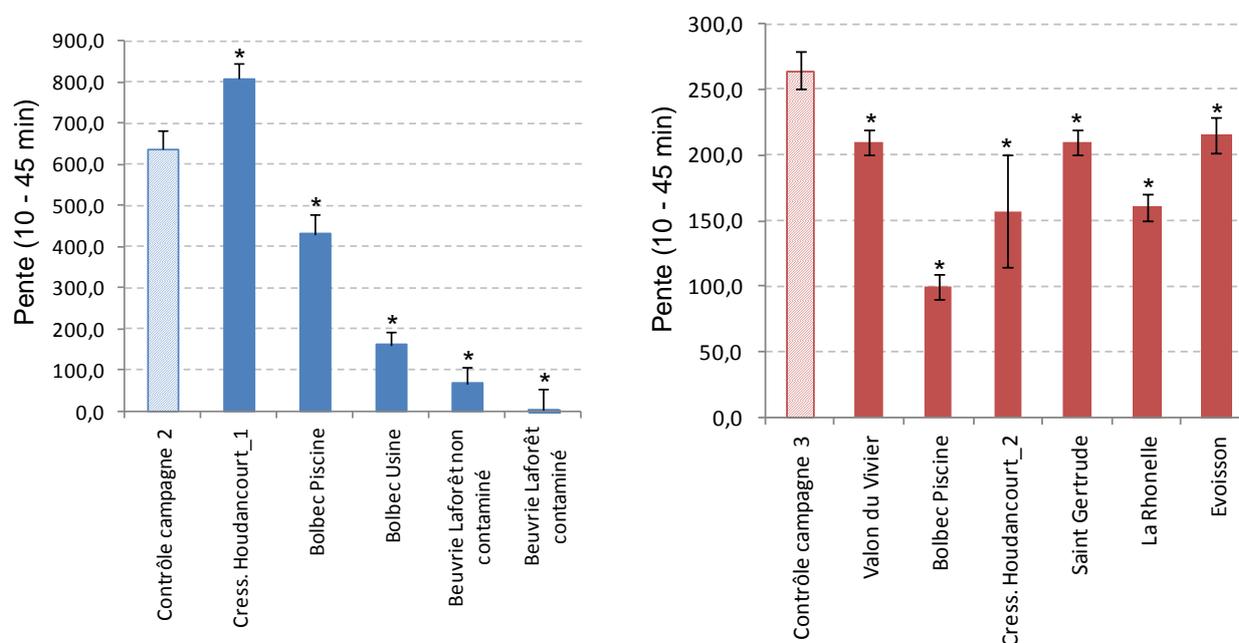


Figure 10 : Inhibition de l'activité déshydrogénase d'*Arthrobacter globiformis* après exposition aux sédiments des campagnes 2 et 3 (les résultats sont à considérés de façon indépendante). \* résultats statistiquement différents en comparaison avec le témoin respectif (p=0,05, test-t de Bonferroni).

## 6.4 QUESTIONNEMENT SUR LA DESACTIVATION DES SEDIMENTS NATURELS DANS LE CADRE DE L'ESSAI D'INHIBITION DE LA DESHYDROGENASE CHEZ A. GLOBIFORMIS

La réalisation de l'essai d'inhibition de l'activité déshydrogénase d'*Arthrobacter globiformis* nécessite la « désactivation » préalable des échantillons à tester. Cette désactivation permet d'éliminer l'activité déshydrogénase potentielle des échantillons à tester. Elle est réalisée par traitement thermique des échantillons (voir partie 2.2).

Dans le cadre de l'application du protocole d'essai aux sédiments naturels, l'efficacité de l'étape de désactivation a été renseignée. La comparaison de l'activité déshydrogénase des sédiments, en l'absence d'*Arthrobacter globiformis*, avant et après traitement thermique est présentée dans la figure 11. A l'exception des sédiments provenant du site Vallon du vivier [cressonnière] et du site de Caudebec-en-Caux [Ste Gertrude], tous les sédiments ont entraîné une réduction de la résazurine importante. Le traitement thermique s'est avéré efficace uniquement pour le sédiment provenant du site de Bergicourt [Rivière des Evoisson]. Cependant, l'activité déshydrogénase de ce sédiment après traitement thermique ne s'est pas retrouvée au même niveau que celle mesurée chez le témoin (sable HN38) avant introduction de la souche bactérienne. Pour les autres sédiments, l'activité déshydrogénase mesurée est restée identique avant et après traitement thermique. Une absence d'efficacité du traitement thermique ou la présence d'un composé réducteur ( $H_2S$  lié aux conditions anaérobies ?) réduisant la résazurine en résorufine pourrait être responsable de ce comportement.

Une série d'essais complémentaires a ainsi été réalisée en considérant une étape d'aération préalable des sédiments. Les résultats obtenus sont présentés dans la figure 12. Cette étape supplémentaire n'a pas permis de réduire l'activité déshydrogénase. Au contraire, ces résultats ont montré une augmentation de l'activité pour les sédiments aérés en comparaison avec les sédiments non aéré.

Ces considérations conduisent à s'interroger sur l'efficacité, dans ce contexte, de la méthode de désactivation telle qu'elle est proposée. Par conséquent, les résultats obtenus pour ce type de matrices sont à considérer avec attention. En revanche, cette méthode de désactivation s'était révélée efficace pour les sols et les déchets (résultats non présentés). Des investigations supplémentaires sont nécessaires afin de définir dans quelles conditions la désactivation des matrices sédimentaires pourrait être plus efficace.

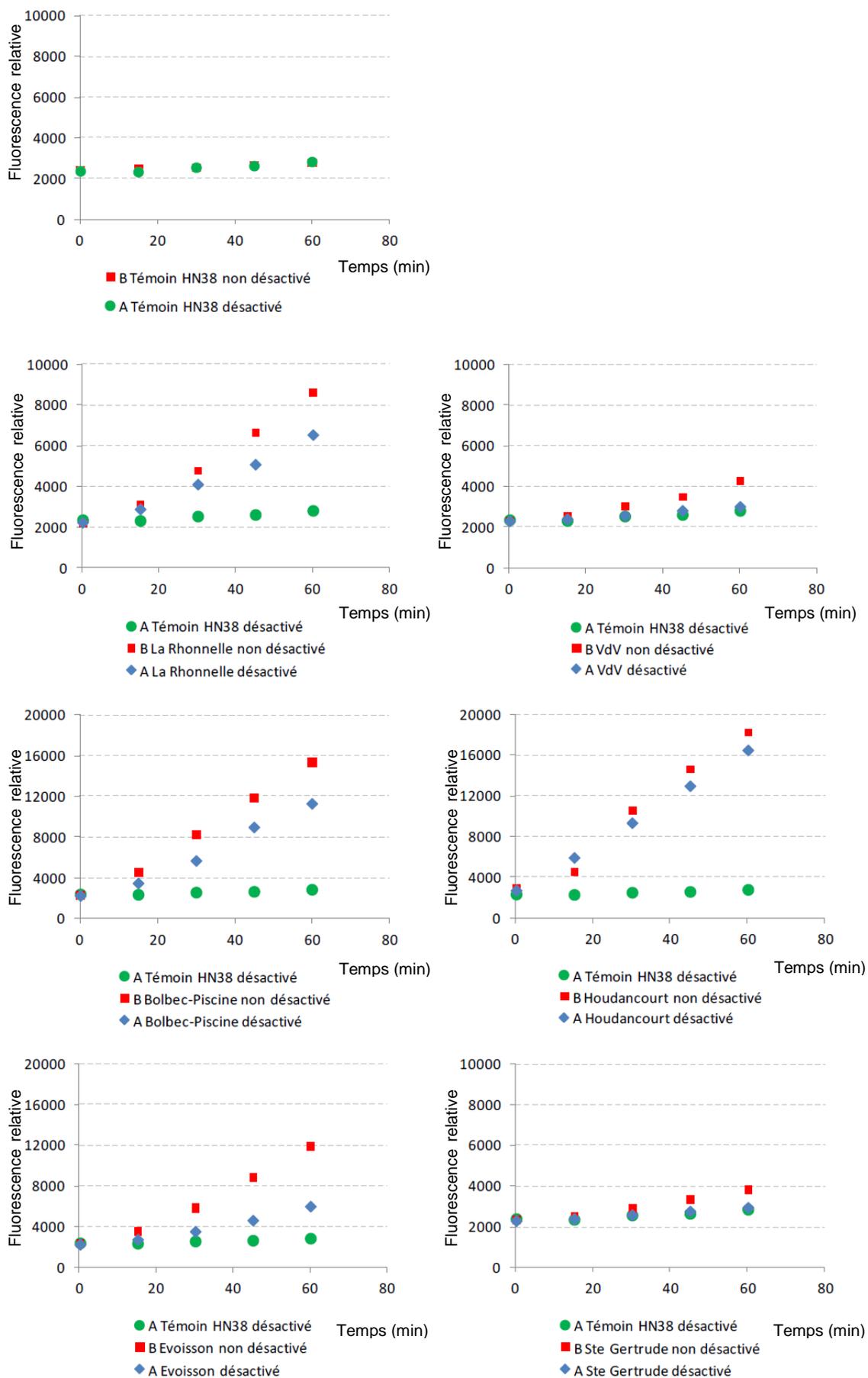


Figure 11 : Caractérisation de l'activité déshydrogénase intrinsèque des sédiments avant et après désactivation

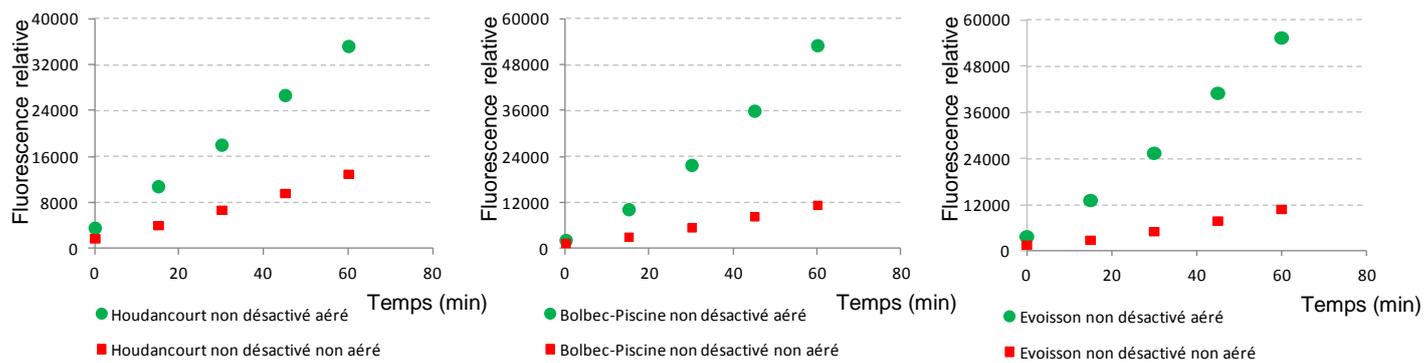


Figure 12 : Comparaison de l'activité déshydrogénase intrinsèques des sédiments en fonction de la méthode de préparation utilisée

## 7. BILAN

Les travaux menés au cours de l'année 2014 ont permis la mise en place des protocoles pour la réalisation de l'essai d'inhibition de la croissance de *Myriophyllum aquaticum* et de l'essai d'inhibition de l'activité déshydrogénase d'*Arthrobacter globiformis*. La réponse obtenue pour ces deux bioessais en fonction du substrat de référence utilisé a été renseignée. L'essai d'inhibition de la croissance de *Myriophyllum aquaticum* est apparu tolérant aux différents substrats testés, contrairement à l'essai d'inhibition de l'activité déshydrogénase d'*Arthrobacter globiformis*. Pour ce dernier, l'activité déshydrogénase mesurée est moins importante dans les substrats plus complexes (sédiments artificiels reconstitués, notamment le substrat proposé par la norme NFT90 338-1) que celle mesurée dans les sables. En revanche, quelle que soit la granulométrie du sable utilisée, la réponse obtenue est similaire.

L'applicabilité de ces essais dans un contexte de caractérisation de l'écotoxicité des sédiments en place a également été renseignée. Les essais menés sur les sédiments prélevés au cours des 2<sup>ème</sup> et 3<sup>ème</sup> campagnes à l'aide de l'essai d'inhibition de la croissance de *Myriophyllum aquaticum* n'ont pas permis de discriminer les sédiments considérés comme « non contaminés » de ceux prélevés dans des zones subissant des pressions anthropiques. D'autre part, les résultats obtenus ont systématiquement montré une croissance supérieure en comparaison avec le sédiment artificiel utilisé comme témoin. Ce dernier constat rejoint les conclusions déjà formulées pour les essais nématodes et ostracodes en ce qui concerne la nécessité de disposer de sédiments de référence autre qu'un substrat artificiel unique ; les essais supplémentaires menés sur ces deux organismes ont également confirmé cela.

Les résultats obtenus lors des essais sur la bactérie *Arthrobacter globiformis* ont permis de mettre en évidence une diminution significative de l'activité déshydrogénase lorsque celle-ci était exposée aux sédiments prélevés lors des 2<sup>ème</sup> et 3<sup>ème</sup> campagnes. Cette inhibition était notamment marquée pour les sédiments provenant des sites de Beuvrie Laforêt et Bolbec, considérés comme potentiellement contaminés. Cependant, compte tenu des limitations observées concernant la désactivation des sédiments, il semble prématuré de conclure quant à l'utilisation effective de cet essai dans un contexte de caractérisation de l'écotoxicité des sédiments en place. Des investigations supplémentaires sont à envisager afin d'optimiser l'étape de désactivation dans ce cadre.

La suite des travaux permettra de discuter plus en détail de l'intérêt de ces essais dans le contexte de la caractérisation de l'écotoxicité des sédiments. Une dernière campagne de prélèvement sera effectuée courant 2015. L'essai de mortalité, d'inhibition de la croissance et de l'émergence des chironomes sera appliqué en parallèle des autres bioessais déjà étudiés. Les résultats seront finalement traités de façon à renseigner sur la redondance des essais, leur robustesse et leur pouvoir discriminant.

## 8. 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 waters. *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
- 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**.
- 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.
- 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*.
- 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, Ditche 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 stickback (*Gasterosteus aculeatus* L.): biotic variability and integration in a battery of biomarkers for environmental monitoring. *Environmental Toxicology* DOI 10.1002.
- 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.

## **LISTE DES TABLEAUX**

<b>Tableau 1</b> : Substrats artificiels testés.....	12
<b>Tableau 2</b> : Sédiments naturels testés sur l'année 2014 .....	13
<b>Tableau 3</b> : Activité déshydrogénase mesurée chez <i>Arthrobacter globiformis</i> en fonction du substrat artificiel témoin.....	15
<b>Tableau 4</b> : Inhibition de l'activité déshydrogénase d' <i>Arthrobacter globiformis</i> exposée à différentes substances chimiques de référence. Les valeurs indiquées correspondent à la concentration en substance ayant entraînée une inhibition de la moitié de l'activité déshydrogénase par rapport au témoin (CE <sub>50</sub> ).....	17
<b>Tableau 5</b> : Inhibition de la croissance de <i>Myriophyllum aquaticum</i> exposée au 3,5 DCP.....	17

## **LISTE DES FIGURES**

<b>Figure 1</b> : Illustrations de <i>Myriophyllum aquaticum</i> (A), culture de la souche (B) et collecte des tiges pour les essais (C).....	6
<b>Figure 2</b> : Schéma général du déroulement de l'essai d'inhibition de la croissance de <i>Myriophyllum aquaticum</i> .....	8
<b>Figure 3</b> : Schéma de la réaction suivie pour l'essai d'inhibition de l'activité déshydrogénase d' <i>Arthrobacter globiformis</i> .....	9
<b>Figure 4</b> : Schéma général du déroulement de l'essai d'inhibition de l'activité déshydrogénase chez <i>Arthrobacter globiformis</i> .....	11
<b>Figure 5</b> : Croissance de <i>Myriophyllum aquaticum</i> en fonction du substrat artificiel de référence. Des lettres différentes indiquent une différence statistiquement significative (p=0,05 ; ANOVA suivi du test de Tukey pour les comparaisons multiples).....	14
<b>Figure 6</b> : Photo de <i>Myriophyllum aquaticum</i> s'étant développé sur différentes matrices artificielles. A. Sédiment artificiel ISO 16191/OCDE 208 B ; sédiment artificiel NF T90 338-1 ; C. sable HN31 ....	14
<b>Figure 7</b> : Résultats de l'essai nématode réalisé sur les sédiments prélevés lors des campagnes 2 et 3. A. mortalité observée ; B. croissance des organismes ; C. reproduction des organismes. * résultats sur la croissance et la reproduction statistiquement différents en comparaison avec le témoin respectif (p=0,05, test-t de Bonferroni).....	19
<b>Figure 8</b> : Résultats de l'essai sur ostracodes réalisé sur les sédiments prélevés lors des campagnes 1, 2 et 3. A. mortalité des organismes ; B. croissance des organismes. * résultats sur la croissance statistiquement différents en comparaison avec le témoin respectif (p=0,05, test-t de Bonferroni).....	20
<b>Figure 9</b> : Inhibition de la croissance de <i>Myriophyllum aquaticum</i> après exposition aux sédiments des campagnes 2 et 3. * résultats statistiquement différents en comparaison avec le témoin respectif (p=0,05, test-t de Bonferroni).....	21
<b>Figure 10</b> : Inhibition de l'activité déshydrogénase d' <i>Arthrobacter globiformis</i> après exposition aux sédiments des campagnes 2 et 3 (les résultats sont à considérés de façon indépendante). * résultats statistiquement différents en comparaison avec le témoin respectif (p=0,05, test-t de Bonferroni).....	22
<b>Figure 11</b> : Caractérisation de l'activité déshydrogénase intrinsèque des sédiments avant et après désactivation.....	24
<b>Figure 12</b> : Comparaison de l'activité déshydrogénase intrinsèques des sédiments en fonction de la méthode de préparation utilisée.....	25