



HAL
open science

APPORTS DES ESSAIS EN MICROCOSMES AQUATIQUES LENTIQUES DE LABORATOIRE A L'EVALUATION ECOTOXICOLOGIQUE DES POLLUANTS

Bernard Clement

► **To cite this version:**

Bernard Clement. APPORTS DES ESSAIS EN MICROCOSMES AQUATIQUES LENTIQUES DE LABORATOIRE A L'EVALUATION ECOTOXICOLOGIQUE DES POLLUANTS. Interactions entre organismes. INSA de Lyon; Université Claude Bernard - Lyon I, 2006. tel-00142639

HAL Id: tel-00142639

<https://theses.hal.science/tel-00142639>

Submitted on 20 Apr 2007

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.

Résumé d'ouvrages et de travaux présenté par
Bernard CLEMENT
enseignant-chercheur au
Laboratoire des Sciences de l'Environnement (L.S.E.)
de l'Ecole Nationale des Travaux Publics de l'Etat (ENTPE)

pour obtenir le diplôme
d'Habilitation à Diriger des Recherches
délivré conjointement par
l'INSTITUT NATIONAL DES SCIENCES APPLIQUEES
et l'UNIVERSITE LYON 1

Spécialité : Chimie, Génie des Procédés, Environnement

APPORTS DES ESSAIS EN MICROCOSMES AQUATIQUES

LENTIQUES DE LABORATOIRE A L'EVALUATION

ECOTOXICOLOGIQUE DES POLLUANTS

VOLUME 1

Date de Soutenance : vendredi 2 juin 2006

Composition du jury :

Janine GIBERT (Pr, Université Lyon 1) rapporteur
Gilles MONOD (DR, INRA de Rennes) rapporteur
Gérard BLAKE (Pr, Université de Savoie) rapporteur
Rémy GOURDON (Pr, INSA de Lyon)
Jean-François FERARD (Pr, Université de Metz)
Alain DEVAUX (IR, INRA/ENTPE)

Mémoire préparé au sein du
Laboratoire des Sciences de l'Environnement
Ecole Nationale des Travaux Publics de l'Etat, Vaulx-en-Velin

Note sur l'organisation du rapport

Le présent rapport (volume 1) est organisé en quatre parties :

- un *curriculum vitae*,
- une Introduction dans laquelle nous rappelons l'intérêt des essais en microcosmes et présentons rapidement les principaux protocoles utilisés dans les travaux menés et encadrés,
- un Exposé des travaux réalisés, de loin la partie la plus fournie, est destiné à présenter les acquis et enseignements tirés de plusieurs années d'expérience d'essais en microcosmes aquatiques ; il est lui-même divisé en trois sous-parties :
 - o une synthèse bibliographique sur les microcosmes de laboratoire, permettant de montrer la place de ce type de recherches en Ecotoxicologie et de situer les outils que nous avons développés,
 - o un long chapitre détaillant et argumentant les choix qui ont été faits dans la conception des protocoles d'essais en microcosmes mis au point ; pour ce faire, nous avons été conduits à rassembler la grande majorité des données obtenues de façon à les analyser pour en tirer une vision synthétique et la plus complète possible,
 - o un chapitre présentant les applications de l'outil microcosmes à l'évaluation des risques écotoxicologiques, les principaux résultats obtenus et des éléments de discussion sur la méthode utilisée,
 - o une partie « discussion et perspectives » qui reprend les acquis de la démarche, les limites et les points à améliorer, et dresse des perspectives pour une poursuite des travaux sur la thématique « microcosmes » dans un objectif d'optimisation des protocoles et de meilleure compréhension du fonctionnement de l'écosystème reconstitué.
- une partie Annexes, qui complète l'exposé des travaux par des tableaux où sont présentés de façon synthétique les données obtenues et certains résultats.

Le volume 2 contient une sélection d'articles relatifs aux travaux menés en microcosmes.

SOMMAIRE

<i>Curriculum vitae</i>	11
Présentation des travaux.....	33
1. Introduction	35
1.1. La place de l'écotoxicologie au sein du Ministère de l'Équipement	35
1.2. Intérêt des essais en microcosmes	36
1.3. Un exemple d'utilisation de microcosmes extérieurs.....	39
1.4. Développement de protocoles de microcosme de laboratoire	39
2. Travaux réalisés sur les microcosmes de laboratoire : résultats et enseignements	45
2.1. Microcosmes et microcosmologie.....	45
2.2. La place des essais en microcosmes dans la littérature en Ecotoxicologie.....	45
2.3. Les microcosmes aquatiques lenticules de laboratoire dans la littérature	46
2.3.1. Objectifs des essais en microcosmes	46
2.3.2. Les essais sur des communautés dérivées d'écosystèmes naturels	49
2.3.3. Les essais sur des systèmes gnotobiotiques	52
2.4. Conception des essais en microcosmes de ce travail.....	56
2.4.1. Objectifs.....	56
2.4.2. Description générale des différents types de microcosmes utilisés (2 L, 100 L, 180 L "gravières").....	57
2.4.3. Choix des compartiments et des biocénoses.....	60
2.4.3.1. <i>Préambule</i>	60
2.4.3.2. <i>Eau surnageante</i>	60
2.4.3.2.1. Choix d'une eau synthétique ou naturelle.....	60
2.4.3.2.2. Evolution de la qualité de l'eau au cours d'un essai.....	67
2.4.3.2.3. Influence du renouvellement de l'eau.....	72
2.4.3.2.4. Influence du ratio eau : sédiment.....	74
2.4.3.3. <i>Sédiment</i>	75
2.4.3.3.1. Importance du sédiment.....	75
2.4.3.3.2. Sédiment naturel ou artificiel ?.....	75
2.4.3.3.3. Influence de la texture et de la structure du sédiment sur le développement des organismes benthiques.....	78
2.4.3.3.4. Effet de la quantité de nourriture apportée sur le développement des organismes benthiques.....	82
2.4.3.3.5. Conditionnement de sédiments artificiels.....	84
2.4.3.3.6. Influence de l'endofaune sur le développement des organismes introduits	86
2.4.3.3.7. Influence du sédiment sur la qualité de l'eau surnageante et de l'eau interstitielle	87
2.4.3.4. <i>Biocénoses</i>	90
2.4.3.4.1. Choix des espèces du microcosme.....	90
2.4.3.4.2. Performances et sensibilités des organismes dans les essais en microcosmes.....	92
2.4.3.4.2.1. Organismes benthiques.....	93
2.4.3.4.2.1.1. Introduction	93
2.4.3.4.2.1.2. <i>Chironomus riparius</i>	94
2.4.3.4.2.1.3. <i>Hyalella azteca</i>	107
2.4.3.4.2.2. Algues et cladocères.....	113
2.4.3.4.2.3. Lentilles d'eau.....	127
2.4.3.4.2.4. Macrophytes enracinées	134
2.4.3.4.2.5. Mollusques gastéropodes pulmonés	139
2.4.3.5. <i>Taille et géométrie des systèmes</i>	144
2.5. Application de l'outil « microcosme » à l'évaluation des risques écotoxicologiques	146
2.5.1. Etude de la biodisponibilité d'hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAPs)	146
2.5.1.1. <i>Problématique et travaux réalisés</i>	146
2.5.1.2. <i>Résultats et principaux enseignements</i>	148
2.5.1.2.1. Difficultés propres aux expériences sur HAPs	148
2.5.1.2.2. Toxicité en phase aqueuse vis-à-vis des organismes du microcosme exposés lors de tests monospécifiques et facteurs modulateurs.....	150

2.5.1.2.3.	Toxicité sur les organismes pélagiques en microcosmes.....	153
2.5.1.2.4.	Toxicité sur les organismes benthiques en tests monospécifiques et en microcosmes.....	154
2.5.1.2.5.	Bioaccumulation des HAPs au cours des essais.....	157
2.5.1.2.6.	Réponses du compartiment bactérien aux HAPs.....	160
2.5.1.3.	<i>Discussion générale et synthèse sur l'étude en microcosmes de la toxicité des HAPs.....</i>	161
2.5.2.	Etude de la toxicité de la 6PPD, une substance industrielle.....	165
2.5.2.1.	<i>Problématique et travaux réalisés.....</i>	165
2.5.2.2.	<i>Principaux résultats.....</i>	165
2.5.3.	Evaluation de l'écocompatibilité de MIOM valorisés en technique routière.....	168
2.5.3.1.	<i>Problématique et travaux réalisés.....</i>	168
2.5.3.2.	<i>Principaux résultats.....</i>	171
2.5.3.2.1.	Composition physico-chimique des percolats de MIOM.....	171
2.5.3.2.2.	Toxicité des percolats de MIOM en tests monospécifiques.....	172
2.5.3.2.3.	Toxicité des percolats de MIOM en microcosmes 2 L.....	174
2.5.3.2.4.	Toxicité des percolats de MIOM en microcosmes 100 L.....	175
2.5.3.2.5.	Comparaison des résultats aux différentes échelles d'essai.....	176
2.5.3.2.6.	Le cuivre, un dénominateur commun aux effets observés ?.....	178
2.5.3.2.7.	Conclusion.....	179
2.5.4.	Evaluation de l'impact de l'immersion de sédiments de dragage.....	181
2.5.4.1.	<i>Problématique de la gestion des sédiments de dragage.....</i>	181
2.5.4.2.	<i>Etude de l'immersion de sédiments de dragage non traités en gravières.....</i>	183
2.5.4.3.	<i>Etude de l'immersion en gravière de sédiments de dragage traités.....</i>	192
2.5.4.3.1.	Approche expérimentale proposée.....	192
2.5.4.3.2.	Résultats.....	195
2.5.4.3.3.	Discussion et conclusion.....	202
2.6.	Discussion générale et perspectives.....	206
2.6.1.	Préambule.....	206
2.6.2.	Nécessité de développer l'évaluation écotoxicologique au travers d'essais en microcosmes.....	206
2.6.3.	Acquis des travaux menés à l'Université de Savoie et au L.S.E. en matière d'essais en microcosmes.....	208
2.6.4.	Limites des essais en microcosmes, problèmes rencontrés et pistes de travail.....	213
2.6.5.	Propositions à court et moyen terme.....	222
Références.....		223
Annexes.....		245
ANNEXE 1 : SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE DES TRAVAUX MENÉS SUR DES MICROCOSMES AQUATIQUES.....		247
ANNEXE 2 : COMPOSITION DE DIFFÉRENTES EAUX UTILISÉES DANS LES ESSAIS EN MICROCOSMES.....		255
ANNEXE 3 : RESULTATS DES ESSAIS EN MICROCOSMES RELATIFS AUX ORGANISMES BENTHIQUES.....		259
ANNEXE 4 : PERFORMANCES DES ORGANISMES AU COURS DES ESSAIS EN MICROCOSMES 100 ET 180 L.....		265
ANNEXE 5 : DONNÉES SUR LA VARIABILITÉ DE LA CROISSANCE DES LENTILLES D'EAU EN MICROCOSMES 2 L.....		275
ANNEXE 6 : TENEURS EN HAPS DE SÉDIMENTS PLUS OU MOINS CONTAMINÉS.....		277
ANNEXE 7 : TOXICITÉ DE QUELQUES HAPS VIS-A-VIS D'ORGANISMES AQUATIQUES.....		281
ANNEXE 8 : SYNTHÈSE DES EFFETS DES PERCOLATS DE MIOM À DIFFÉRENTES ÉCHELLES.....		285

Liste des figures

Figure 1. Les mares expérimentales du laboratoire TEPE de l'Université de Savoie	40
Figure 2. Schéma du microcosme 2 L.....	42
Figure 3. Dispositif de microcosme 100 L utilisé dans divers programmes (évaluation de l'écocompatibilité de MIOM et programme Novosol®).....	43
Figure 4. Schéma d'un microcosme « gravière » utilisé dans le programme Novosol®.....	44
Figure 5. Dispositif d'alimentation en continu des gravières	44
Figure 6. Gravières pilotes utilisées dans le programme Novosol®.....	44
Figure 7. Dispositif expérimental pour mesurer le devenir et les effets du dichlorométhane dans Thiébaud et al. (1994).....	54
Figure 8. Chaînes trophiques expérimentales.....	56
Figure 9. Evolution moyenne des paramètres physico-chimiques décrivant la colonne d'eau des témoins au cours des essais en microcosmes 2 L.....	71
Figure 10. Evolution de quelques paramètres globaux de la colonne d'eau au cours d'un essai en microcosmes 2 L témoins sur sédiment naturel prélevé en 2000 dans le Neyrieux.....	71
Figure 11. Relation entre dose de TétraMin incorporé au sédiment artificiel et poids sec des larves de chironomes à 10 et 16 jours	83
Figure 12. Grande Ephémère ayant émergé du sédiment d'Aiguebelette utilisé en microcosmes 100 et 180 L, et tumulus liés à l'activité des Oligochètes du même sédiment.....	86
Figure 13. Schéma des différents stades de développement de <i>Chironomus riparius</i>	95
Figure 14. Imagos femelle (photo de gauche) et mâle (photo de droite) de <i>Chironomus riparius</i>	95
Figure 15. Survie à 10 jours des larves de chironomes des microcosmes témoins et contaminés	97
Figure 16. Poids secs moyens des larves de chironomes témoins au cours des essais en microcosmes 2 L.....	100
Figure 17. Poids secs moyens des larves de chironomes des microcosmes contaminés au cours des essais en microcosmes 2 L.....	100
Figure 18. Emergences cumulées dans un essai en microcosmes 2 L mis en oeuvre sur un percolat de MIOM à 3 concentrations.....	101
Figure 19. Résultats relatifs aux émergences de <i>Chironomus riparius</i> au cours des essais en microcosmes 2 L.....	104
Figure 20. Emergences cumulées de <i>C. riparius</i> lors des deux essais en microcosmes 100 L sur percolats de MIOM.....	106
Figure 21. Piège à daphnies et amphipodes exposés à la colonne d'eau	106
Figure 22. Photo d'un piège à daphnies	107
Figure 23. Piège pour amphipodes/chironomes.....	103
Figure 24. L'amphipode <i>Hyaella azteca</i>	107
Figure 25. Croissance de <i>Hyaella azteca</i> dans les essais en microcosmes témoins 2 L pour lesquels on dispose des données à J7, J14, J21 et J28.....	111
Figure 26. Le cladocère <i>Daphnia magna</i> et l'algue verte <i>Pseudokirchneriella subcapitata</i>	113
Figure 27. Période critique pour le contrôle du développement algal par le broutage des cladocères.....	114
Figure 28. Taux de filtration (mL/daphnie/heure) dans des tests de filtration en conditions statiques à différents teneurs en lindane.....	116
Figure 29. Amélioration de la survie de <i>Daphnia magna</i> en microcosmes contaminés par un percolat de MIOM (concentrations 4 et 8%) après trois réinoculations de daphnies	118
Figure 30. Survie de <i>Daphnia magna</i> et de <i>Simocephalus vetulus</i> au cours de l'essai n°2 sur un sédiment naturel de rivière dopé à la 6PPD.....	118
Figure 31. Reproduction de <i>D. magna</i> au cours d'un essai en microcosmes 2 L sur sédiment 12570 brut et traité Novosol®.....	119
Figure 32. Taux de croissance algale dans des essais en béchers 2 L remplis de milieu OCDE au cours d'essais menées en 1998 et 2001.....	122
Figure 33. Illustration de l'effet du broutage des algues par les daphnies en béchers 2 L (sans sédiment).....	122
Figure 34. Croissance exponentielle des algues en milieu OCDE (béchers 2 L) jusqu'à 7 jours puis début de la phase plateau visible à 11 jours.	122
Figure 35. Evolution de la densité algale en microcosmes 2 L en présence de sédiment artificiel, de daphnies (14 individus initialement), et de 4200 ou 8400 cells/mL en début d'essai	122
Figure 36. Illustration des interactions entre daphnies et algues dans les microcosmes 2 L contaminés par des percolats de MIOM.....	123

Figure 37. Evolution des teneurs en chlorophylle de la colonne d'eau des microcosmes 100 L lors des essais sur percolats de MIOM.....	125
Figure 38. Répartition des populations de cladocères entre les 3 espèces introduites lors du 2 ^{ème} essai sur percolats de MIOM.....	127
Figure 39. Populations de <i>Lemna minor</i> et <i>Spirodela polyrhiza</i> en microcosme 180 L.....	128
Figure 40. Croissance linéaire type en microcosmes de 2 L (sédiment artificiel et sédiment "craie").....	132
Figure 41. Croissance exponentielle type en microcosmes de 2 L (sédiment naturel).....	132
Figure 42. Corrélations plus ou moins bonnes entre poids sec et nombre de frondes dans deux essais en microcosmes 2 L.....	133
Figure 43. Résultats de croissance des deux espèces de lentilles d'eau (<i>Spirodela polyrhiza</i> et <i>Lemna minor</i>) utilisées simultanément dans certains essais en microcosmes 100 et 180 L.....	135
Figure 44. Macrophytes <i>Elodea canadensis</i> en béccher et <i>Myriophyllum spicatum</i>	136
Figure 45. Croissance exponentielle de <i>Myriophyllum spicatum</i> dans l'essai en gravières pilotes.....	138
Figure 46. Exemples de croissance linéaire et exponentielle d' <i>Elodea canadensis</i> dans l'essai en gravières pilote.....	139
Figure 47. Mollusques gastéropodes pulmonés <i>Lymnaea stagnalis</i> et <i>Physa acuta</i> utilisés en microcosmes 100 et 180 L.....	139
Figure 48. Compartiment Limnées en pilote de gravière.....	142
Figure 49. Effet de percolats de MIOM sur la survie et l'activité d'ingestion de <i>Lymnaea stagnalis</i> au cours d'un essai en microcosmes 100 L.....	143
Figure 50. Reproduction de <i>Lymnaea stagnalis</i> lors de l'essai en pilote de gravières 180 L sur sédiments brut et traité.....	143
Figure 51. Croissance de la population de <i>Physa acuta</i> lors de l'essai en pilote de gravières 180 L sur sédiments brut et traité.....	144
Figure 52. Mécanismes de la phototoxicité.....	151
Figure 53. Bioaccumulation du fluoranthène par <i>Daphnia magna</i> , visualisée au microscope à épifluorescence.....	157
Figure 54. Relation entre la dose moyenne de <i>Daphnia magna</i> et l'inhibition moyenne de mobilité après 48 h d'exposition à l'obscurité.....	159
Figure 55. Spectres d'émission de fluorescence des extraits méthanoliques de daphnies mères exposées 12 jours au cours de l'essai en microcosmes n°2 (sédiments craie contaminés à 50 mg/kg) versus spectre du pyrène pur à 1 ppm dans du méthanol.....	159
Figure 56. Scénario d'étude de l'écocompatibilité des flux de polluants émis par les MIOM valorisés en technique routière vis-à-vis d'un écosystème lentique.....	170
Figure 57. Représentation graphique des indices globaux de toxicité BEEP des percolats issus des MIOM 1 et 2, produits en lysimètre de laboratoire (Triffault-Bouchet, 2004).....	174
Figure 58. Logigramme de la démarche d'évaluation en deux étapes (Babut et al., 2002).....	186
Figure 59. Corrélation entre essais monospécifiques et essais en microcosmes sur les données relatives aux réponses des organismes benthiques (<i>C. riparius</i> et <i>H. azteca</i>) en présence de 8 sédiments.....	189
Figure 60. Le sédiment 17000 avant et après traitement par le procédé Novosol®.....	193
Figure 61. Les microcosmes 100 L après immersion des sédiments 17000 brut et traité (programme Novosol® phase 2).....	194
Figure 62. Gravières pilotes après immersion des sédiments 17000 brut (à droite) et traité (à gauche) (programme Novosol® phase 3).....	194
Figure 63. Deux photos montrant l'évolution de la surface du sédiment traité due à l'activité de bioturbation des Oligochètes.....	202

Liste des tableaux

Tableau 1. Objectifs des essais en microcosmes mis en œuvre dans les programmes réalisés	58
Tableau 2. Principales modalités des protocoles d'essais en microcosmes 2 L, 100 L et "gravière".....	59
Tableau 3. Différents milieux utilisés en microcosmes 2, 100 et 180 L.....	63
Tableau 4. Composition nominale de différents milieux d'essai et % de phosphore précipité sous forme d'hydroxylapatite.....	67
Tableau 5. Composition de deux variantes du milieu OCDE modifié utilisé dans les essais en 100 L.....	68
Tableau 6. Evolution des principaux paramètres physico-chimiques de la colonne d'eau au cours d'essais en microcosmes 2 L (28 jours).....	70
Tableau 7. Composition de quelques sédiments artificiels (en % de matière sèche).....	79
Tableau 8. Avantages et inconvénients de l'utilisation de sédiments artificiels ou naturels.....	80
Tableau 9. Caractéristiques physico-chimiques et granulométriques de sédiments naturels utilisés comme références dans divers essais.....	81
Tableau 10. Granulométrie du sédiment artificiel à dominante sableuse utilisé dans l'étude sur la 6PPD.....	82
Tableau 11. Résultats d'émergences lors des essais en microcosmes 100 L et 180 L.....	87
Tableau 12. Valeurs minimales et maximales de la qualité de l'eau surnageante au-dessus des sédiments artificiel et lacustre (Aiguebelette « craie »), enregistrées sur l'ensemble des essais en microcosmes 2L	88
Tableau 13. Valeurs minimales et maximales enregistrées pour les teneurs en métaux lourds des eaux interstitielles des sédiments artificiel et lacustre utilisés au cours des essais en microcosmes 2 L.....	88
Tableau 14. Composition des eaux interstitielles des sédiments artificiels ou naturels utilisés lors des essais en microcosmes de 2 L.....	89
Tableau 15. Organismes introduits dans les microcosmes 2, 100 et 180 L.....	92
Tableau 16. Proportion de résultats de survie $\geq 60, 70$ et 80% pour les larves de chironomes en microcosmes 2 L témoins et contaminés	96
Tableau 17. Statistiques relatives aux coefficients de variation (CV) des moyennes des survies de chironomes.....	98
Tableau 18. Poids secs moyen des larves récupérées à 7, 10, 14, 21 ou 28 jours au cours des essais sur sédiments témoins naturels ou artificiel.....	99
Tableau 19. Statistiques relatives aux coefficients de variation (CV) des moyennes des poids secs de larves de chironomes	101
Tableau 20. Statistiques relatives aux coefficients de variation (CV) des moyennes de paramètres relatifs à l'émergence des chironomes.....	103
Tableau 21. Résumé de l'analyse des critères biologiques relatifs aux chironomes suivis au cours des essais en microcosmes 2 L.....	105
Tableau 22. Proportion de résultats de survie $\geq 60, 70$ et 80% pour les amphipodes en microcosmes 2 L témoins et contaminés.....	109
Tableau 23. Statistiques relatives aux coefficients de variation (CV) des moyennes des survies de amphipodes	109
Tableau 24. Poids secs moyen des amphipodes récupérés à 7 ou 10, 14, 21 et 28 jours au cours des essais sur sédiments témoins naturels ou artificiel (CV : coefficient de variation)	110
Tableau 25. Statistiques relatives aux coefficients de variation (CV) des moyennes des poids secs d'amphipodes	112
Tableau 26. Résumé de l'analyse des critères biologiques relatifs aux amphipodes suivis au cours des essais en microcosmes 2 L.....	113
Tableau 27. Résultats relatifs à la survie des daphnies en microcosmes 2 L témoins et contaminés à 7, 14, 21 et 28 jours.....	117
Tableau 28. Résultats relatifs à la reproduction des daphnies en microcosmes 2 L témoins et contaminés à 7, 14, 21 et 28 jours.....	124
Tableau 29. Résultats relatifs à la teneur en chlorophylle a en microcosmes 2 L témoins et contaminés à 7, 10, 14, 21 et 28 jours.....	124
Tableau 30. Comparaison des populations des petits et grands compartiments dans les essais 100 L.....	128
Tableau 31. Statistiques concernant la croissance (nombre de frondes) de Lemna minor en microcosmes 2 L témoins.....	132
Tableau 32. Statistiques sur la croissance (nombre de frondes) de Lemna minor en microcosmes 2 L contaminés	133

Tableau 33. Fréquence d'occurrence d'effets d'inhibition ou de stimulation de croissance selon le critère de croissance considéré	133
Tableau 34. Propriétés physico-chimiques phénanthrène, du fluoranthène, du benzo(k)fluoranthène, et du pyrène.....	147
Tableau 35. Concentrations nominales et mesurées de sédiments d'Aiguebelette dopés avec du pyrène, et rendements de dopage	149
Tableau 36. Toxicité en phase aqueuse des HAPs étudiés vis-à-vis de <i>Daphnia magna</i> et <i>Hyalella azteca</i>	150
Tableau 37. Seuils de toxicité en sédiment pour HAPs	155
Tableau 38. Synthèse du devenir et des effets de la 6PDD en microcosmes 2 L avec sédiment artificiel (essai n°1) ou sédiment naturel (essai n°2)	167
Tableau 39. Composition élémentaire des MIOM en Europe	169
Tableau 40. Seuils réglementaires définissant les classes de MIOM.....	169
Tableau 41. Caractéristiques physico-chimiques des percolats issus des MIOM 1 (P1 à P3) et MIOM2 (A à H), produits à l'aide d'un lysimètre de laboratoire.....	172
Tableau 42. Résultats (en % d'effluent) des essais monospécifiques mis en œuvre sur percolats de MIOM1 et MIOM2.....	173
Tableau 43. Résultats (CE50 en % d'effluent) des tests écotoxicologiques réalisés sur des fractions de percolats de MIOM dans le cadre du programme Ecocompatibilité	173
Tableau 44. Synthèse des effets observés en microcosmes 2 L contaminés par des fractions de percolats (concentrations testées : 0-1.56-4.00-8.00 %).....	175
Tableau 45. Effets du percolat P2 (MIOM1) sur la survie de <i>Daphnia magna</i> (Dm) et <i>Hyalella azteca</i> (Ha) dans différentes conditions.....	177
Tableau 46. Teneurs en cuivre dans la colonne d'eau et effets observés chez <i>Daphnia magna</i> au cours des essais en microcosmes 2 et 100 L	180
Tableau 47. Pratiques locales des opérations de curage (Capilla, 2005).....	183
Tableau 48. Composition physico-chimique des sédiments étudiés dans le cadre du programme Cetmef/VNF (2001 à 2003)	184
Tableau 49. Synthèse des résultats de caractérisation physico-chimique et écotoxicologique de 8 sédiments étudiés dans le cadre du programme de recherche CETMEF/VNF	188
Tableau 50. Caractéristiques des essais sur sédiments bruts et traités mis en œuvre dans les différentes phases du programme Novosol®.....	196
Tableau 51. Composition physico-chimique des différents prélèvements du sédiment 17000 étudié au cours des programmes « Cetmef/VNF » et « Novosol® ».....	197
Tableau 52. Effets liés à l'immersion du sédiment 17000 brut ou traité dans différents systèmes expérimentaux	199
Tableau 53. Pourcentages de réponses concordantes entre essais (paramètres physico-chimiques et paramètres biologiques confondus).....	203

Curriculum vitae

Ma carrière dans les Sciences de l'Environnement a commencé en 1983, lorsque, élève-ingénieur à l'ENTPE, je me suis inscrit en 3^{ème} année dans la Voie d'Approfondissement du même nom. J'en ai profité pour suivre en parallèle le DEA Gestion et Traitement des Déchets INSA de Lyon/ENTPE qui s'ouvrait pour la première fois et qui a donné l'actuel DEA Sciences et Techniques du Déchet. Attiré par l'Environnement mais pas nécessairement par la recherche, avec laquelle je n'avais eu qu'un bref contact, j'ai pris un poste d'ingénieur dans une Direction Départementale de l'Équipement (55) où je me suis retrouvé à la tête d'une Cellule Environnement dans un service d'Aménagement et d'Urbanisme. A ce poste, j'ai été confronté aux problèmes de terrain (gestion des déchets, aménagement des cours d'eau, études d'impacts d'infrastructures routières, assainissement, ...) qui m'ont permis de compléter ma formation et d'élargir mon expérience.

L'opportunité m'a été donnée en 1987 d'intégrer un laboratoire d'études et de recherche en Environnement (le Laboratoire du Génie de l'Environnement et de l'Écodéveloppement (LG2E) de l'ENTPE), opportunité que j'ai saisie par intérêt pour les activités permettant un réel approfondissement et par une certaine curiosité pour le monde de la recherche que j'avais approché en DEA. Au LG2E j'ai été confronté à divers problèmes propres à ce laboratoire dans une école d'ingénieurs où le statut de la recherche et des enseignants-chercheurs n'était pas encore bien défini (pas d'obligation explicite de passer une thèse). Après un contrat de recherche pour le compte du Plan Urbain sur une question plus proche des sciences humaines que de l'Environnement (la gestion de l'eau à Miribel-Jonage, qui constitue aujourd'hui un thème propice à la pédagogie), ce n'est qu'en 1990 que j'ai pu m'inscrire en thèse à l'Université de Savoie dans un domaine nouveau pour moi, l'Écotoxicologie, ce qui m'a obligé à m'auto-former. La question des lixiviats de décharge faisant alors l'objet de nombreux travaux, y compris au LG2E où Jean-Philippe Deneuvy avait pu passer sa thèse sur l'influence de divers traitements sur la toxicité de ces effluents, j'ai choisi de poursuivre sur ce thème mais en m'attachant essentiellement à mieux caractériser cette toxicité par une batterie de bioessais sur un échantillon de lixiviats de décharges françaises et à en identifier les composantes. Sous la direction à distance du Professeur Gérard Blake (ESIGEC, Université de Savoie), j'ai pu réaliser mes travaux au laboratoire devenu L.S.E. avec l'arrivée d'une nouvelle directrice en 1990 (le Professeur Yvette Bouvet) et soutenir ma thèse en 1994, sans renoncer à mes responsabilités d'enseignant-chercheur au cours de ces 4 années (pilotage de la voie d'approfondissement Environnement-Hydraulique et d'une formation sur l'Eau à destination d'ingénieurs indonésiens, montage du cours d'Écologie, ...).

En août 1994 j'ai obtenu du Ministère de l'Équipement une mise à disposition pour 3 + 2 ans auprès de l'Université de Savoie (ESIGEC), dans le laboratoire Transferts et Effets des Polluants dans l'Environnement (TEPE) dirigé par Gérard Blake. Mon projet était d'élargir mes compétences en me formant aux essais en microcosmes aquatiques extérieurs et de laboratoire. J'ai ainsi pu participer à divers programmes utilisant ces approches et encadrer divers DEA ainsi qu'une thèse (G. Verrhiest).

J'ai réintégré le L.S.E. en septembre 1999 où j'ai naturellement continué à développer la méthodologie des essais en microcosmes de laboratoire au travers de divers programmes appliqués, tout en assurant à distance la direction de la thèse de Ghislaine Verrhiest soutenue en septembre 2001. J'ai assuré la co-direction de la thèse de Gaëlle Triffault-Bouchet qui a été soutenue le 10 février 2004, et j'assure actuellement la co-direction de celle de Nicolas Cauzzi qui doit donner lieu à un rapport et une soutenance en 2006.

Au moment où je termine ce rapport, je suis en charge de la réforme des enseignements en Environnement et Risques sur les deuxième et troisième années de l'ENTPE, appuyé bien sûr par des collègues, et j'ai pris la responsabilité du nouveau Département Ville et Environnement. Le travail sur la réforme, démarré en août 2004, est très consommateur de temps puisqu'il a pour objectifs de revoir la quasi-totalité des enseignements, tout au moins dans le domaine cité, de façon à répondre aux nécessaires évolutions des métiers et du contexte politique (décentralisation, ...) et environnemental (changement climatique, directives européennes, émergence du thème Risques au Ministère, ...) dans lequel les jeunes ingénieurs formés ici évolueront au cours des prochaines années. La réflexion continue alors que les premiers cours sont mis en place, ce qui laisse peu de temps lorsqu'on a également pour ambition de faire le bilan des travaux de recherche menés depuis près de dix ans.

J'ajouterai que monter des formations dans le domaine Environnement et Risques et assurer la direction d'un département Ville et Environnement nécessitent une ouverture importante par rapport au domaine de recherche traité qui, pour être utile et nécessaire, n'en constitue pas moins qu'une modeste contribution à ce domaine.

ETAT CIVIL :

Nom : CLEMENT

Prénom : Bernard

Date de naissance : 1^{er} Novembre 1959

Nationalité : française

Situation familiale : marié, 4 enfants

DIPLOMES :

1977 : Baccalauréat C

1983 :

* Diplôme d'Ingénieur des Travaux Publics de l'Etat (Voie d'Approfondissement Sciences de l'Environnement),

* Diplôme d'Etudes Approfondies "Gestion et Traitement des Déchets" INSA de Lyon/ENTPE

1994 : Doctorat de l'Université de Savoie (spécialité Biologie et Biochimie Appliquées), soutenue à l'ENTPE le 22 avril 1994

2001 : qualification ITPE chercheur sénior

SITUATION PROFESSIONNELLE :

Ingénieur des Travaux Publics de l'Etat depuis 1983, en position normale d'activité au L.S.E. (ENTPE) depuis septembre 1999

DEROULEMENT DE CARRIERE :**1983-1987 :**

Responsable d'une cellule "Environnement" au sein de la Direction Départementale de l'Equipeement de la Meuse (55).

Missions exercées : avis réglementaires, conseil, études d'impacts et études d'aménagement dans le domaine des infrastructures routières, de l'eau, des déchets, des loisirs et du tourisme.

1987-1988 :

Enseignant-chercheur au Laboratoire Génie de l'Environnement et Ecodéveloppement (LG2E) de l'ENTPE.

Missions exercées :

- enseignement sur les 3 années de formation initiale de l'ENTPE dans le domaine de l'Environnement.
- recherche sur le thème de la prise en compte de l'Environnement dans les aménagements urbains (publication : Analyse de l'Histoire et des Enjeux des Aménagements liés à l'Eau sur l'Ile de Miribel-Jonage, LG2E-Plan Urbain, 1988).
- direction intérimaire du LG2E de 1988 à 1989.

1989-1994 :

Enseignant-chercheur au sein du Laboratoire des Sciences de l'Environnement (nouveau nom du LG2E).

Missions exercées :

- enseignement en 2ème année et en 3ème année de l'ENTPE.
- recherche :
 - * thèse de doctorat de 1990 à 1994 (titre : La toxicité aiguë des lixiviats de décharge : apports respectifs et complémentarité des approches biologique et physico-chimique), travail dirigé par le Professeur Gérard Blake, directeur du Laboratoire Biologie et Biochimie Appliquées de l'Université de Savoie (ESIGEC)
 - * mise au point d'un test normalisé AFNOR (XP T90-337) sur lentilles d'eau (*Lemna minor*)
 - * Encadrement du DEA de B. Gaidon (1994)

1994-99 :

Mis à disposition auprès de l'Université de Savoie, ESIGEC, laboratoire T.E.P.E. dirigé par le Professeur Gérard Blake.

Missions exercées :

- enseignement : diverses interventions à l'ESIGEC, l'ENSAM, l'Université Joseph Fourier de Grenoble, et à l'ENTPE.
- recherche : participation à divers programmes, encadrement de 3 DEA, co-direction d'une thèse (G. Verrhiest), de Travaux de Fin d'Etude ESIGEC, participation à un comité d'experts international pour la mise au point d'un test OCDE sur lentilles d'eau, et participation au ring-test organisé par l'OCDE, participation en tant qu'expert invité à un groupe de travail sur l'évaluation écotoxicologique du risque de décharges inertes, EPFL, Lausanne, 1996.

1999-2006 :

Retour à l'ENTPE en position normale d'activité, au L.S.E. (Laboratoire des Sciences de l'Environnement, dirigé par Yves PERRODIN).

Missions exercées :

- enseignement : interventions sur les 2^{ème} et 3^{ème} années de formation initiale de l'ENTPE dans le domaine de l'Environnement, à l'Université Joseph Fourier de Grenoble, au DEA Sciences et Techniques du Déchet de l'INSA, au Mastère Risques de l'ENTPE ; implication dès 2002 dans la réflexion sur la réforme des enseignements de l'ENTPE (1^{ère} maquette) , puis pilotage dès 2004 de la réforme dans le domaine Environnement et Risques.

- recherche : co-direction de 2 thèses, encadrement de 2 TFE ENTPE, de 5 DEA, de stages de Maîtrise et d'IUT, participation à divers programmes, coordination d'un programme de recherche pour le compte d'un industriel (en cours), participation comme expert, pour le compte de la CNR, à la rédaction d'un rapport sur la stratégie de gestion des dragages des sédiments du Rhône.

IMPLICATION DANS DES PROGRAMMES DE RECHERCHE

Programme méthodologique Ecotoxicologie de Rhône-Poulenc 1994-95 « Effet et devenir d'un herbicide, l'IPU, dans des microcosmes extérieurs », contribution à la rédaction des rapports de fin de programme 1994 et 1995.

Contribution au programme Eutrophisation du CEEP (Centre Européen d'Etude des Polyphosphates), de 1995 à 1998.

Participation à un programme PNETOX Sédiments 1998-2000 en partenariat avec le CEMAGREF de LYON , l'INERIS, l'IFREMER, le LPEM, le CSE de METZ, l'Université de Lille. Titre : évaluation de la toxicité de sédiments marins et d'eau douce ; influence de leur composition sur la toxicité de contaminants organiques.

Participation à un programme « sédiments de dragage » pour le compte du CETMEF (Centre d'Etudes Techniques Maritimes et Fluviales) et de VNF (Voies Navigables de France) en partenariat avec le Cemagref de Lyon.

Participation à un contrat de recherche sur le devenir du pyrène, un hydrocarbure polycyclique aromatique, dans les écosystèmes aquatiques, dans le cadre du Programme Environnement, Vie et Société du CNRS (2001-2002), en collaboration avec 3 autres laboratoires : Laboratoire Biochimie et Biophysique des Systèmes Intégrés (CEA-Grenoble), Laboratoire TEPE (ESIGEC - Université de Savoie), Laboratoire LCME (ESIGEC – Université de Savoie).

Coordination du programme « Etude de comportement en scénario de sédiments de dragage traités et non traités et l'évaluation des effets sur des écosystèmes reconstitués » pour le compte de l'entreprise SOLVAY, en partenariat avec Polden-Insavalor et Eedems (fin en 2006).

LANGUES

Anglais courant et scientifique : lu, parlé, écrit

ACTIVITES D'ENSEIGNEMENT

Cours, TD et TP en face à face :

- cours d'Ecologie (20 h) et TP d'Environnement (10 h) en 1^{ère} année de l'ENTPE (1989-94)
- cours Ecologie et TP (30 h) en 1^{ère} année de l'ENTPE (2004, 2005, 2006),
- pilotage avec Cécile Delolme de la semaine Environnement et Risques en 1^{ère} année (2005, 2006) (24 h dont 10 h de face à face)
- cours + TD Environnement (Aménagement de la Loire, 15 h) en 2^{ème} année de l'ENTPE (2000-2003)
- TD Etude de Cas Impacts (36 h) en 3^{ème} année Environnement de l'ENTPE (1990-2003)
- TP Ecotoxicologie (4 heures) en 3^{ème} année Environnement de l'ENTPE (2000-2002),
- cours « l'Eau et le milieu vivant » ((8 heures) dans le cadre du DESS Maîtrise et Gestion de l'Environnement Industriel de l'Université J. Fourier à Grenoble (1995-2002)
- cours « Application des essais en microcosmes à l'évaluation des impacts sur les milieux aquatiques » (2 h) au DEA Sciences et Techniques du Déchet (2001-2004)

- cours « Evaluation des risques écologiques pour les milieux aquatiques » (2 h) au Mastère Risques de l'ENTPE (2002-2003)
- exposé (1 h) sur les tests écotoxicologiques appliqués aux effluents de décharge, dans le cadre du Cours d'Ecotoxicologie de l'EPFL-EAWAG, Lausanne 25 octobre 1995
- quelques exposés ponctuels à l'ESIGEC et à l'ENSAM (Route et Environnement, le lagunage, la production primaire, les indices biologiques) (1995-1999).

Gestion pédagogique :

- en 3^{ème} année de l'ENTPE : responsabilité de la Voie d'Approfondissement Environnement-Hydraulique (équivalent à 300 heures par an) de 1989 à 1993 et de 2000 à 2006,
- montage et suivi d'une formation professionnelle (CES Ingénierie et Gestion de l'Eau) à destination d'ingénieurs indonésiens et vénézuéliens (équivalent à 300 heures par an) de 1988 à 1994,
- montage d'une formation spécifique en 3^{ème} année de l'ESIGEC sur les Sols Pollués (1 semaine en 1999),
- mise en place en 2000 du cours + TD Controverses pour la VA Environnement (30 heures),
- participation en 2002 à la réflexion sur la mise en place de la réforme de l'enseignement de l'ENTPE (groupes de travail : Sciences du Vivant et de la Terre pour la 1^{ère} année, dominante Ville Aménagement Environnement pour les 2^{ème} et 3^{ème} années),
- participation à la redéfinition du cours Dynamique des Ecosystèmes et des TP de 1^{ère} année de l'ENTPE (2003-2004),
- pilotage à partir de 2004 de réforme des enseignements en Environnement et Risques sur les 2^{ème} et 3^{ème} années (près de 800 heures de cours à monter sur la base d'appels à candidatures).

Liste des publications et communications

1. Revues internationales et nationales à comité de lecture

CLEMENT B., BOUVET Y. (1993). Assessment of landfill leachate toxicity using the duckweed *Lemna minor*. Proceed. 2nd Europ. Conf. Ecotoxicol., Amsterdam (The Netherlands), 1992, May 11-15, *Sci. Total Environ.* 1179-1190.

THOMAS O., MAZAS N., GALLOT S., CLEMENT B. (1993). Fast Interpretation of 3D Liquid Chromatography Signals: Application to the Study of Organic Matter in Wastewaters. *Intern. J. Environ. Anal. Chem.* 52 : 179-188.

CLEMENT B., THOMAS O. (1995). Application of ultra-violet absorptiometry and gel permeation chromatography to the characterization of landfill leachates, *Environ. Technol.* 16 : 367-377.

CLEMENT B. and MERLIN G. (1995). The contribution of ammonia and alkalinity to landfill leachate toxicity to duckweeds. *Sc. Total Environ.* 170 : 71-79

CLEMENT B., PERSOONE G., JANSSEN C.R., LE DU-DELEPIERRE A. (1996). Estimation of the hazard of landfills through toxicity testing of leachates. 1. Determination of lachate toxicity with a battery of acute tests, *Chemosphere* 33 : 2303-2320.

CLEMENT B., JANSSEN C.R., LE DU-DELEPIERRE A. (1997). Estimation of the hazard of landfills through toxicity testing of leachates. 2. Comparison of physico-chemical characteristics of landfill leachates with their toxicity determined with a battery of tests, *Chemosphere* 35 : 2783-2796.

CLEMENT B., CADIER C.. (1998) Development of a new laboratory freshwater/sediment microcosm test, *Ecotoxicology* 7 : 279-290.

VERRHIEST G., CLEMENT B., MERLIN G. (2000). Influence of sediment organic matter and fluoranthene-spiked sediments on some bacterial parameters in laboratory freshwater / formulated sediment microcosms, *Aquatic Ecosystem Health Management* 3 : 359-368.

CLEMENT B., MULLER C., VERRHIEST G. (2000). Influence of exposure conditions on the bioavailability of fluoranthene to *Daphnia magna* (Cladocera), *J. Polycyclic Aromatic Compounds* 20 : 259-274.

VERRHIEST G., CLEMENT B., VOLAT B., MONTUELLE B., PERRODIN Y. (2002). Interactions between a polycyclic aromatic hydrocarbons mixture and the microbial communities in a natural freshwater sediment. *Chemosphere* 46 : 187-196.

- VERRHIEST G., CORTES S., CLEMENT B., MONTUELLE B. (2002). Chemical and bacterial changes during laboratory conditioning of formulated and natural sediments, *Chemosphere* 46 : 961-974.
- VERRHIEST G., CLEMENT B., BLAKE G. (2001). Single and combined effects of sediment-associated PAHs on three species of freshwater macroinvertebrates, *Ecotoxicology* 10 : 363-372.
- MERLIN G., VUILLOD M., LISSOLO T., CLEMENT B. (2002). Fate and bioaccumulation of isoproturon in outdoor aquatic microcosms, *Environ. Toxicol. Chem.* 21 : 1236 – 1242.
- BABUT, M., PERRODIN, Y., BRAY, M., CLEMENT, B., DELOLME, C., DEVAUX, A., DURRIEU, C., GARRIC, J., VOLLAT, B., BECART, D., C. CHARRIER (2002). Évaluation des risques écologiques causés par des matériaux de dragage : proposition d'une approche adaptée aux dépôts en gravière en eau. *Rev. Sci. Eau* 15 : 615-639.
- CLEMENT B., DEVAUX A., PERRODIN Y., DANJEAN M., GHIDINI-FATUS M. (2004). Assessment of sediment ecotoxicity and genotoxicity in freshwater laboratory microcosms, *Ecotoxicology* 12 : 323-333.
- CLEMENT B., ZAID S. (2004). A new protocol to measure the effects of toxicants on daphnid-algae interactions, *Chemosphere* 55: 1429-1438.
- TRIFFAULT-BOUCHET G., CLEMENT B., BLAKE G., PERRODIN Y. (2004). Evaluation du potentiel toxique de percolats de mâchefers d'incinération d'ordures ménagères au laboratoire : comparaison de bioessais monospécifiques et d'un essai en microcosme, *Déchets, Sciences et Techniques* 33 : 25-33.
- PERRODIN Y., BABUT M., BEDELL, J.P., BRAY M., CLEMENT B., DELOLME C., DEVAUX A., DURRIEU C., GARRIC J., MONTUELLE B. (2004). Approche méthodologique de l'évaluation des risques écologiques liés à la mise en dépôt sur sol de sédiments de dragage, *Déchets, Sciences et Techniques* 34 : 4-13.
- VULLIET E., CHOVELON J.M., CHOUTEAU C., CLEMENT B. (2004). Assessment of the toxicity of triasulfuron and its photoproducts using aquatic organisms, *Environ. Toxicol. Chem.* 23 : 2837-2843.
- EMMANUEL E., HANNA K., BAZIN C., KECK G., CLEMENT B., PERRODIN Y. (2005). Fate of glutaraldehyde in hospital wastewater and combined effects of glutaraldehyde and surfactants on aquatic organisms, *Environ. Internat.* 31 : 399-406.
- TRIFFAULT-BOUCHET G., CLEMENT B., BLAKE G. (2005). Ecotoxicological assessment of pollutant flux released from bottom ash reused in road construction, *Aquatic Ecosystem Health Management* 8 : 405-414.

CLEMENT B., TRIFFAULT-BOUCHET G., LOTTMANN A., CARBONEL J. (2005). Are percolates released from solid wastes incineration bottom ashes safe for lentic ecosystems ? A laboratory ecotoxicological approach based on 100 litre indoor microcosms, *Aquatic Ecosystem Health Management* 8 : 427-439.

TRIFFAULT-BOUCHET G., CLEMENT B., BLAKE G. (2005). Assessment of contaminated sediments with an indoor freshwater/sediment microcosm assay, *Environ. Toxicol. Chem.* 24 : 2243-2253.

CLEMENT B., CAUZZI N., GODDE M., CROZET K., CHEVRON N. (2005). Pyrene toxicity to aquatic pelagic and benthic organisms in single-species and microcosm tests, *J. Polycyclic Aromatic Compounds* 25 : 271-298

2. Rapports scientifiques et ouvrages

CLEMENT B. (1994). La toxicité aiguë des lixiviats de décharge. Apports respectifs et complémentarité des approches biologique et physico-chimique. Thèse de Doctorat l'Université de Savoie, spécialité Biologie et Biochimie Appliquées, 22 avril 1994, direction G. Blake. Jury : Y. Bouvet, P. Vasseur, R. Gourdon, G. Blake, G. Persoone, O. Thomas, 326 p.

CLEMENT B. (1995). Mesures écotoxicologiques, 141-162. *In* : Métrologie des eaux résiduaires, O. Thomas Ed. Éditions du Cebedeau, Cebedoc Technique et Documentation, 1995, 192 p.

CLEMENT B. (1995-1998). CEEP Research Program on Eutrophication, ESIGEC Final Reports.

FOEKEMA E.M., SCHOLTEN M.C.Th., JAK R.G., HERNANDEZ P., PRATS D., CLEMENT B., BLAKE G., HOORNSMAN G., Van Den VEEN D.P.C., Van Den MEER M., ASENSI J.C., NAVARRO M.J., ANTON P. (1996). Phosphorous-algal response curves: a critical analysis of the Vollenweider model, Technical Report of the 1995 Research Programme, TNO-Report TNO-MEP-R 96/030, 57 pages.

CLEMENT B., VERRHIEST G., BLAKE G. (1999). Evaluation de l'écotoxicité de sédiments marins et d'eau douce : influence de leur composition sur la toxicité de contaminants organiques. Bilan des travaux de la première année effectués au laboratoire T.E.P.E., Université de Savoie/ESIGEC, 28 pages.

CLEMENT B. (2000). The use of microbiotests for assessing the influence of the dilution medium quality on the acute toxicity of chemicals and effluents, in *New Microbiotests for*

- Routine Toxicity Screening and Biomonitoring, G. Persoone, C. Janssen, and W. De Coen Eds., Kluwer Academic/Plenum Publishers, 221-228.
- CLEMENT B. (2000). Etude des dangers d'une substance industrielle (phénylène diamine) rejetée accidentellement en milieu aquatique. Etude *confidentielle* financée par l'industriel concerné à la demande de la DRIRE, 25 pages.
- GARRIC J., BRAY M., VOLLAT B., CLEMENT B., DEVAUX A., DELOLME C., DURRIEU C., BEDELL J.P. (2001). Evaluation écotoxicologique de sédiments contaminés ou de matériaux de dragage. (II). Présentation des méthodes d'essai, rapport Cetmef/Drast et VNF, avril 2001, 46 pages.
- BRAY M., BABUT M., MONTUELLE B., VOLLAT B., DEVAUX A., DELOLME C., DURRIEU C., BEDELL J.P., CLEMENT B. (2001). Evaluation écotoxicologique de sédiments contaminés ou de matériaux de dragage. (III). Application au Canal de l'Est Branche Sud, rapport Cetmef/Drast et VNF, avril 2001, 70 pages.
- BRAY M., BABUT M., VOLLAT B., MONTUELLE B., DEVAUX A., BEDELL J.P., DELOLME C., DURRIEU C., CLEMENT B., PERRODIN Y., TRIFFAULT-BOUCHET G. (2003). Evaluation écotoxicologique de matériaux de dragage : Application à 5 sédiments du Nord-Pas de Calais, rapport Cetmef/Drast/VNF, septembre 2003, 142 pages.
- BABUT M., PERRODIN Y., BEDELL J.P., CLEMENT B., COSNIER S., CORRIGER B., DELMAS H., DELOLME C., DEVAUX A., MIEGE C., PERY A., ROULIER J.L., VOLLAT B. (2003). Méthodologie d'évaluation écotoxicologique de matériaux de dragage : tests de la démarche et essais d'optimisation, Rapport final, août 2003, 90 pages.
- JOUANNEAU Y., BLAKE G., CLEMENT B., DAVID B., NAFFRECHOUX E., (2003). Devenir des hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP) dans un écosystème aquatique et impact sur les organismes vivants : exemple du pyrène. Rapport CNRS-PEVS, Ecosystèmes et Environnement, appel d'offres "Dynamique des contaminants", 126 pages.

3. Communication à des congrès

3.1. Congrès avec actes

- CLEMENT B., DELOLME C., DAMANHURI E. (1991). Improvement of landfill biogas productivity by leachate recycling, in "*Biomass for Energy, Industry and Environment*", Grassi G., Collina A., Zibetta H., Elsevier Ed., 606-610.
- CLEMENT B., DELOLME C., WINIARSKI T., BOUVET Y. (1993). The risks of contamination by leachates of fresh water ecosystems. *Proceedings Sardinia 93, Fourth*

- International Landfill Symposium S. Margherita di Pula, Cagliari, Italy, 11-15/10/93, 1155-1166.*
- CLEMENT B. (1995). Physico-chemical characterization of 25 french landfill leachates, *Proc. 6th Internat. Landfill Symposium, S. Margherita di Pula, Cagliari, Italie, 2-6/10-95 vol 1 : 315-325.*
- TRIFFAULT G., CLEMENT B. (2001). Evaluation de l'impact des flux de pollution émis par les mâchefers d'incinération d'ordures ménagères (MIOM) sur les écosystèmes aquatiques lenticques : approches méthodologiques, *Colloque MIOM 2001, 16-17 et 18/10/01, BRGM Orléans, pp.191-196.*
- CLEMENT B., C. CHARRIER C., A. DEVAUX, J. GARRIC, M. BABUT et Y. PERRODIN (2002). Ecological risk assessment of dredged sediments, *Actes du Colloque Franco-Chinois sur la Protection et l'Utilisation Durable de la Ressource en Eau, Shanghai-Suzhou (Chîne), 6-9 novembre 2002, pp.183-189.*
- BEDELL, J.-P., B. CLEMENT, M. BABUT, M. BRAY, A. DEVAUX, C. DELOLME, C. DURRIEU, J. GARRIC, B. MONTUELLE et Y. PERRODIN (2002). Evaluation du risque écotoxicologique de sédiments contaminés-Application à une voie navigable française. *6ème colloque annuel Chapitre Saint-Laurent "Concrétiser le développement durable: Recherches et réalisations". Québec, Canada: 47.*
- CAUZZI N., CLEMENT B., KAHALE N., DEPELSENAIRE G. (2004). Novosol® process : Sediment stabilisation and valorisation, *WORLD DREDGING CONGRESS XVII "Dredging in a Sensitive Environment", Hamburg, Germany, 27 September – 1 October 2004, 11 pages.*
- TRIFFAULT-BOUCHET, G., B. CLEMENT, G. BLAKE, L. MARTEL et C. BASTIEN (2004). Évaluation du potentiel toxique de sédiments contaminés par utilisation d'un essai en microcosmes de 2 litres. *8ème colloque annuel Chapitre Saint Laurent SRA- SETAC. Québec, Canada.*

3.2. Congrès sans actes (posters)

- CLEMENT B. (1991). A phytotoxicity test using the duckweed *Lemna minor*, SETAC-EUROPE Founding Conference, *Environmental Sciences and Sustainable Development, 7-10 April 1991.*
- CLEMENT B., BOUVET Y. (1992). Assessment of landfill leachate toxicity using the duckweed *Lemna minor.*, *2nd Europ. Conf. Ecotoxicol., Amsterdam (The Netherlands), May 11-15 1992.*

- CLEMENT B., BLAKE G. (1993). The acute toxicity of landfill leachates, *Environmental Impacts Symposium, Swansea (U.K.), 10-14/11 1993*.
- CLEMENT B., THOMAS O. (1994). The toxicity of landfill leachates: bioassays versus UV spectrophotometry, *Workshop on Biosensors and Biological Techniques in Environmental Analysis, Paris, ESPCI, 12-14/9 1994*.
- MERLIN G., CLEMENT B., MERMILLOD A.C., YOSOWIDAGDO R., MOURIOT D., BLAKE G. (1995). Determination of long-term effects of an herbicide on aquatic ecosystems, using outdoor microcosms, *Fifth SETAC-EUROPE Congress, Copenhagen, 25-28 june 1995*.
- MERLIN G., CLEMENT B., MERMILLOD A.C., YOSOWIDAGDO R., BLAKE G. (1995). Assessment of an ecotoxicological approach using indoor microcosms with application of waste water and detergent effluents, *Fifth SETAC-EUROPE Congress, Copenhagen, 25-28 june 1995*.
- CLEMENT B., CADIER C. (1998). The use of sediment organisms in microcosm toxicity testing, in *Abstracts of Interfaces in Environmental Chemistry and Toxicology: from the global to the molecular level, 8th Annual Meeting SETAC-Europe, 14-18 April 1998, Bordeaux (France), p 279*.
- CLEMENT B., PERSOONE G., JANSSEN C., LE DU-DELEPIERRE A. (1998). Application of microbiotests to landfill leachate toxicity testing and comparison with classical tests, *International Symposium on New Microbiotests for Routine Toxicity Screening and Biomonitoring, BRNO (Czech Republic), June 1-3, 1998*.
- CLEMENT B. (1998). The use of microbiotests for assessing the influence of the dilution medium quality on the acute toxicity of substances and effluents, *International Symposium on New Microbiotests for Routine Toxicity Screening and Biomonitoring, BRNO (Czech Republic), June 1-3, 1998*.
- VERRHIEST G., CLEMENT B., MERLIN G. (1998). Assessing the bacterial compartment in laboratory freshwater/sediment microcosms, *3rd AEHMS International Symposium on Sediment Quality Assessment, August 16-19, 1998, Amsterdam*.
- CADIER C., CLEMENT B., MERLIN G. (1998). Toxicity of sediment-associated fluoranthene in a laboratory freshwater microcosm, *3rd AEHMS International Symposium on Sediment Quality Assessment, August 16-19, 1998, Amsterdam*.
- VERRHIEST G., CLEMENT B., J. GARRIC, M.H. LAMY-ENRICI (2000). Toxicity assessment of freshwater sediment-associated phenanthrene : a comparison between

- natural, formulated and conditioned formulated sediments, *Third SETAC World Congress*, Brighton, UK, 21-25 mai 2000.
- VERRHIEST G., CLEMENT B. (2001). Toxicity of a mixture of sediment-associated polycyclic aromatic hydrocarbons (phenanthrene, fluoranthene, benzo(k)fluoranthene) on *Daphnia magna*, *Hyaella azteca* and *Chironomus riparius*, 11th SETAC Europe Annual Meeting, Madrid, Spain, 6-10 May 2001.
- VERRHIEST G., CLEMENT B. (2001). Toxicity of a polycyclic aromatic hydrocarbons mixture on the microbial communities of a natural freshwater sediment, 11th SETAC Europe Annual Meeting, Madrid, Spain, 6-10 May 2001.
- CLEMENT B., DEVAUX A., PERRODIN Y., DANJEAN M., GHIDINI-FATUS M. (2001). Assessment of sediment ecotoxicity and genotoxicity in freshwater laboratory microcosms, 11th SETAC Europe Annual Meeting, Madrid, Spain, 6-10 May 2001.
- CHARRIER C., CLEMENT B., DEVAUX A., GARRIC J., BRAY M., DELOLME C., VOLLAT B., BEDELL J.P., DURRIEU C., BABUT M., PERRODIN Y. (2001). Evaluation du risque écotoxicologique de sédiments contaminés mis en dépôt, *Conférence internationale Lyon Fleuves 2001*, 6 - 7 - 8 juin 2001.
- TRIFFAULT-BOUCHET G., CLEMENT B., PERRODIN Y., BLAKE G. (2002). Effets sur les écosystèmes aquatiques lenticques des flux de pollution émis par les sédiments de dragage de voies d'eau : approches par des essais d'écotoxicité pluri-spécifiques, *Colloque International sur la Gestion Intégrée de l'Eau en Haïti*, Port-au-Prince, Haïti, 26 - 28 juin 2002.
- TRIFFAULT G., CLEMENT B., PERRODIN Y., BLAKE G. (2002). Valorisation des MIOM en technique routière et impact des flux de pollution par ces ouvrages sur les écosystèmes aquatiques lenticques, *Journées Scientifiques et Techniques du Ministère de l'Équipement*, Paris, France, septembre 2002.
- TRIFFAULT-BOUCHET, G., B. CLEMENT, Y. PERRODIN, L. CHÂTEAU et G. BLAKE (2002). Valorisation de MIOM en technique routière et impact des flux de pollution émis par ces ouvrages sur les écosystèmes aquatiques lenticques. Rouen, France, 4^{èmes} journées du réseau scientifique et technique du METL.
- CAUZZI N., CLEMENT B. (2003). Impact of sediment quality on the toxicity of pyrene in aquatic microcosms, 7th International Conference of the Aquatic Ecosystem Health and Management Society : *Scaling from local to global perspectives*, Lyon, 15, 16 et 17 septembre 2003.

CAUZZI N., CLEMENT B., VERNUS E., DEPELSENAIRE G. (2003). Assessment of the ecotoxicity of freshwater sediments treated or non-treated by a physico-chemical process, 7th International Conference of the Aquatic Ecosystem Health and Management Society : *Scaling from local to global perspectives*, Lyon, 15, 16 et 17 septembre 2003.

3.3. Communications orales

CLEMENT B.. La toxicité des lixiviats de décharge. 2ème Congrès du Groupe Rhône-Alpin Pollution et Ecosystèmes (GRAPE), Lausanne (Suisse), 19/11/93.

CLEMENT B., C. MULLER, G. VERRHIEST. Influence of exposure conditions on the bioavailability of fluoranthene to *Daphnia magna* (Cladocera). 17th International Symposium on Polycyclic Aromatic Compounds, Bordeaux (France), 25-29 Octobre 1999.

CLEMENT B. (2001). Fate and toxicity of pyrene in two lake sediments with contrasted characteristics, Séminaire scientifique « Biodisponibilité des Contaminants et Matière Organique dans les écosystèmes aquatiques », Cemagref de Lyon, 27/09/01.

CLEMENT B. (2002). Interactions HAP/organismes aquatiques, « Impact des HAP engendrés par le trafic routier et autoroutier sur les écosystèmes aquatiques de montagne », Séminaire organisé au Bourget du Lac le 28/02/02 par l'Université de Genève et l'Université de Savoie.

VULLIET E., EMMELIN C., CLEMENT B., CHOVELON J.M. (2002). Evaluation de la toxicité des produits issus de la dégradation photochimique du triasulfuron. 2^{ème} Colloque du GMRE et XXXIIème congrès du GFP, "Analyse de traces, bioproduits et qualité de l'Environnement", 29-31 mai 2002, Marrakech (Maroc).

CLEMENT B., C. CHARRIER, A. DEVAUX, J. GARRIC, M. BABUT et Y. PERRODIN (2002). Ecological risk assessment of dredged sediments, Colloque Franco-Chinois sur la Protection et l'Utilisation Durable de la Ressource en Eau, Shanghai-Suzhou (Chine), 6-9 novembre 2002.

TRIFFAULT-BOUCHET G., CLEMENT B., PERRODIN Y. (2003). Ecotoxicological assessment of pollutant flux released from MSWI bottom ashes used in road construction - An approach based on single-species tests and microcosm assays, 7th International Conference of the Aquatic Ecosystem Health and Management Society : *Scaling from local to global perspectives*, Lyon, 15, 16 et 17 septembre 2003.

CLEMENT B., TRIFFAULT-BOUCHET G., LOTTMANN A., CARBONEL J. (2003). Are percolates released from MSWI bottom ashes safe for lentic ecosystems ? A laboratory

ecotoxicological approach based on 100-L indoor microcosms, 7th International Conference of the Aquatic Ecosystem Health and Management Society : *Scaling from local to global perspectives*, Lyon, 15, 16 et 17 septembre 2003.

TRIFFAULT-BOUCHET G., CLEMENT B., BLAKE G., MARTEL L., BASTIEN C. (2004) Évaluation du potentiel toxique de sédiments contaminés par utilisation d'un essai en microcosmes de 2 litres. *8^{ème} colloque annuel Chapitre Saint Laurent SRA- SETAC*, Québec, Québec, Canada. 3-4 juin 2004.

CLEMENT B., PERRODIN Y. (2004). Indicateurs de laboratoire d'évaluation préalable des impacts écotoxicologiques : l'exemple des microcosmes. Séminaire « Approches des impacts des infrastructures de transport sur l'Environnement. Quelles données ? Quels indicateurs ? » LCPC Nantes, 16-17 nov. 2004.

DELOLME C., BEDELL J.P., CLEMENT B., DURRIEU C., PERRODIN Y. (2005). Mesure de l'écotoxicité de sédiments de l'assainissement urbain. Séminaire « Caractérisation et valorisation des sédiments et autres sous-produits de l'assainissement des chaussées », LCPC Nantes, 15-16 nov 2005.

DELOLME C., CLEMENT B., DEVAUX A., BEDELL J.P., DURRIEU C., PERRODIN Y. (2005). Apport de l'écotoxicologie dans la démarche de choix des filières de traitement et de gestion des sédiments. Séminaire « Caractérisation et valorisation des sédiments et autres sous-produits de l'assainissement des chaussées », LCPC Nantes, 15-16 nov 2005.

4. Encadrement de travaux

4.1. Thèses soutenues

VERRHIEST G. (2001). Toxicité de sédiments d'eau douce contaminés par des HAPs. Influence de la nature des sédiments sur la biodisponibilité des HAPs, Thèse de Doctorat de l'Université de Savoie (spécialité : Biologie et Biochimie Appliquées).

TRIFFAULT-BOUCHET G. (2004). Effets sur les écosystèmes aquatiques lenticques des émissions de polluants provenant de différents modes de valorisation/élimination de déchets. Application à des mâchefers d'incinération d'ordures ménagères et à des boues de dragage de canaux, Thèse de Doctorat de l'Université de Savoie (spécialité : Biologie et Biochimie Appliquées), 311 pages.

4.2. Thèse en cours

CAUZZI N.. Impact environnemental de sédiments de dragages traités par un procédé thermique et physico-chimique et stockés en gravière : évaluation par une approche en microcosmes à différentes échelles, inscription en janvier 2003 dans la formation doctorale Sciences et Techniques du Déchet de l'INSA de LYON.

4.3. Diplômes d'Études Approfondies

GAIDON B. (1994). Le problème de la prise en compte de la double complexité effluent/milieu récepteur dans l'évaluation écotoxicologique des effluents. DEA Analyse et Modélisation des Systèmes Biologiques, ENTPE, Rapport bibliographique, janvier 94.

GAIDON B. (1994). Evaluation d'une méthodologie de prise en compte des caractéristiques physico-chimiques du milieu récepteur dans les tests de toxicité aiguë, DEA Analyse et Modélisation des Systèmes Biologiques, ENTPE, Rapport technique, août 94.

CADIER C. (1997). Mise au point méthodologique d'un microcosme aquatique à compartiment sédimentaire. DEA "Méthodes de recherche sur l'Environnement et la Santé", ESIGEC, juin 1997.

VERRHIEST G. (1998). Etude du compartiment bactérien dans des tests de microcosmes de laboratoire. DEA "Méthodes de recherche sur l'Environnement et la Santé", ESIGEC, juin 1998.

MULLER C. (1999). Biodisponibilité du fluoranthène chez *Daphnia magna*. DEA "Méthodes de recherche sur l'Environnement et la Santé", ESIGEC, juin 1999.

GODDE M. (2001). Evaluation de la toxicité du pyrène sur des organismes aquatiques au moyen de tests monospécifiques. Mémoire de DEA Sciences et Techniques du Déchet, INSA de Lyon, 53 pages.

ZAID S. (2001). Eutrophisation et toxicité : effets de certaines substances toxiques (cuivre et lindane) sur l'activité de broutage de *Daphnia magna*. Mémoire de DEA Toxicologie de l'Environnement, Université de Metz, 54 pages.

CAUZZI N. (2002). Devenir des hydrocarbures aromatiques polycycliques dans un écosystème aquatique et impact sur les organismes vivants : exemple du pyrène. Mémoire de DEA Toxicologie de l'Environnement, Université de Metz, 60 pages.

ELBOUZZAOUI I. (2002). Evaluation de l'écotoxicité de mâchefers d'incinération d'ordures ménagères (MIOM) ; étude de quelques paramètres influençant les résultats de toxicité. Mémoire de DEA Sciences et Techniques du Déchet, INSA de Lyon, 55 pages.

CARBONEL J. (2003). Conception d'essais écotoxicologiques en microcosmes aquatiques de laboratoire, étude de la variabilité. Rapport de DEA Analyse et Modélisation des Systèmes Biologiques, Lyon I, 50 pages.

LOTTMANN A. (2003). Application d'un protocole d'essais écotoxicologiques en microcosmes de 100 litres à l'étude d'un percolat de mâchefers d'incinération d'ordures ménagères. Mémoire de DEA Toxicologie de l'Environnement, Université de Metz, 65 pages.

VAILLE G. (2005). Réalisation d'un essai écotoxicologique en pilote de gravière sur un sédiment contaminé avant et après traitement physico-chimique et thermique. Mémoire de Master Sciences de l'Environnement Industriel et Urbain, INSA de LYON-ENTPE, 102 pages.

4.4. Travaux de Fin d'Etudes

SAILLARD S. (1996). Etude bibliographique sur l'usage des bioessais dans les pratiques d'autorisation de rejets d'effluents, mémoire de Travail de Fin d'Etudes de l'ESIGEC.

AVRAIN N. (2000). Essai en microcosmes sur un sédiment naturel contaminé par un mélange d'HAPs, rapport de Travail de Fin d'Etudes de l'ENTPE, 37 pages + annexes.

CARBONEL J. (2003). Conception d'essais écotoxicologiques en microcosmes aquatiques de laboratoire. Etude de la variabilité, rapport de Travail de Fin d'Etudes de l'ENTPE, 61 pages.

4.5. Stages DUT ou Maîtrise

CHALBOS V. (1994). Détermination de la toxicité de l'ammoniaque en fonction du pH, mémoire de stage de DUT, IUT Biologie Appliquée de Lyon I, Génie Biologique option Agronomie.

LE TANOU J. (1998). Choix d'une méthode d'extraction solide-liquide du fluoranthène, mémoire de stage d'IUT Louis Pasteur de Schiltigheim.

BEZET J. (1999). Effet du fluoranthène sur l'activité de filtration de *Daphnia magna*, mémoire de stage de Terminale BTA Laboratoire du Lycée technique Les Mandailles.

DUQUESNE Christel (2000). Dosage du fluoranthène chez *Daphnia magna* exposée dans différentes conditions, mémoire de stage de DUT, IUT Biologie Appliquée de Lyon I.

RENOY M. (2000). Effet du fluoranthène sur la mobilité et la survie de *Daphnia magna* dans différentes conditions de lumière et de densité algale. mémoire de stage de DUT, IUT Biologie Appliquée de Lyon I.

NAAS S. (2002). Réalisation d'un protocole de microcosmes d'eau douce de 100 litres dans le cadre des essais sur percolats de MIOM, rapport de stage de DU d'Unité d'Expérience Professionnelle.

LAVIGNE C. (2002). Suivi de la bioaccumulation du pyrène par les organismes de microcosmes aquatiques, mémoire de stage de DUT, IUT Biologie Appliquée de Lyon I.

CROZET K. (2003). Partition/Evolution du pyrène en milieu aquatique et biodisponibilité vis à vis de *Daphnia magna*, mémoire de stage de DUT, IUT Biologie Appliquée de Lyon I, Génie Biologique option Agronomie.

MIGNON H. (2005). Evaluation de la toxicité de lixiviats d'un sédiment contaminé avant et après traitement, en relation avec leur composition physico-chimique, Mémoire de stage de DUT Génie chimique, génie des procédés, 34 pages.

Coopération internationale

1. Avec des pays membres de l'OCDE

En 1997, alors en poste au laboratoire TEPE (ESIGEC) j'ai été invité à participer, aux côtés d'experts américains, néerlandais, suédois, anglais, italiens, à la mise au point d'un guideline OCDE pour la mise en œuvre d'un test sur lentilles d'eau. Cette coopération s'est traduite par la production de contributions écrites et orales (document de travail sur la variabilité de la croissance des lentilles d'eau pour B. Clément), la participation à deux séminaires de travail à Ispra (European Chemicals Bureau, Italie) et Londres (Water Research Centre, Grande Bretagne), et la réalisation d'un ring-test. Ce travail a abouti au guideline "OECD *Lemna* growth inhibition test".

2. Avec les Pays-Bas et l'Espagne

Un contrat avec le Centre Européen d'Etude des Polyphosphates (CEEP) sur l'impact des lessives sur le milieu aquatique puis la mise au point d'approches à différentes échelles de l'incidence de substances toxiques sur l'eutrophisation des plans d'eau, a impliqué Bernard Clément, alors en poste au TEPE (ESIGEC). Ce contrat a permis de coopérer avec des chercheurs néerlandais (TNO, Den Helder) et espagnols (Université d'Alicante), chaque laboratoire travaillant à une échelle différente (microcosmes de 2 ou 80 L, enclos lacustres de 4 m³). Plusieurs réunions de travail ont eu lieu sous l'égide du CEEP à Alicante, Den Helder et Anvers.

3. Avec le Québec

Une coopération scientifique entre des organismes de recherche du Québec et de la France a été engagée à partir de 2002 et se poursuit en 2003-2004 sur le thème *Développement d'outils d'évaluation de la biodisponibilité des contaminants et de leurs impacts environnementaux*. L'équipe « microcosmes » du L.S.E. est, dans cette coopération, partenaire du Centre d'Expertise et d'Analyse Environnementale du Québec (CEAEQ, Louis Martel et Christian Bastien) pour l'activité 2 « Mise en commun de méthodes innovantes : projet post-doctoral sur le transfert et la validation du protocole microcosmes L.S.E. vers le CEAEQ – 2004 ». Le CEAEQ est intéressé par un transfert de la méthodologie des microcosmes aquatiques vers le CEAEQ, au travers du post-doctorat de Gaëlle Triffault-Bouchet qui doit se dérouler dans cet organisme à partir de Mars 2004. Ce transfert de compétences sera l'occasion d'adapter l'outil aux besoins du CEAEQ et d'optimiser le protocole, de manière à répondre à un certain nombre de questions concernant notamment la répliquabilité, la répétabilité et la reproductibilité de la méthode lorsqu'elle est utilisée sur des sédiments naturels. Un premier séminaire de travail destiné à préparer le stage post-doctoral a eu lieu les 6, 7 et 8 octobre 2003 à l'occasion de la visite de Christian Bastien.

Présentation des travaux

1. Introduction

1.1. La place de l'écotoxicologie au sein du Ministère de l'Équipement

Le Ministère de l'Équipement des Transports et du Logement exerce des missions d'équipement et d'aménagement du territoire telles que le développement du réseau routier et autoroutier, la collecte et le traitement des eaux usées, et des déchets solides. Ces équipements génèrent, par les activités qu'ils permettent (transports, assainissement, ...), des impacts sur l'Environnement, qui se traduisent en particulier par l'émission de polluants (pollution organique, métaux, COV, HAPs, pesticides, PCB et dioxines, etc.), dans l'air, dans les sols et dans les eaux superficielles et souterraines. Si la modernisation du pays dans les années 50 a pu, dans un premier temps, faire passer au second plan les préoccupations liées à la protection de l'environnement et de la santé humaine, l'anthropisation croissante de notre environnement, la montée de la conscience écologique (pour l'épanouissement de laquelle il reste encore beaucoup à faire ...), et le développement des connaissances ont abouti à la mise en place à partir des années 70 de lois et réglementations (loi sur la protection de la nature, lois sur l'eau, l'air et les déchets, etc.) visant à fournir un cadre pour la régulation des activités susceptibles d'entraîner des perturbations sur les milieux et les populations. Aujourd'hui, avec la prise de conscience de la portée locale mais aussi globale de nos activités (effet de serre, changement climatique), la nécessité de choix compatibles avec un développement durable apparaît évidente, même si elle n'est pas toujours mise en pratique. Dans cette logique, le Laboratoire des Sciences de l'Environnement (L.S.E.) mène depuis 1990 des activités de recherche sur l'évaluation de l'impact des polluants, en se concentrant sur les sols et les milieux aquatiques (eaux douces superficielles et souterraines). Quinze ans après, la lutte contre la pollution des eaux, pourtant identifiée comme de la plus haute importance depuis plusieurs décennies, est encore malheureusement d'une actualité urgente, ce qui confère aux recherches du L.S.E. toute leur légitimité. En effet, l'état écologique des eaux françaises au sens de la Directive Cadre sur l'Eau étant déjà de piètre qualité, l'évaluation des risques pour les écosystèmes, liés en particulier aux pratiques en plein développement de valorisation des déchets (mâchefers d'incinération d'ordures ménagères, sédiments de dragage, boues de bassins de récupération des eaux de chaussées, ...) comme matériaux de génie civil, est un maillon essentiel d'une politique de prévention des pollutions. L'évaluation de l'impact des polluants sur les écosystèmes correspondants nécessite des investigations à trois niveaux :

- la caractérisation sur le plan quantitatif et qualitatif de la pollution émise,

- l'étude du devenir des polluants dans l'environnement,
- la caractérisation de la réponse des écosystèmes à l'aide de bioindicateurs et biomarqueurs spécifiques.

Les trois niveaux d'intervention ci-dessus sont abordés au L.S.E. à travers deux axes de recherche principaux :

- axe 1 : Comportement des polluants dans les milieux poreux
- axe 2 : Effets des polluants sur les organismes terrestres et aquatiques.

L'écotoxicologie offre une approche appropriée pour le développement de l'axe 2. Elle est en effet définie comme « *le domaine d'étude qui intègre les effets écologiques et toxiques des polluants chimiques sur les populations, les communautés et les écosystèmes ainsi que leur devenir (transfert, transformation, dégradation) dans l'environnement* » (Forbes et Forbes, 1994).

Cette discipline comporte plusieurs aspects ou domaines d'étude (Lagadic et Caquet, 1996 ; Forbes et Forbes, 1994 ; Ramade, 2002 ; Fent, 2003), tous interdépendants les uns des autres :

- le *monitoring* des polluants dans l'environnement par le biais d'analyses chimiques et l'usage d'espèces animales et végétales indicatrices de contamination et/ou de biomarqueurs d'exposition,
- l'étude du devenir des polluants dans un écosystème récepteur ; leur transfert entre les différents compartiments abiotiques des écosystèmes ainsi qu'entre ces compartiments abiotiques et les organismes vivants, les transformations physico-chimiques et biologiques qu'ils peuvent subir et les conséquences sur leurs potentiels toxiques, etc.,
- les modalités et mécanismes d'action des polluants,
- la prévision des effets des polluants sur la structure et le fonctionnement des écosystèmes.

1.2. Intérêt des essais en microcosmes

La prédiction des effets de composés toxiques sur les écosystèmes récepteurs, qui est l'un des objectifs majeurs de l'écotoxicologie, est basée sur des outils et des méthodes dont la pertinence, au regard de l'objectif visé, est inversement proportionnelle au coût et à la simplicité. Les plus aisés à mettre en œuvre sont les tests monospécifiques réalisés au laboratoire dans des conditions standardisées. Une seule espèce, considérée comme représentative d'une classe d'organisme d'un niveau trophique donné ou/et comme cible

privilegiée du toxique par sa place ou son rôle dans l'écosystème, est étudiée. Ces tests sont caractérisés par leur simplicité et rapidité de mise en œuvre, leur sensibilité, leur répétabilité, leur reproductibilité et leur coût économique modéré (Kimball et Levin, 1985 ; Calow, 1993). Les conditions biotiques (espèce, âge) et abiotiques (température, photopériode, nature de l'éclairage, temps d'exposition, composition physico-chimique du milieu) sont contrôlées et standardisées ce qui permet une comparaison des résultats obtenus notamment sur différents polluants et entre différents laboratoires (Taub, 1989a). Ils constituent ainsi une première approche d'évaluation du danger. Par ailleurs, ces tests sont le plus souvent associés pour former une batterie de tests afin de réaliser un screening du potentiel toxique des contaminants considérés. Les espèces tests étudiées sont issues de différents niveaux trophiques d'un écosystème récepteur considéré. C'est cette démarche qui a été privilégiée au cours de ma thèse sur l'évaluation de la toxicité des lixiviats de décharge (Clément, 1994), notamment par la mise en œuvre d'une batterie de bioessais sur des organismes de différents niveaux trophiques (microalgues et lentilles d'eau pour les producteurs primaires, microcrustacés pour les consommateurs primaires, bactéries luminescentes et rotifères pour les décomposeurs et détritivores). Même utilisés en batterie, ils ne peuvent cependant constituer un outil permettant de prédire les effets d'un toxique sur les écosystèmes naturels (Taub, 1997). La réponse de ceux-ci n'est pas prédictible à partir des réponses de quelques espèces testées isolément au laboratoire, car le fonctionnement des écosystèmes naturels dépend de processus en œuvre à différents niveaux d'organisation biologique, ceux des individus, des populations, des communautés et de l'écosystème (Cairns *et al.*, 1992). Ils ne représentent donc pas à eux seuls un outil valable de prédiction des risques sur l'environnement mais restent essentiels (Pratt *et al.*, 1987). Cette opinion généralement admise est cependant souvent remise en question par les partisans des tests monospécifiques. Pascoe *et al.* (2000) et Girling *et al.* (2000), par exemple, ont testé différentes substances (lindane, cuivre, atrazine, dichloro-aniline (DCA)) au moyen d'approches allant des tests monospécifiques aux mésocosmes en passant par des tests multi-espèces, et soit n'ont pas obtenu d'effets en mésocosmes à des concentrations inférieures aux plus basses concentrations à effet en tests monospécifiques (cas du cuivre, du lindane et de l'atrazine), soit ont obtenu des effets en mésocosmes à une concentration de seulement 16 fois la plus basse concentration à effet détectée au laboratoire pour la DCA. Ils en concluent, probablement rapidement compte tenu du faible nombre de substances testées, qu'une batterie de tests monospécifiques correctement conçue peut permettre de prédire, moyennant

un facteur d'application faible (ici de 16 dans l'exemple de la DCA), le risque écologique lié aux polluants qui contaminent les écosystèmes.

A l'opposé des tests monospécifiques, les études *in situ* permettent d'étudier les impacts en conditions réelles et en vraie grandeur d'une contamination du milieu par une (ou des) substance(s) toxiques(s), mais posent d'énormes problèmes méthodologiques (Barry et Logan, 1998) (comment isoler les effets des substances étudiées du bruit de fond provoqué par la présence d'un grand nombre d'autres substances, sur quel écosystème de référence se baser pour mesurer un effet ?) et sont très coûteuses.

Les systèmes expérimentaux (microcosmes et mésocosmes) dans lesquels une ou plusieurs variables peuvent être contrôlées s'avèrent très utiles pour des évaluations à caractère prédictif (Solomon et Sibley, 2002). Les essais en mésocosmes ou en microcosmes extérieurs (écosystèmes reconstitués d'un volume variant entre quelques m³ à plusieurs dizaines voire centaines de m³ et généralement soumis aux aléas climatiques et à une certaine colonisation naturelle, Larsen *et al.*, 1986; Lay *et al.*, 1993; Caquet *et al.*, 1996; Giddings *et al.*, 1994; Heimbach *et al.*, 1992; Tidou *et al.*, 1992) permettent de résoudre en partie les problèmes méthodologiques posés par les études *in situ* (contamination contrôlée, possibilité de systèmes témoins, ...). Les essais en microcosmes de laboratoire (systèmes de quelques litres à quelques dizaines de litres placés dans des conditions contrôlées de température et d'éclairage), encore appelés tests multi-espèces, constituent un bon compromis, en termes de coût et de pertinence écotoxicologique, entre les tests monospécifiques, qui sont difficilement utilisables pour évaluer l'impact de produits chimiques à des niveaux d'organisation biologique supérieurs comme l'écosystème (Kimball et Levin, 1985 ; Cairns et Pratt, 1989; Pontasch *et al.*, 1989; Cairns *et al.*, 1992; Forbes et Forbes, 1994 ; Taub, 1997 ; Sanchez et Tarazona, 2002), et les essais en microcosmes extérieurs (Barry et Logan, 1998). Ils offrent en effet un grand nombre de critères d'effets et prennent en compte les interactions entre espèces (compétition, prédation, ...), tout en présentant un niveau de standardisation et de répliquabilité suffisant (Cairns et Cherry, 1993). Il convient de préciser que les microcosmes ne sont pas des écosystèmes en miniature, mais des fragments d'écosystème conçus pour simuler des caractéristiques sélectionnées (Cairns et Buikema, 1984 in Forbes et Forbes 1994). Le fait de contrôler la structure influence la réponse, qui est sensible à la structure (Crow et Taub, 1979 in Forbes et Forbes 1994).

1.3. Un exemple d'utilisation de microcosmes extérieurs

Le Laboratoire Biologie et Biochimie Appliquées de l'ESIGEC/Université de Savoie (qui a pris le nom de TEPE par la suite) a été impliqué de 1993 à 1995 dans le programme Long Terme Environnement de Rhône-Poulenc. Il s'agissait de tester en conditions extérieures le devenir et les effets de l'Isoproturon (IPU), un herbicide de la famille des urées substituées. L'objectif était en particulier de mettre au point des outils de détection des effets de cet herbicide à des concentrations proches de situations réelles. Six mares d'un volume d'environ 6 m³ chacune (**figure 1**) ont été créées pour représenter, la première année (1994), trois situations écologiques (sédiment tourbeux, sableux ou carbonaté, zonation végétale de macrophytes, milieux à dominante planctonique), et, la deuxième année (1995), une seule situation (sédiment tourbeux et bordure de plantes). Dans les deux cas, une seule concentration en IPU (10 µg/L) a été testée, ce qui a permis de disposer d'un réplicat par situation écologique en 1994 et de 3 réplicats témoins et 3 réplicats contaminés en 1995. J'ai été associé à mon arrivée au laboratoire au second essai qui a duré 51 jours (contre 100 jours en 1994). Le devenir de l'IPU a été suivi par dosages dans l'eau des bassins et dans les organismes (Merlin *et al.*, 2002), les effets ont été mesurés sur le zooplancton et le compartiment des producteurs primaires, cible principale de la substance testée. En particulier, des inventaires de plantes ont été réalisés en fin d'essai, la croissance des tiges des plantes émergées (*Typha latifolia*) a pu être suivie au cours des essais, et des mesures d'induction de fluorescence et de production d'oxygène ont permis de mesurer les effets de l'IPU sur l'activité photosynthétique. Les résultats montrent que les teneurs en IPU de la colonne d'eau décroissent assez rapidement (temps de demi-vie de 13 à 37 jours selon la situation écologique représentée), et que l'IPU est peu accumulé par les invertébrés mais est bien retrouvé dans les plantes. Des effets sur la croissance des plantes et des effets indirects sur la structure du zooplancton ont pu par ailleurs être mis en évidence, mais ces effets sont restés modérés à la concentration testée.

1.4. Développement de protocoles de microcosme de laboratoire

Les essais sur mares extérieures nécessitent la mobilisation d'une équipe de recherche entière et un financement important qu'il n'est pas toujours facile d'obtenir. Par ailleurs, de telles études doivent être précédées d'essais plus simples qui permettent de définir les écosystèmes représentés (cibles biologiques par exemple) et de choisir la (ou les) concentration(s) à tester. Dans le souci de conserver un certain niveau de complexité et de pertinence écologique, ces essais peuvent être des essais en microcosmes de laboratoire. De tels essais constituent par



Figure 1. Les mares expérimentales du laboratoire TEPE de l'Université de Savoie

ailleurs une alternative aux essais monospécifiques, même utilisés en batterie comme je l'ai fait dans ma thèse, et les résultats acquis peuvent être suffisants pour se passer d'essais plus complexes en microcosmes/mésocosmes extérieurs. Fort de ce constat effectué juste après la fin du programme IPU, j'ai entrepris de développer des compétences sur ce créneau des essais en microcosmes de laboratoire.

Dans le domaine des microcosmes de laboratoire simulant de façon schématique un écosystème d'eaux stagnantes à plusieurs niveaux trophiques et présentant les qualités requises pour tout test écotoxicologique (facilité de mise en œuvre, reproductibilité, sensibilité, etc.) il existe relativement peu de méthodes dans la littérature. Les travaux menés en microcosmes de quelques litres pendant plusieurs années à l'Université de Savoie pour l'étude du devenir et des effets écotoxiques de substances et d'effluents (Merlin et Blake, 1991; Merlin *et al.*, 1992, 1993, 1994; Yosowidagdo, 1996) ont permis de disposer d'un bon point de départ et des compétences présentes sur place. Ces microcosmes (**figure 2**) étaient le plus souvent constitués d'une colonne d'eau (milieu synthétique) où se développaient des algues microscopiques, des lentilles d'eau et des cladocères (daphnies), et d'un sédiment (sable de Fontainebleau + chitine) qui constituait un support pour des macrophytes enracinées (bryophytes, élodées, *Groenlandia*), des mollusques (gastéropodes) et des crustacés (aselles). On peut citer également l'approche normalisée des Standardized Aquatic Microcosms (SAM) (Conquest et Taub, 1989; Taub, 1989a, 1989b), qui permet de tester dans des systèmes de 3 litres les effets sur 63 jours de substances toxiques sur une communauté diversifiée d'organismes de laboratoire (10 espèces d'algues, daphnies, amphipodes, ostracodes, protozoaires, rotifères). En dépit de son caractère de méthode normalisée, ce protocole est lourd à mettre en œuvre, nécessitant une bonne maîtrise des

cultures et élevages ainsi qu'une dépense élevée de temps et d'énergie pour le suivi des systèmes et l'acquisition des données. Par ailleurs, la composante sédiment, comme dans les microcosmes développés à l'Université de Savoie, est réduite à un support physique (sable + chitine + cellulose) pour certains organismes épibenthiques (algues, amphipodes et ostracodes) mais ne contient aucun organisme benthique proprement dit (c'est-à-dire vivant au sein du sédiment) et n'est pas destinée à constituer la source de contaminant(s).

Partant de cette analyse bibliographique et des critiques qu'on peut formuler à l'égard des protocoles existants, nous avons mis au point un nouveau protocole à partir de 1996 (Clément et Cadier, 1998).

Le microcosme retenu simule de façon schématique une portion d'écosystème lentique, avec possibilité de renouveler la colonne d'eau (essai statique ou semi-statique). Sont suivis sur 28 jours : la physico-chimie de la colonne d'eau et du sédiment (incluant le cas échéant un suivi analytique de la (ou des) substance(s) étudiée(s)), la survie et la reproduction des daphnies, la croissance des algues et des lentilles d'eau, la survie, la croissance et l'émergence des chironomes, la survie et la croissance des amphipodes.

Ces effets ne peuvent bien entendu pas être interprétés indépendamment les uns des autres, du fait de l'existence d'interactions entre certaines espèces (ex: broutage des algues par les cladocères), ni sans la connaissance du devenir du (des) toxique(s) incorporé(s) initialement au système. La taille réduite des microcosmes permet de travailler avec un niveau assez élevé de réplication et autorise un maniement plus aisé. Le fait d'utiliser des espèces faisant l'objet de tests normalisés permet par ailleurs la comparaison des résultats obtenus en microcosmes avec ceux obtenus en tests monospécifiques dans ce même laboratoire ou reportés dans la littérature, donc de comprendre en quoi la prise en compte d'un certain niveau de complexité peut améliorer l'extrapolation des résultats de laboratoire aux effets à attendre *in situ*.

Il y a trois ans, l'intérêt et l'opportunité de développer un microcosme de laboratoire de plus grande taille sont apparus au cours d'études particulières. Un tel microcosme, d'un volume de 100 litres (**figure 3**), permet de diversifier l'écosystème par l'ajout de nouvelles espèces (cladocères, gastéropodes, hydrophytes enracinées), de suivre des critères biologiques supplémentaires (par exemple reproduction des amphipodes, croissance du périphyton), et de gagner ainsi en pertinence écologique. Il devient possible d'allonger la durée des essais, de 30 jours avec le microcosme de 2 litres, à plusieurs mois avec le microcosme de 100 L. La taille des systèmes permet par ailleurs d'introduire des pièges et compartiments qui autorisent un suivi de certains organismes exposés au sein du système dans des conditions particulières (par exemple exposés seulement à la colonne d'eau, ou/et en interdisant certaines interactions

avec le milieu ou d'autres organismes), tout en offrant toute la complexité de l'écosystème reconstitué pour les populations y évoluant librement.

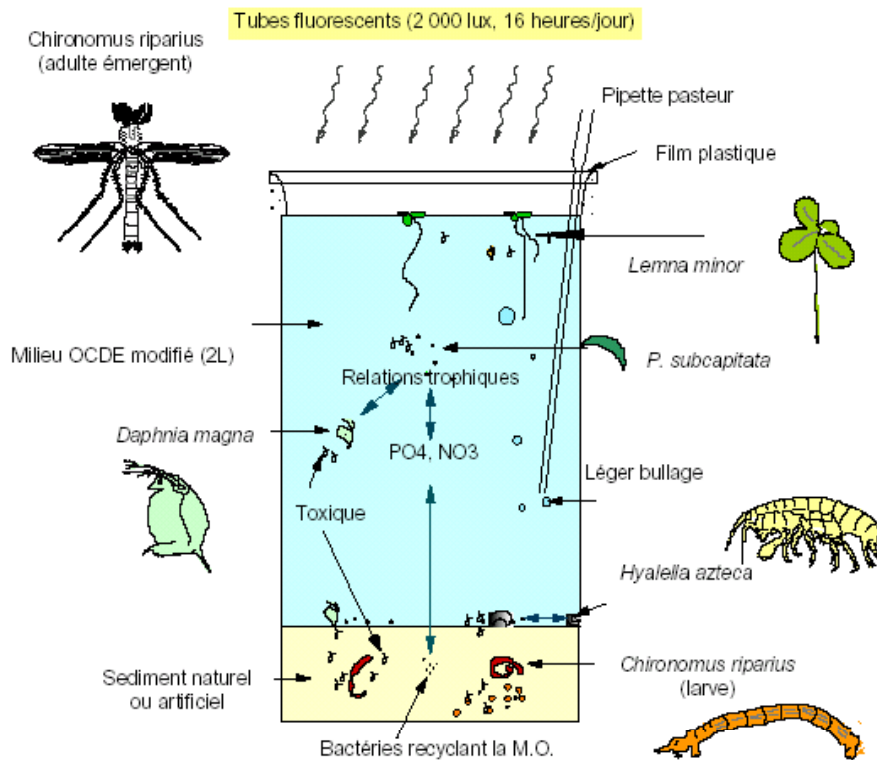


Figure 2. Schéma du microcosme 2 L.

La contrepartie est le nombre réduit de systèmes (6 compte tenu de la place occupée et du temps à consacrer aux mesures et à la maintenance), mais le suivi des populations et la stratégie basée sur les pièges et compartiments permettent de se passer des sacrifices pratiqués à différents temps avec le protocole d'essai en 2 litres pour évaluer certains paramètres (survie des larves de chironomes, composition de l'eau interstitielle). Enfin, le fait de disposer d'un plus grand nombre d'individus ou d'une plus grande biomasse pour certaines espèces (notamment cladocères, lentilles d'eau, microalgues) doit permettre de diversifier les mesures, en envisageant par exemple certains suivis (activités enzymatiques, bioaccumulation de polluants) sur des échantillons.

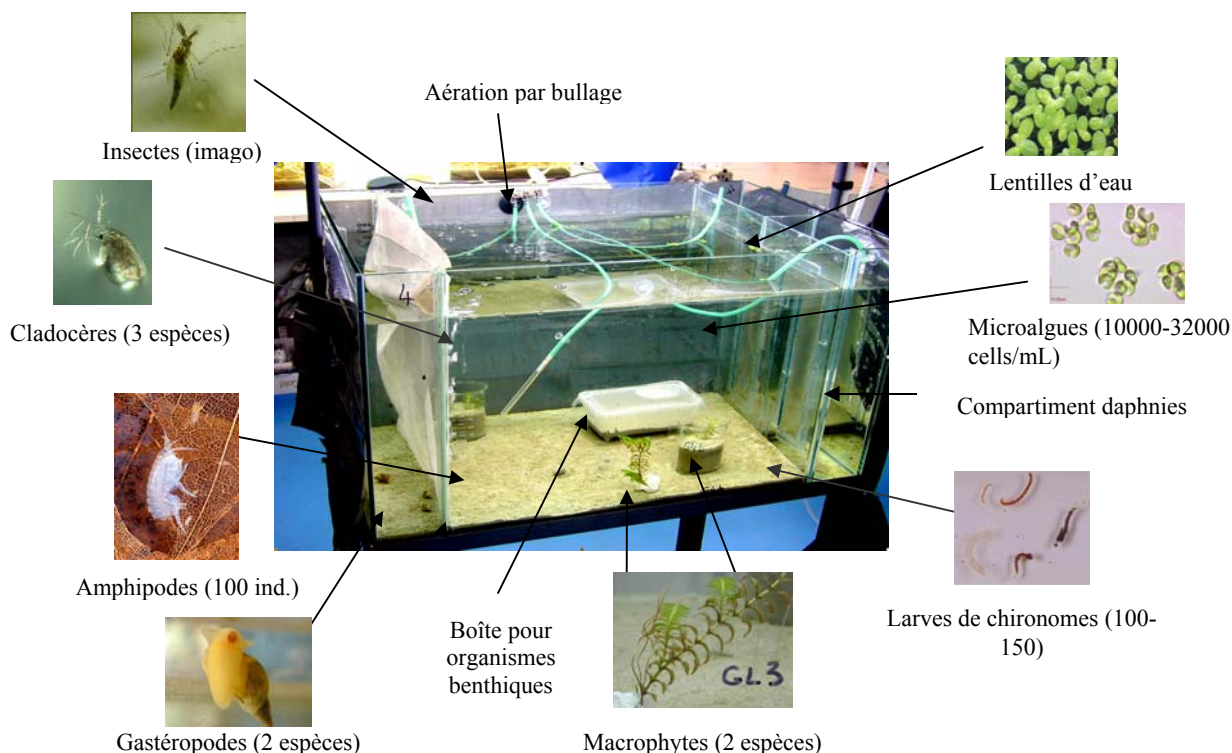


Figure 3. Dispositif de microcosme 100 L utilisé dans divers programmes (évaluation de l'écocompatibilité de MIOM et programme Novosol®)

Plus récemment encore (2005), nous sommes passés, dans le cadre du programme de recherche Novosol® de Solvay visant à évaluer les réponses d'écosystèmes aquatiques reconstitués à l'immersion d'un sédiment soumis à un traitement d'inertage, à une taille plus élevée, un environnement plus complexe et une alimentation d'eau en continu simulant l'écoulement d'une nappe. L'objectif était de simuler le dépôt en gravière de sédiment avant et après traitement. Les microcosmes "gravière" (**figures 4, 5 et 6**) sont constitués de bacs en acier inoxydable (2.30 m de long par 50 cm de large et 1 m de haut) remplis d'un matériau alluvionnaire de type "tout-venant" au centre duquel un volume d'eau libre de 270 L est assuré par un casier inox de maille 1 mm (dimensions : 1.5 m de long par 30 cm de large et 60 cm de haut). Les systèmes sont alimentés en continu (4 à 5 L/h) par de l'eau du réseau AEP déchlorée et enrichie en azote et phosphore qui percole à travers le matériau alluvionnaire, simulant ainsi l'alimentation d'une gravière par une nappe. Le même sédiment propre d'origine lacustre (lac d'Aiguebelette) que dans les essais en 2 et 100 L est introduit au fond du casier central. Les organismes étudiés sont les mêmes qu'en microcosmes 100 L, la durée d'exposition est 3 mois.

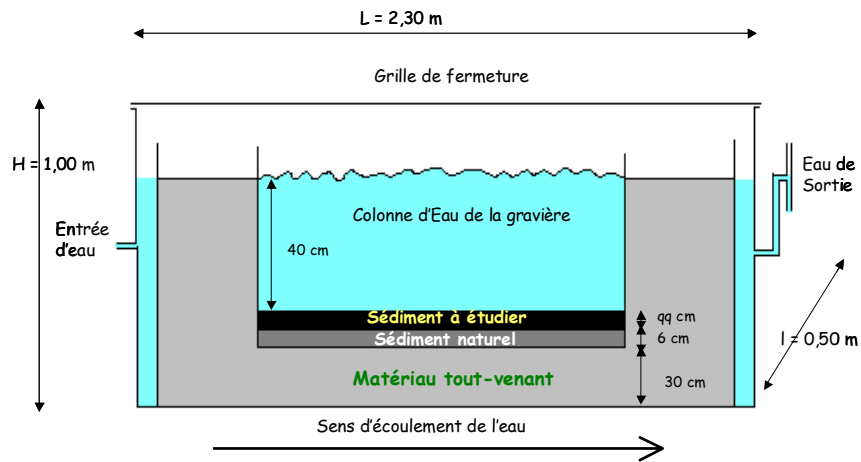


Figure 4. Schéma d'un microcosme « gravière » utilisé dans le programme Novosol® « évaluation du comportement d'un sédiment traité dans un scénario d'immersion en gravière »

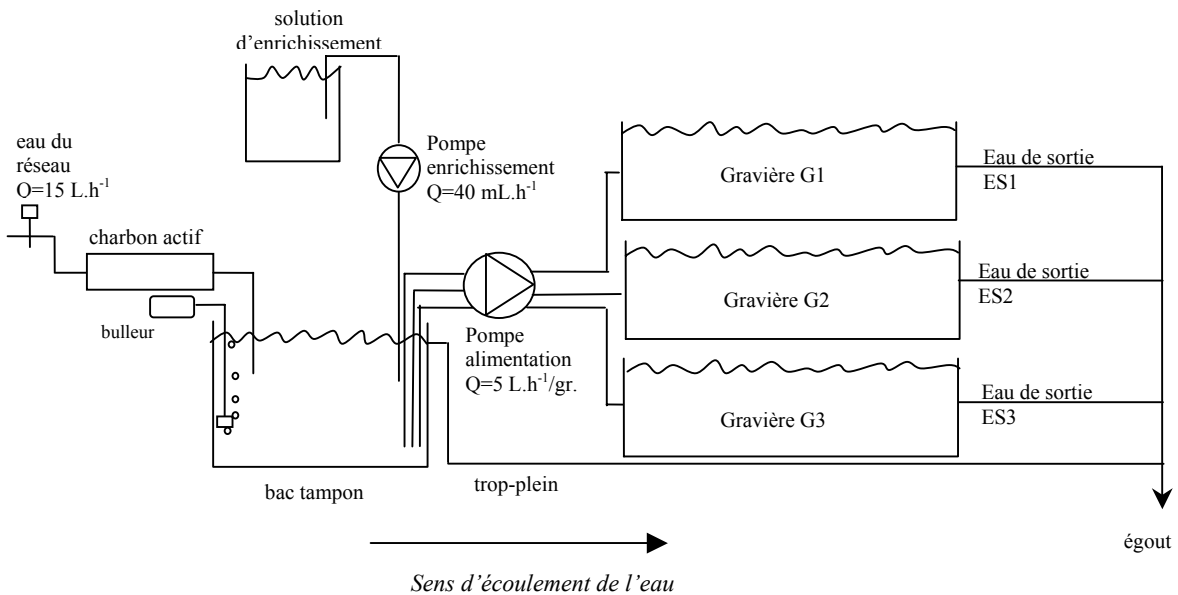


Figure 5. Dispositif d'alimentation en continu des gravières



Figure 6. Gravières pilotes utilisées dans le programme Novosol®

2. Travaux réalisés sur les microcosmes de laboratoire : résultats et enseignements

2.1. Microcosmes et microcosmologie

Nous avons dans ce rapport déjà utilisé le terme *microcosme* à plusieurs reprises dans une acception orientée vers les systèmes expérimentaux sur lesquels nous avons travaillé. En réalité, la notion de microcosme est plus large, et Beyers et Odum y consacrent un ouvrage entier de 557 pages (Beyers et Odum, 1993). Ils définissent un microcosme comme « un petit écosystème maintenu dans une enceinte » (*small ecosystems held in containers*). Ces mondes en miniature sont devenus de puissants outils de recherche en *microcosmologie* permettant d'étudier le fonctionnement des écosystèmes terrestres ou aquatiques mais aussi le devenir des substances toxiques dans les écosystèmes. Les microcosmes considérés dans l'ouvrage de Beyers et Odum contiennent plusieurs espèces, ont des frontières artificielles (les parois d'un aquarium par exemple), et sont séparés au moins partiellement du monde externe (la biosphère) en termes de matières, d'énergie, et/ou de dispersion d'espèces. Ce sont des aquariums, des rivières artificielles, des terrariums, des mares artificielles, des microcosmes récifaux (*reef microcosms*), des colonnes de plancton, des microcosmes complètement fermés (*sealed microcosms*), et ... des microcosmes abritant des humains (expériences Biosphere 2).

2.2. La place des essais en microcosmes dans la littérature en Ecotoxicologie

Une recherche bibliographique sur une base de données Internet (*www.scopus.com*) réalisée à partir des mots-clés « *microcosm* » et « *toxicity* » a fourni 372 références sur les quarante dernières années (1966 à 2005). En restreignant la recherche au 200 dernières références (1998 à 2005), nous avons extrait 50 références les plus en rapport avec les essais en microcosmes de laboratoire en eau douce, les autres références traitant d'essais en rivières artificielles, de microcosmes « sol » ou en milieux marin ou estuarien, incluant des tests *in situ* (enceintes, organismes encagés, ...). A partir de cet échantillonnage, nous pouvons estimer à un maximum de 250 références les articles en rapport avec notre thème sur les quarante dernières années, alors qu'une recherche pour la même période sur le mot-clé « *aquatic toxicity* » fournit 4532 références, estimation probablement par défaut du fait du croisement des deux termes « *aquatic* » et « *toxicity* ». Ainsi, les travaux publiés sur le thème « microcosme de laboratoire simulant des milieux aquatiques lenticques d'eau douce » représentent à peine 6% des travaux menés en écotoxicologie aquatique. Il s'agit probablement d'une estimation par excès, car le vocable « microcosme » n'a pas le même sens pour tous les chercheurs. Par exemple, Bhattacharyya *et al.* (2003) parlent de microcosmes à propos de systèmes aquatiques reconstitués à partir d'un sol et d'une eau

naturelle qu'ils laissent s'équilibrer plusieurs mois, et à des échantillons (sol, eau) desquels ils exposent, séparément, divers organismes (chironomes, daphnies, ...). De la même façon, Wang *et al.* (2005) reconstituent des systèmes de 72 L avec ou sans sédiment naturel et une eau de nappe, les contaminent avec un tensio-actif et effectuent des tests daphnies 48 h sur l'eau des systèmes prélevée au long d'une période de 4 jours, tandis que Bouldin *et al.* (2004) mettent en œuvre des tests monospécifiques sur des échantillons d'eau et de sédiment collectés dans des mésocosmes extérieurs représentant des fossés de drainage agricoles. Ce type d'expérimentations, bien que reposant sur la reconstitution de systèmes aquatiques faisant intervenir un certain niveau de réalisme dans le devenir de la substance testée, reste cependant éloignée de la définition d'un microcosme que nous donnons dans ce rapport, qui est celle d'un écosystème reconstitué dans lequel une ou plusieurs espèces sont exposées simultanément et interagissent entre elles et avec le milieu. Pour des milieux aquatiques d'eau douce, de nombreuses publications ont traité à des essais en microcosmes et mésocosmes extérieurs, mais elles sont également en nombre relativement limité, compte tenu de la complexité et de la durée des expérimentations mises en œuvre. Ainsi, qu'il s'agisse d'essais en microcosmes de laboratoire ou en micro- ou mésocosmes extérieurs, ces travaux représentent une part minoritaire des expérimentations menées en écotoxicologie aquatique, la grande majorité des travaux portant sur des niveaux de complexité inférieurs (individu, cellule) exposés dans des conditions simplificatrices souvent standardisées.

En nous basant sur les 75 références auxquelles nous avons pu avoir accès depuis que nous travaillons sur le thème des microcosmes de laboratoire en milieu aquatiques d'eau douce et en supposant que cette base de données, sans être exhaustive, représente l'essentiel des travaux réalisés, nous estimons à une centaine le nombre de publications sur ce thème depuis 1976, chiffre encore bien inférieur à l'estimation précédente mais probablement plus proche de la réalité et qui confirme la part marginale prise par les essais en microcosmes en Ecotoxicologie.

2.3. Les microcosmes aquatiques lenticques de laboratoire dans la littérature

2.3.1. Objectifs des essais en microcosmes

Dans la majeure partie des cas, le microcosme a pour objectif d'étudier les effets directs ou indirects d'un ou (rarement) plusieurs polluants sur plusieurs espèces exposées simultanément, appartenant à différents niveaux d'organisation trophiques et interagissant entre elles et avec le milieu, ou/et sur les fonctions biologiques majeures caractéristiques d'un écosystème : respiration, photosynthèse, productivité primaire, minéralisation de la matière organique. Le

choix des espèces peut se baser sur un critère spécifique, par exemple la stratégie de reproduction lorsqu'on s'intéresse aux disrupteurs endocriniens (Sanchez et Tarazona, 2002). Le fait que les populations soient exposées *simultanément* a plusieurs avantages. Par rapport à une batterie d'essais monospécifiques qui serait basée sur les espèces du microcosme, les populations évoluant dans le même compartiment (colonne d'eau ou sédiment) sont exposées dans des conditions identiques (teneur en oxygène et potentiel rédox, pH, caractéristiques physico-chimiques de l'eau ou du sédiment, lumière, température, etc.) et aux mêmes espèces chimiques du ou des polluants introduits, ce que ne permet généralement pas la batterie de tests du fait de protocoles spécifiques à chaque test (à commencer par le milieu d'essai). Deux organismes évoluant dans des compartiments différents (e.g. colonne d'eau et sédiment) seront exposés à des espèces chimiques d'une même substance différentes mais reliées entre elles par une relation spatio-temporelle reflétant l'influence des conditions du milieu sur la partition de la substance (par exemple partition d'un HAP entre eau surnageante, eau interstitielle et phase particulaire du sédiment) et sur son transfert d'un compartiment à l'autre (par exemple adsorption du même HAP sur les matières en suspension de la colonne d'eau et migration vers le sédiment par sédimentation de celles-ci). Pour deux espèces en interaction (ex : relation proie-prédateur), l'exposition simultanée permet de prendre en compte l'effet du polluant sur chaque espèce (effets directs) mais aussi sur la relation entre des deux espèces, et donc d'évaluer l'effet indirect du polluant sur un facteur écologique et sur la dynamique de populations. Une substance toxique peut ne pas exercer d'effet direct sur une espèce tolérante mais l'affecter indirectement par certains mécanismes écologiques (pression de prédation réduite, augmentation ou réduction de la sensibilité à la prédation, Fleeger *et al.*, 2003). Barry et Logan (1998) montrent que l'endosulfan est directement toxique pour certains groupes de zooplancton (Ostracodes, Cériodaphnies) de leurs microcosmes, ce qui entraîne (effet indirect) le développement d'autres groupes (*Simocephalus*, phytoplancton, algues filamenteuses et macrophytes), développement qui à son tour entraîne une diminution des teneurs en nutriments.

Travailler avec plusieurs espèces du même niveau trophique permet de mettre en évidence des effets sur la dominance ou sur la diversité. Quand deux espèces phytoplanctonivores sont présentes, une mortalité de 20% sur l'une d'elles peut aboutir à son extinction (elle est désavantagée dans la compétition), alors que cette espèce resterait présente si elle était seule.

Le microcosme, par la possibilité de reproduire certaines activités fonctionnelles des écosystèmes (production primaire, minéralisation de la matière organique), permet d'évaluer les effets des toxiques sur ces activités. Il est également possible de prendre en compte l'effet

de certaines activités biotiques sur le devenir de la substance testée. Madsen *et al.* (1997) ont étudié l'impact du fluoranthène sur le mélange par bioadvection de particules de sédiment par le ver marin *Capitella* sp.. Ils montrent que cette activité, bien que partiellement inhibée par le fluoranthène, contribue à enfouir cet HAP tout en augmentant la teneur en fluoranthène dans la colonne d'eau. Par ailleurs, pour expliquer la moindre teneur en fluoranthène du sédiment en présence des vers ils émettent l'hypothèse que la bioturbation des vers a pu également activer sa biodégradation.

De l'analyse précédente il ressort que l'étude des effets d'une substance ne peut être abordée sans s'intéresser en même temps à celle du devenir de cette substance, qui conditionne sa durée de vie dans les différents compartiments de l'écosystème et, par là, les conditions d'exposition des organismes (disparition de la substance mère, dégradation en métabolites plus ou moins toxiques, ...). Barry *et al.* (1995) ont montré que l'endosulfan adsorbé sur des algues microscopiques est moins toxique pour les Daphnies ingérant ces algues que l'endosulfan dissous. Ils en déduisent que, lorsque les deux populations sont exposées simultanément, l'effet sur les daphnies dépend de la densité d'algues, elle-même sous la dépendance de la densité de daphnies. En effet, en cas de forte densité algale la fraction toxique d'endosulfan (fraction non adsorbée) est faible ; en revanche, après broutage des algues par les daphnies celles-ci sont exposées à une fraction dissoute (biodisponible) plus élevée.

Les essais en microcosmes peuvent dans certains cas n'être justifiés que par l'étude du devenir d'une substance, en l'absence d'organismes supérieurs voire de microorganismes (systèmes stérilisés) dans un premier temps de façon à simplifier le système. Les essais en microcosmes permettent de prendre en compte simultanément ou de façon isolée les facteurs susceptibles d'influencer le devenir des substances testées, tels que la lumière (photodégradation, Ellis *et al.*, 2001), la biodégradation par voie bactérienne ou par les macrophytes ou les algues microscopiques (Barry et Logan, 1998 ; Ellis *et al.*, 2001), l'hydrolyse (Barry et Logan, 1998 ; Ellis *et al.*, 2001), l'adsorption sur les particules en suspension et le sédiment (Barry et Logan, 1998), la volatilisation (Barry et Logan, 1998 ; Thiébaud *et al.*, 1994). Cela nécessite un choix approprié de paramètres décisifs tels que température, intensité lumineuse et type de rayonnement, pH, composition physico-chimique de l'eau, type de sédiment, etc..

Dans tous les cas, l'objectif est de créer des conditions permettant de reproduire, même de façon simplifiée, une portion d'écosystème dans laquelle l'étude du devenir et des effets pourra présenter un certain niveau de prédiction permettant d'extrapoler les résultats de laboratoire au terrain (Cairns et Cherry, 1993). Pour cela, il faut répondre à un certain nombre de questions

concernant entre autres l'échelle, les méthodes, le choix des variables à suivre pour assurer la représentativité et la reproductibilité du système et travailler sur des indicateurs pertinents.

Deux approches d'essais en microcosmes de laboratoire ont été développées. Les microcosmes de laboratoire peuvent être entièrement synthétiques, c'est-à-dire élaborés à partir d'un milieu et d'un sédiment reconstitués dans lesquels on introduit un nombre défini d'espèces issues d'élevages et de cultures du laboratoire. Les microcosmes synthétiques ou "gnotobiotiques" ont l'avantage de la simplicité et un degré élevé de reproductibilité mais ils miment les écosystèmes réels de façon très schématique à partir d'un nombre d'espèces limité (Barry et Logan, 1998). Les microcosmes de laboratoire basés sur des communautés naturelles issues d'eau et de sédiment prélevés *in situ* (Van Donk *et al.*, 1995) représentent une alternative aux microcosmes gnotobiotiques. Ces microcosmes fournissent souvent des résultats plus proches de ce qu'on peut observer sur les écosystèmes naturels mais sont plus difficiles à répliquer (Barry et Logan, 1998).

La frontière entre tests multi-espèces et microcosmes est ténue. Dans le premier cas il s'agit d'étudier les effets d'un toxique sur une ou plusieurs fonctions particulières de chacun des organismes présents, sans se préoccuper des propriétés écosystémiques de l'association reconstituée. Ainsi Sanchez et Tarazona (2002) mettent-ils au point un protocole permettant de tester les effets de disrupteurs endocriniens sur la reproduction de trois espèces (*Daphnia magna*, *Lymnaea peregra*, *Chironomus prasinus*) représentant trois groupes taxonomiques différents et trois stratégies de reproductions différentes, et exposées *via* l'eau, le sédiment, et la nourriture. Ils soulignent l'intérêt de ce test multi-espèces sur le plan du coût et de la comparabilité de données relatives aux trois espèces exposées dans les mêmes conditions. Dans le second cas le choix des espèces repose sur des critères écosystémiques (niveaux trophiques représentés, interactions des espèces entre elles et avec le milieu, ...), et la possibilité d'étudier les effets sur certaines fonctions de l'écosystème et sur sa structure même simplifiée. Cependant, dans le premier cas des interactions sont nécessairement présentes, qui entrent en ligne de compte dans l'expression des effets et dans le devenir du toxique, même si elles ne sont pas étudiées.

2.3.2. Les essais sur des communautés dérivées d'écosystèmes naturels

Les principales références (au nombre de 43) de ce type de microcosmes sont présentées au **tableau A en annexe 1**. Les microcosmes sont reconstitués à partir d'eau, de sédiment et de biocénoses prélevés *in situ*. Dans certains cas le sédiment est absent (Leffler, 1984 ; Shannon *et al.*, 1986 ; Pratt *et al.*, 1987 ; Stay *et al.* 1988, 1989 ; Cairns *et al.*, 1990 ; Stay et Jarvinen,

1995 ; Rico-Martinez *et al.*, 1998 ; Seguin *et al.*, 2001 ; Kratasyuk *et al.*, 2001 ; Brandt *et al.*, 2004 ; Clément et Zaid, 2004 ; Cedergreen *et al.*, 2004) ; la biocénose peut en outre être réduite à des échantillons de communautés microbiennes prélevés *in situ* et placés en incubation au laboratoire avant exposition à un toxique (Brandt *et al.*, 2004). Le fait de modifier l'environnement des organismes peut conduire à la disparition d'une partie des populations et compromettre la répétabilité des essais, il est donc nécessaire de suivre le devenir de ces populations avant et au cours du test. Shannon *et al.* (1986) mettent en culture l'inoculum naturel de phyto- et zooplancton pendant trois mois avant de lancer leur essai. Traub-Eberhard *et al.* (1994) partent d'un sédiment et d'une colonne d'eau prélevés dans la zone littorale d'une mare contenant une communauté benthique naturelle. Brockway *et al.* (1979) initient également leurs systèmes à partir de sédiment naturel issu d'une mare et déposé sur du sable lavé, et d'eau de mare dans laquelle ils réalisent des prélèvements de seston permettant d'ajouter un inoculum supplémentaire. Giddings et Eddlemon (1979) reconstituent des microcosmes à partir d'un sédiment naturel, d'une eau de lac ou de mare, de plantes (macrophytes et algues filamenteuses), de micro-invertébrés, mollusques, petits poissons et larves d'insectes inféodées aux plantes. Merlin *et al.* (1992) reconstituent des milieux lenticques à partir d'eau du réseau, de sédiment naturel, de macrophytes enracinées (*Typha latifolia*, *Groenlandia densa*) et flottantes (lentilles d'eau *Lemna minor* et *Lemna trisulca*), et de poissons de lac (*Coregonus lavaretus*). Fliedner et Klein (1996) utilisent un sédiment de mare et une eau naturelle. Barry et Logan (1998) prélèvent uniquement le sédiment d'une mare temporaire asséchée et contenant les invertébrés et les plantes sous formes de kystes. Ils travaillent sur les organismes éclos au bout de deux semaines. Barry et Davies (2004) utilisent le même type de protocole mais ajoutent un prédateur (le notonecte *Anisops spp.*) pour étudier l'effet de l'endosulfan sur les relations proie-prédateur. Van Donck *et al.* (1995), dans des microcosmes de 600 litres représentant des fossés de drainage dominés par les macrophytes, utilisent un sable naturel, des Elodées (60 pieds par aquarium) et plusieurs espèces de macro-invertébrés. Cuppen *et al.* (2000) et Van den Brink *et al.* (1997, 2000) reconstituent le même type de milieu dans des aquariums en verre de 600 L. Sanderson *et al.* (2002) remplissent de façon aléatoire des aquariums en PVC de 30 L avec un sédiment, des animaux (zooplancton, mollusques gastéropodes), du phytoplancton (1000 cells/mL) et de l'eau prélevés sur le terrain (non précisé). La présence occasionnelle de macrophytes (Elodées et Myriophylles) et de macro-invertébrés (Ephéméroptères, Aselles) est relevée.

L'introduction du toxique a lieu généralement après une période d'acclimatation variable (6 semaines pour Shannon *et al.* (1986), 2 à 3 mois pour Traub-Eberhard *et al.* (1994), 3 mois

pour Fliedner et Klein (1996), 39 semaines pour Brockway *et al.* (1984), 3 semaines pour Barry et Logan (1998), 3 mois pour Van Donk *et al.* (1995), Cuppen *et al.* (2000) et Van den Brink *et al.* (2000), 4 semaines pour Sanderson *et al.*, 2002), au cours de laquelle des mélanges d'eaux entre microcosmes sont dans la plupart des cas réalisés pour assurer un développement identique des populations dans tous les microcosmes, et qui est également une période de stabilisation à l'issue de laquelle des paramètres globaux comme le pH et la teneur en oxygène dissous et la conductivité présentent des fluctuations modérées. Les colonnes d'eau des systèmes peuvent également être connectées entre elles afin de minimiser les différences entre bassins, la communication étant interrompue juste avant contamination. Dans les essais menés par Brockway *et al.* (1984) un inoculum de plancton est apporté chaque semaine.

La plupart des microcosmes contiennent diverses communautés constituées de bactéries, de phyto- et zooplancton (algues vertes, bleues, diatomées, dinoflagellés, protozoaires, rotifères, cladocères, copépodes, ostracodes, ...), et d'invertébrés benthiques (larves d'insectes, amphipodes), voire de petits poissons (Giddings et Eddlemon, 1979). Dans certains cas, des macrophytes sont introduits (Giddings et Eddlemon, 1979 ; Cragg et Fry, 1984 ; Van Donck *et al.*, 1995 ; Cuppen *et al.*, 2000 ; Van den Brink *et al.*, 2000), ou constituent la seule communauté du microcosme (Cedregreen *et al.*, 2004), mais Traub-Eberhard *et al.* (1994) choisissent de les exclure du fait qu'ils entraînent selon eux une plus grande variabilité entre microcosmes.

Les systèmes ont des volumes de 120 mL (Ellis *et al.*, 2001) à 600 L (Van Donk *et al.*, 1995 ; Van den Brink *et al.*, 1995, 1997, 2000 ; Cuppen *et al.*, 2000), mais la plupart ont des volumes de quelques litres à quelques dizaines de litres (cf **tableau A**). Le choix de la taille des systèmes résulte d'un compromis entre niveau de reproductibilité souhaité et représentativité de l'écosystème reconstitué. Un microcosme de petite taille serait plus reproductible mais nécessairement moins représentatif dans la mesure où le volume disponible oblige à limiter le nombre d'espèces. Ainsi les plus petits systèmes sont généralement basés sur des communautés bactériennes et algales, alors que les plus grands contiennent des plantes enracinées (Van Donck *et al.*, 1995 ; Van den Brink *et al.*, 1995, 1997, 2000 ; Cuppen *et al.*, 2000).

La durée d'exposition des systèmes aux toxiques est variable et dépend des objectifs des essais et des propriétés des toxiques testés : 35 jours (Sanderson *et al.*, 2002), 42 jours (Brandt *et al.*, 2004 ; Shannon *et al.*, 1986), 1 an (Traub-Eberhard *et al.*, 1994), 10 semaines (Brockway *et al.*, 1984 ; Barry et Logan, 1998), 20 semaines (Van Donk *et al.*, 1995), 4 semaines avec maintien

des teneurs par additions répétées puis 7 semaines sans ajout supplémentaire de toxique (Cuppen *et al.*, 2000).

Les paramètres physico-chimiques suivis sont en général des paramètres globaux comme le pH, la teneur en oxygène dissous (prise avant éclairage et en fin de journée elle permet d'estimer les gains et pertes en oxygène dus à la respiration et à la photosynthèse, Leffler, 1984 ; Shannon *et al.*, 1986 ; Stay et Jarvinen, 1995 ; Stay *et al.*, 1988, 1989 ; Cairns *et al.*, 1990 ; Scanferlato et Cairns, 1990 ; Cuppen *et al.*, 2000), l'alcalinité (Giddings et Eddlemon, 1979 ; Cragg et Fry, 1984 ; Cuppen *et al.*, 2000), la conductivité (Cuppen *et al.*, 2000), les teneurs en nutriments (NH_4^+ , NO_3^- , NO_2^- , PO_4^{3-}) qui renseignent sur le fonctionnement des cycles, les teneurs dans les différents compartiments (eau, sédiments, biota) de la substance étudiée et éventuellement de ses métabolites (Traub-Eberhard *et al.*, 1994). Les populations sont suivies par comptage au microscope ou à la loupe voire par cytométrie de flux pour le picoplancton (Traub-Eberhard *et al.*, 1994), par détermination de la teneur en chlorophylle pour les algues microscopiques planctoniques, de la biomasse pour les macrophytes (Barry et Logan, 1998). Dans certaines études (Traub-Eberhard *et al.*, 1994 ; Rico-Martinez *et al.*, 1998), la diversité est estimée à partir des comptages de populations selon la méthode de Shannon-Wiener ou Shannon-Weaver. On peut aussi s'intéresser au compartiment bactérien, en particulier à son développement suite à la décomposition de plantes mortes après action d'herbicides (Cragg et Fry, 1984), et à la décomposition de matière organique particulaire en présence ou non d'invertébrés (Cuppen *et al.*, 2000), ou encore par diverses méthodes (Brandt *et al.*, 2004) permettant de caractériser sa densité (dénombrement), sa diversité (analyse des communautés par DGGE), son métabolisme (incorporation de leucine, test Biolog EcoPlate), et enfin l'existence d'une tolérance induite au toxique (méthode PICT). Certains auteurs ne s'intéressent qu'à un seul groupe (zooplancton pour Sanderson *et al.*, 2002, 2003).

2.3.3. Les essais sur des systèmes gnotobiotiques

Dans les microcosmes qualifiés de « gnotobiotiques » (cf **tableau B en annexe 1** présentant 41 références publiées), l'écosystème est entièrement reconstitué à partir d'un sédiment et d'une eau synthétiques ou naturels dans lesquels sont introduits des organismes issus d'élevages et de cultures du laboratoire. Tous les éléments du microcosme sont ainsi connus si l'on néglige les microorganismes dans le cas d'un sédiment naturel, la diversité est limitée et un meilleur contrôle et une plus grande reproductibilité sont attendus. Cette approche n'est pas récente puisque Nixon utilisait déjà en 1969 un microcosme synthétique d'eaux saumâtres, composé d'une algue verte (*Dunaliella viridis*), d'un micro-crustacé (*Artemia salina*), et de bactéries

non identifiées prélevées à l'extérieur et isolées. Les SAM (pour Standardized Aquatic Microcosms) de Taub sont les plus connus car ils ont fait l'objet d'une longue mise au point (Taub, 1969, 1977, 1989a, 1989b ; Conquest et Taub, 1989 ; Taub *et al.*, 1981, 1986, 1991) qui a abouti à un protocole normalisé (ASTM, 1993b) repris par d'autres auteurs (Larsen *et al.*, 1986 ; Stay *et al.*, 1989 ; Rai et Mallick, 1993 ; Landis *et al.*, 1993). Il s'agit de systèmes de 3 litres comprenant du sable (+ chitine et cellulose), un milieu nutritif synthétique, 10 espèces d'algues, 5 espèces animales (daphnies, amphipodes, ostracodes, protozoaires et rotifères), et des bactéries (dont *Enterobacter*). Tous les organismes sont issus du laboratoire et identifiés. Taub cherche à démontrer des effets de substances sur des processus importants : photosynthèse, dominance d'espèces (algues et zooplancton), assimilation des nutriments et recyclage de la matière organique, récupération, effets différés, effets indirects. Le protocole répond aux exigences suivantes : démonstration d'interactions écologiques à l'intérieur des et entre les différents niveaux trophiques, capacité à mettre en évidence des différences statistiquement significatives au niveau des populations ou/et des facteurs abiotiques dues aux effets du toxique, sensibilité à de nombreuses substances, résultats répétables et reproductibles, résultats comparables à et prédictifs de ce qui se passe sur le terrain (Taub, 1989a). Bien que standardisée, la mise en œuvre de ce protocole reste complexe, coûteuse en temps et en énergie du fait de la durée du test (63 jours) et de la nécessité de maintenir au laboratoire un grand nombre de cultures et d'élevages. Le compartiment sédiment est réduit à un support de développement pour quelques organismes.

Il existe assez peu de protocoles de microcosmes entièrement gnotobiotiques comme les SAM. Dans de nombreux cas le protocole s'appuie sur des éléments synthétiques (par exemple un milieu de culture pour la colonne d'eau) et des organismes issus pour certains d'élevages et pour d'autres prélevés *in situ*. Le fait d'apporter un sédiment naturel dans certains cas amène à introduire des microorganismes voire une macrofaune benthique qui complexifient les systèmes et diminuent leur niveau de maîtrise. On peut par exemple citer les travaux de l'équipe du Pr Gérard Blake (Université de Savoie). Merlin et Blake (1991) ont testé le pentachlorophénol (PCP) en microcosmes de 2 litres simulant des écosystèmes lenticques comportant une colonne d'eau, un sédiment lacustre et des plantes supérieures (*Pistia stratiotes* ou laitue d'eau, espèce flottante, des espèces enracinés comme *Scirpus*, *Schoenoplectus lacustris*) et inférieures (algues filamenteuses telles que *Spyrogira* sp., *Gomphonema* sp.). Le fait de n'utiliser que des producteurs primaires est justifié par l'action herbicide du PCP. Dans les études de Merlin *et al.* (1992) et Thiébaud *et al.* (1994) (**figure 7**) sur le devenir et les effets du dichlorométhane, les microcosmes contenaient un sédiment artificiel (sable de

Fontainebleau), un milieu synthétique (milieu de Hoagland modifié), des bryophytes immergés (*Fontinalis antipyretica*) des macrophytes (*L. minor*, *G. densa*, *E. canadensis*), des mollusques (*Physa fontinalis*), des micro-crustacés (*D. magna*) et une algue verte (*S. subspicatus*).

D'autres exemples de protocoles d'essais en microcosmes non entièrement gnotobiotiques sont fournis par les travaux plus récents de Sanchez et collaborateurs (Sanchez et Tarazona, 2002 ; Sanchez *et al.*, 2004). Si le sédiment est semi-artificiel (sable enrichi en tourbe de sphaigne), l'eau est naturelle (eau de source). Le microcosme est davantage un test multi-espèce puisqu'il ne contient que deux (Sanchez *et al.*, 2004) ou trois espèces (Sanchez et Tarazona, 2002). Par ailleurs, les daphnies sont exposées libres ou encagées, ce qui permet d'étudier l'effet du toxique en fonction du mode d'exposition au sédiment.

Dans tous ces essais en microcosmes gnotobiotiques ou pseudo-gnotobiotiques, le toxique est en général ajouté rapidement (au maximum après 1 semaine, ASTM (1993b)), la phase de colonisation/stabilisation est plus courte qu'en microcosmes constitués de communautés naturelles. Les variables suivies, physico-chimiques ou biologiques, ne sont en revanche pas très différentes : pH, oxygène dissous, conductivité, teneurs en NH_4^+ , NO_3^- , NO_2^- , PO_4^{3-} , alcalinité, teneurs en toxique des différents compartiments, pigments chlorophylliens, densités des différents organismes. Merlin et Blake (1991) étudient également les activités photosynthétique et respiratoire des producteurs primaires à partir de fragments foliaires ou de végétaux entiers.

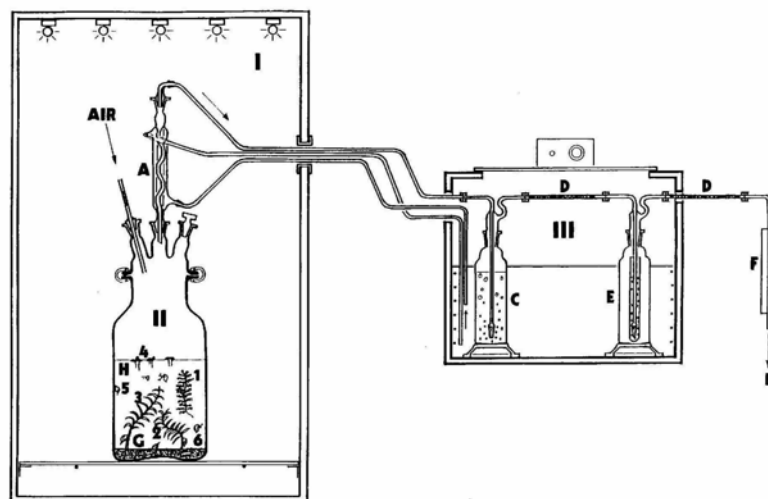


Figure 7. Dispositif expérimental pour mesurer le devenir et les effets du dichlorométhane dans Thiébaud *et al.* (1994)

Shannon *et al.* (1986) ont cherché à comparer le protocole des SAM de Taub et celui des MFC (Mixed Flask Cultures) de Leffler (1984). Les MFC sont constitués sans sédiment à partir d'une communauté d'algues/zooplancton /microorganismes qui s'est développée au moins 3 mois dans des aquariums de labo remplis du même milieu synthétique que celui du protocole SAM. La répétabilité est meilleure pour le protocole SAM mais la variabilité pour le pH et la teneur en oxygène dissous est plus faible pour le protocole MFC. Pour les autres variables, les coefficients de variations de SAM sont encore plus élevés; ce résultat meilleur pour MFC pourrait être dû à la plus longue période d'acclimatation avec MFC, qui aboutit à des microcosmes plus proches que pour SAM (période de stabilisation de 7 jours seulement). Cependant d'une expérience à l'autre les résultats de SAM sont plus consistants. Le protocole SAM est enfin beaucoup plus coûteux que MFC.

Les travaux de Boudou et collaborateurs (Boudou *et al.*, 1998) sont basés sur des microcosmes de laboratoire où sont présents un biotope mixte (3 litres d'eau du réseau déchlorée et 1 kg de sédiment naturel prélevé sur les berges de la Garonne) dans lequel des espèces introduites sont exposées à des métaux présents sous différentes formes dans ces différents compartiments. Ils travaillent ainsi sur la nymphe de l'insecte *Hexagenia rigida*, qui s'enfouit à la surface du sédiment et ingère celui-ci, et sur le mollusque *Corbicula fluminea*, qui colonise les premiers centimètres de sédiment et filtre de grands volumes d'eau pour respirer et se nourrir. Les métaux (cadmium, mercure ou méthylmercure) sont ajoutés à l'eau ou au sédiment selon différentes stratégies (ajouts quotidiens identiques dans tous les traitements ou bien pression de contamination constante durant la période d'exposition fixée à deux semaines), et l'influence de facteurs abiotiques comme le pH de l'eau, la température, la photopériode sur la bioaccumulation au niveau de l'organisme entier et de différents organes (épithélium, branchies, gonades, glande digestive, masse viscérale, intestin, pied, rein) est étudiée. La décontamination des organismes est également suivie après transfert de ceux-ci dans des microcosmes non contaminés. Il s'agit donc d'études mécanistiques de la bioaccumulation sur des individus (et non sur des populations) essentiellement soumis à des conditions abiotiques contrôlées.

Un cas particulier et extrême du concept de microcosme gnotobiotique est proposé par Kersting et Van Wijngaarden (1992). Le microcosme (**figure 8**) consiste en 3 récipients contenant des algues microscopiques (*Chlorella*, 3.10^8 cells/L initialement, 6 L) pour le premier, des daphnies (*Daphnia magna*, 10 mères initialement, 0.9 L) pour le second, et une suspension de sédiment propre pour le troisième (à l'abri de la lumière, décomposeurs, 0.9 L). Ces récipients communiquent entre eux par circulation de l'eau au moyen d'une pompe

péristaltique, de sorte que des algues sont fournies en continu aux daphnies et que les algues non consommées et les résidus du métabolisme sont envoyés dans le récipient des décomposeurs, à partir duquel l'eau contenant des éléments solubles issus de la minéralisation est renvoyée vers le sous-système algues. Les essais peuvent durer 445 jours. Du fait des communications entre sous-systèmes, tous les organismes (producteurs primaires, herbivores et décomposeurs) sont exposés au toxique. Ce type de système à trois compartiments n'est pas loin de la chaîne trophique proposée par Dobbs *et al.* (1996) (**figure 8**), basée sur trois espèces (une algue *Chlorella vulgaris*, un rotifère *Brachionus calyciflorus*, un poisson *Pimephales promelas*). Les algues sont cultivées dans un récipient à partir duquel elles sont envoyées en continu vers le récipient des rotifères, eux-mêmes étant transférés par une pompe vers le récipient des poissons. Un système de chaîne trophique compartimentée est également proposé par Kroer *et al.* (1994), consistant en un compartiment à phytoplancton (volume : 216 L), un compartiment à zooplancton (27 L) et un compartiment à communauté benthique (carottes de sédiment intactes).

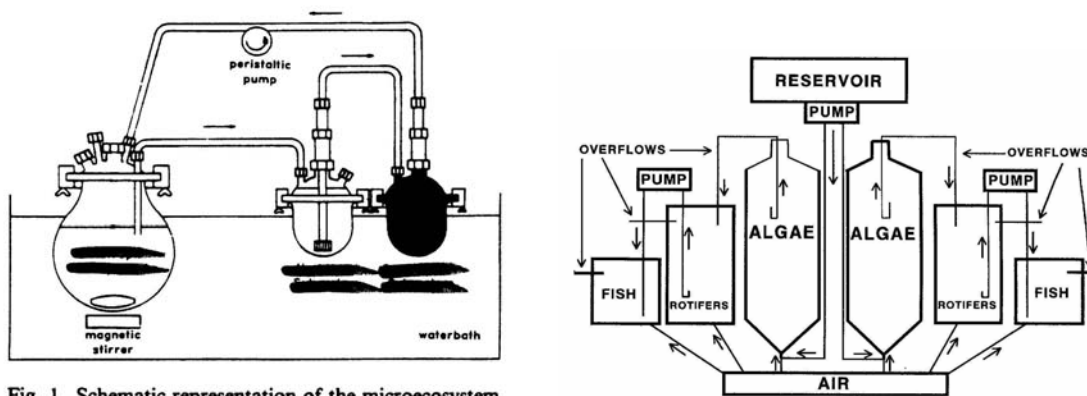


Fig. 1. Schematic representation of the microecosystem.

Figure 8. Chaînes trophiques expérimentales (Dobbs *et al.* (1996) à droite et Kersting et Van Wijngaarden (1992) à gauche)

2.4. Conception des essais en microcosmes de ce travail

2.4.1. Objectifs

Tous les essais réalisés en microcosmes de 2 L, 100 L ou 200 L (microcosmes "gravière") avaient pour objectifs (**tableau 1**) d'étudier les effets de toxiques sur un nombre restreint d'organismes présents simultanément dans un milieu comportant une colonne d'eau et un sédiment et exposés sur une durée de 30 jours (essais en 2 L) ou de plusieurs mois (maximum 3 mois, essais en 100 et 200 L). L'écosystème réalisé n'est pas à proprement parler une

reconstitution dans un volume limité d'un écosystème aquatique naturel, mais plutôt la représentation de certaines populations et certains processus présents dans les écosystèmes lentiques ou écosystèmes d'eaux stagnantes tels que mares, étangs, littoral de lac ou de plan d'eau de retenue. Un certain nombre d'hypothèses sont sous-jacentes à la méthode :

- le renouvellement de l'eau est nul ou limité, à l'instar de ce qui se passe dans les écosystèmes lentiques, et réalisé par intermittence pour les microcosmes 2 et 100 L, ou en continu pour les microcosmes 200 L "gravière",
- la profondeur limitée ne permet pas de prendre en compte le phénomène de stratification thermique et biologique ainsi que les déplacements de certaines communautés (zooplancton) liés à cette stratification, en cela le système est plus représentatif des zones de faible profondeur (mares, étangs et zones littorales),
- les phénomènes de brassage liés aux vents et à la stratification ne sont pas pris en compte, mais la faible hauteur de la colonne d'eau et/ou l'aération réalisée par bullage assurent un mélange intégral de la colonne d'eau,
- la colonne d'eau est un milieu favorable au développement des organismes, sans pour autant, du fait de son caractère synthétique ou de ses caractéristiques naturelles particulières (eau de nappe), s'avérer optimale pour chacun des organismes présents,
- le sédiment offre un milieu favorable aux espèces de macroinvertébrés introduites et constitue un compartiment important à considérer pour le devenir des polluants (sédimentation des polluants particulaires, complexation des phases dissoutes par les solides, les sels de l'eau interstitielle et la matière organique, diffusion vers la colonne d'eau des polluants apportés avec le sédiment, biodégradation des polluants organiques, etc.)

2.4.2. Description générale des différents types de microcosmes utilisés (2 L, 100 L, 180 L "gravières")

Les différents microcosmes utilisés dans l'ensemble des travaux que nous avons encadrés et menés ont été évoqués plus haut. Nous en rappellerons les protocoles de façon synthétique dans le **tableau 2**.

Tableau 1. Objectifs des essais en microcosmes mis en œuvre dans les programmes réalisés

Type d'essai	Objectifs	Variables particulières
Essais témoins (microcosmes 2 L, 100 et 180 L)	Définir un système favorable aux organismes pélagiques et benthiques	Type de sédiment (naturel, artificiel) Type d'eau Alimentation org benth (quantité, type de nourriture) Ratio eau : sédiment Renouvellement de l'eau
Essai sur HAPs (microcosmes 2 L)	Effet des HAPs sédiment sur organismes benthiques et pélagiques Partition et devenir HAPs	Teneur en HAPs Quantité de matière organique du sédiment Type de sédiment (naturel vs artificiel) Activité bactérienne
Essai sur 6PPD (microcosmes 2 L)	Effet de la 6PPD sédiment sur organismes benthiques et pélagiques Partition et devenir HAPs	Teneur en 6PPD Activité bactérienne Lumière
Essais sur sédiments (microcosmes 2 L, 100 et 180 L)	Effet sédiments contaminés ou traités sur organismes benthiques et pélagiques Devenir des polluants	Type de sédiment Ratio eau : sédiment Renouvellement de l'eau
Essais sur effluents (percolats de MIOM) (microcosmes 2 et 100 L)	Effet d'apports de percolats sur organismes benthiques et pélagiques	Composition du percolat Teneur en percolat

Tableau 2. Principales modalités des protocoles d'essais en microcosmes 2 L, 100 L et "gravière" (*Ps* : *Pseudokirchneriella subcapitata* ; *Lm* : *Lemna minor* ; *Sp* : *Spirodela polyrhiza* ; *Ec* : *Elodea canadensis* ; *Gd* : *Groenlandia densa* ; *Dm* : *Daphnia magna* ; *Cd* : *Ceriodaphnia dubia* ; *Sv* : *Simocephalus vetulus* ; *Cr* : *Chironomus riparius* ; *Ha* : *Hyalella azteca* ; *Pa* : *Physa acuta* ; *Ls* : *Limnaea stagnalis*)

	Microcosmes 2 L	Microcosmes 100 L	Microcosmes "gravière"
Volume en eau	2 L	100 L	180 L
Profondeur d'eau	20 cm	40 cm	40 cm
Eau	milieu synthétique	milieu synthétique ou eau de nappe enrichie	eau du réseau déchlorée et enrichie
Renouvellement eau	non en général	intermittent (10 L/sem.)	continu (4-5 L/h)
Aération	par bullage (pipettes Pasteur)		non
Sédiment témoin	artificiel ou naturel	naturel	naturel
Masse sédiment témoin	100 à 300 g	5 kg	72 kg
Eclairage		fluorescent de type lumière du jour	
- type		2000 lux à la surface du plan d'eau	
- intensité		16 h de lumière/jour	
- photopériode			
Durée équilibrage	7 jours	environ 1 mois	environ 1 mois
Durée exposition	28 jours	90 jours	90 jours
Organismes introduits			
- producteurs primaires	microalgues <i>Ps</i> lentilles d'eau <i>Lm</i>	microalgues <i>Ps</i> lentilles d'eau <i>Lm, Sp</i> plantes enracinées <i>Ec, Gd</i>	microalgues <i>Ps</i> lentilles d'eau <i>Lm</i> plantes enracinées <i>Ec</i>
- zooplancton	cladocères <i>Dm</i>	cladocères <i>Dm, Cd, Sv</i>	cladocères <i>Dm, Cd, Sv</i>
- benthos	chironomes <i>Cr</i> amphipodes <i>Ha</i>	chironomes <i>Cr</i> amphipodes <i>Ha</i>	chironomes <i>Cr</i> amphipodes <i>Ha</i>
- mollusques	/	Physes <i>Pa</i> Limnées <i>Ls</i>	Physes <i>Pa</i> Limnées <i>Ls</i>
Organismes indigènes (origine : sédiment)	(1)	larves d'éphémères Oligochètes périphyton	larves d'éphémères Oligochètes périphyton
Critères d'effets	survie, repro <i>Dm</i> survie, croissance <i>Cr</i> émergence <i>Cr</i> survie, croissance <i>Ha</i>	survie, repro <i>Dm, Cd, Sv</i> survie, croissance <i>Cr</i> émergence <i>Cr</i> survie, croissance <i>Ha</i> Croissance algues Croissance lentilles	survie, repro <i>Dm</i> survie, croissance <i>Cr</i> émergence <i>Cr</i> survie, croissance <i>Ha</i>
	/	survie, croissance mollusques	
	/	croissance plantes enracinées	
Paramètres physico- chimiques	pH, O ₂ , conductivité, COT, (TAC), anions et cations colonne d'eau contaminants (métaux, HAPs, ...) colonne d'eau pH, COT, anions et cations (dont NH ₄ ⁺) eau interstitielle contaminants (métaux, HAPs, ...) eau interstitielle		
Nombre de répliqués	9 à 12	2	1
Sacrifice	à 7, 14, 21 et 28 jours ou 10, 21 et 28 jours	en fin d'essai	en fin d'essai

2.4.3. Choix des compartiments et des biocénoses

2.4.3.1. Préambule

La conception d'un essai en microcosmes doit répondre à de nombreux objectifs et contraintes. Le microcosme doit en premier lieu offrir, en l'absence de toxiques, des conditions propices au développement des organismes introduits. Cela repose sur un choix judicieux des compartiments abiotiques tels que sédiment et eau surnageante, mais aussi de certaines conditions de fonctionnement (température, oxygénation, renouvellement de l'eau, alimentation des organismes), et, enfin, des espèces introduites, de leur densité et des interactions prévisibles entre elles et avec leur milieu. Le devenir et les effets des polluants introduits dans un milieu aquatique dépendent par ailleurs de la nature (texture, structure, composition) du sédiment présent et de la composition physico-chimique de l'eau surnageante, partiellement influencée par le sédiment mais aussi par l'action des organismes vivants. Le choix de ces facteurs abiotiques et biotiques doit donc tenir compte de la nature des polluants étudiés. Cependant, dans la mesure où, comme dans les essais monospécifiques, un certain degré de standardisation est recherché, de façon à valider un protocole, permettre des comparaisons d'un essai à l'autre, enrichir une base de données et acquérir de l'expérience, il semble indispensable de fixer un certain nombre de conditions autour desquelles seules de légères variations seront autorisées.

2.4.3.2. Eau surnageante

2.4.3.2.1. *Choix d'une eau synthétique ou naturelle*

En microcosmes de laboratoire, les chercheurs ont recours à des milieux artificiels (Taub, 1989 ; Merlin *et al.*, 1992 ; Rai et Mallick, 1993 ; Stay et Jarvinen, 1995 ; Sugiura, 1996) ou des eaux naturelles filtrées puis enrichies en nutriments (Brockway *et al.*, 1979, 1984 ; Seguin, 2001). L'emploi de ces milieux nutritifs facilite la standardisation des outils.

Rares sont cependant les travaux dans lesquels le choix de l'eau utilisée dans les essais est justifié. C'est probablement lié au fait qu'il existe autant d'eaux différentes que de milieux aquatiques du fait de la diversité des facteurs déterminant la qualité d'une eau (précipitations atmosphériques, apports d'eaux et de matières dissoutes et particulaires des bassins versants (eaux de ruissellement et eaux souterraines), action du vent, évaporation des eaux dans les zones littorales, activités biologiques), et qu'en plus de ces variations spatiales il existe également des variations temporelles sur une station donnée de cours d'eau ou de plan d'eau. On mesure alors la difficulté de définir une eau, naturelle ou synthétique, qui serait représentative d'un certain type de milieu (milieu lentique par exemple).

Le choix d'une eau peut être guidé par deux grands types de critères:

- ceux liés à l'aptitude de l'eau au développement, sur la durée du test, des organismes aquatiques utilisés,
- ceux liés aux interactions entre les constituants de l'eau et les substances testées, interactions qu'on peut vouloir minimiser ou au contraire prendre en compte pour les étudier dans un objectif précis (par exemple matières organiques dissoutes et composés organiques hydrophobes).

Les propriétés physico-chimiques d'une eau généralement considérées pour le développement des organismes sont le pH, la salinité (liée aux teneurs en ions majeurs tels que chlorures, nitrates, ammoniacque, sulfates, carbonates, calcium, magnésium, potassium), la dureté (teneurs en Ca et Mg), les teneurs en nutriments (pour les producteurs primaires), les teneurs en oligo-éléments (métaux traces, éléments rares). Chaque espèce présente un préférendum pour chacune de ces caractéristiques, et deux espèces différentes peuvent avoir des exigences très différentes vis-à-vis d'un groupe de substances donné.

Les paramètres qui peuvent interférer avec les toxiques sont, pour les plus importants (Gaidon, 1994):

- le pH qui agit sur la spéciation des métaux mais aussi des composés comme l'ammoniacque (la proportion d'ammoniacque non ionisé, forme généralement toxique de l'ammoniacque, augmente avec le pH), sur la bioaccumulation de certains composés organiques tels que le lindane, le parathion et le benzo(a)pyrène (Kukkonen et Oikari, 1991),
- la dureté et l'alcalinité (somme des teneurs en anions hydrogénocarbonates, carbonates et hydroxydes alcalins ou alcalino-terreux, elle permet d'évaluer la capacité d'une eau à maintenir son pH constant) qui atténuent les effets des métaux par la création de complexes (formes carbonatées par exemple) et la diminution en parallèle des formes ioniques libres plus biodisponibles ou encore par compétition entre métaux et ions calcium et magnésium au niveau de certains sites biologiques,
- les matières organiques dissoutes (substances humiques) et particulaires ou colloïdales, qui, en chélatant les métaux et en les empêchant de traverser les membranes biologiques, atténuent leur absorption et leurs effets vis-à-vis des organismes aquatiques (McCarthy, 1989), et qui ont également, par adsorption ou complexation aux composés organiques hydrophobes, la capacité de diminuer la toxicité des ces composés.

D'autres éléments comme les ions Na^+ , K^+ , Ca^{2+} et Mg^{2+} influent sur la toxicité de métaux comme le cuivre ou le zinc, par compétition au niveau des cibles biologiques entre ces ions et les cations métalliques (Di Toro *et al.*, 2001 ; De Schampelaere et Janssen, 2002).

Le milieu synthétique choisi par Frieda Taub (1989) dans ses travaux en microcosmes a fait l'objet de plusieurs études permettant d'aboutir, par modifications successives, à un milieu considéré par l'auteur comme répondant aux besoins des organismes du microcosme et permettant d'obtenir une sensibilité élevée aux métaux. Elle chercha tout d'abord à définir un milieu permettant d'assurer la croissance algale sans être toxique vis-à-vis de *Daphnia* (milieu T63). Ce milieu fut amendé en vitamines (thiamine, cyanocobalamine, riboflavine, etc.) nécessaires à la reproduction de *Daphnia* (milieu T63MV). Le choix d'introduire des Diatomées dans les microcosmes conduisit à multiplier par 20 la teneur en silice et à ajuster le pH à 7 (milieu T81MV). Des études sur le cuivre montrèrent que la teneur en EDTA du milieu atténuait de façon excessive les effets de ce métal, il fut donc décidé de réduire cette teneur et celle des métaux traces de 5% (milieu T82MV tel que défini dans la norme ASTM de 1993). Il est toutefois précisé que ce milieu n'est pas recommandé pour l'élevage à long terme de *Daphnia*. Taub utilise d'ailleurs pour l'élevage des daphnies le même milieu enrichi en une solution d'oligo-éléments (Br, Sr, Rb, Li, I, Se et V).

Dans tous les essais menés en systèmes de 2 L nous avons eu recours à un milieu synthétique et nous avons plus récemment utilisé de l'eau de nappe ou de l'eau du réseau AEP dans certains essais en microcosmes 100 L ou en microcosmes "gravière", moyennant un enrichissement en N et P pour ces deux derniers cas. Le milieu synthétique est un milieu de cultures pour algues (OCDE, 1993) modifié à plusieurs reprises (**tableau 3**, et composition détaillée en annexe, **tableau A2-1 en annexe 2**).

Initialement, ce milieu a été utilisé pour des essais en systèmes de 2 L algues-daphnies (programme CEEP 1996-1998) sur une semaine, dans lesquels il s'agissait d'obtenir une croissance algale contrôlée par l'activité de broutage de daphnies. Le milieu contenait des teneurs en azote et en phosphore plus faibles que celles du milieu original (50 µg P/L au lieu de 300 µg P/L, et 0.327 mg N/L au lieu de 1.96 mg N/L, avec un ratio N : P de 6.53) pour se rapprocher des conditions des milieux lenticules méso-eutrophes (OCDE, 1982). Nous avons par la suite adopté ce milieu pour les premiers essais en microcosmes 2 L sur 28 jours (Clément et Cadier, 1998).

Comme Taub (1989) nous avons voulu privilégier les producteurs primaires en tant que niveau trophique à la base du développement des autres niveaux, à la différence que les teneurs en nutriments du milieu T82MV sont particulièrement élevées (1.23 mg P/L).

Tableau 3. Différents milieux utilisés en microcosmes 2, 100 et 180 L

Eau	Principe	Microcosmes	Travaux utilisant cette eau
Milieu OCDE modifié dureté faible	croissance algale vitamines daphnies 50 µg P/L 654 µg N/L 31 mg CaCO ₃ /L	2 L Premiers essais 100 L	Clément et Cadier, 1998 Verrhiest, 2001 Clément <i>et al.</i> , 2004 Clément et Zaid, 2004 Triffault-Bouchet, 2004 Triffault-Bouchet <i>et al.</i> , 2004, 2005a,b Clément <i>et al.</i> , 2005b
Milieu OCDE modifié dureté élevée	croissance algale 250 mg CaCO ₃ /L 50 µg P/L 654 µg N/L	100 L	Lottmann, 2003 Clément <i>et al.</i> , 2005a
Milieu OCDE modifié dureté modérée nutriments augmentés	croissance algale vitamines daphnies 152 mg CaCO ₃ /L 289 µg P/L 4 mg N/L	100 L	Thèse Cauzzi en cours (2ème essai 2004)
Eau de nappe enrichie en N et P	croissance algale développement cladocères 172 mg CaCO ₃ /L 100 µg P/L 12 mg N/L	100 L	Thèse Cauzzi en cours (1er essai 2004)
Eau du réseau AEP enrichie en N et P	croissance algale développement cladocères 200 mg CaCO ₃ /L 200 µg P/L 2.6 mg N/L	180 L	Programme Solvay en cours (essai 2005)

Le choix d'un milieu algal comme milieu d'essai dans un microcosme devant permettre le développement de producteurs primaires mais aussi d'invertébrés peut paraître surprenant. Ce faisant, nous n'avons pas optimisé le milieu par rapport aux invertébrés, pour lesquels un milieu synthétique comme le milieu M4 d'Elendt et Bias (1990) a été mis au point et est couramment utilisé dans les élevages, y compris dans les nôtres. Nous avons seulement ajouté à notre milieu la solution de vitamines du milieu M4 (thiamine, cyanocobalamine, biotine). Si l'on compare le milieu OCDE modifié et le milieu M4 (compositions détaillées, **tableaux A2-2 et A2-3 en annexe 2**) on constate de grandes différences sur tous les paramètres. Il apparaît clairement que le milieu OCDE présente une dureté faible, notamment au regard des exigences des daphnies (cf **tableau A2-2**), alors que le milieu M4 contient peu d'azote et de phosphore et n'est en cela pas adapté à la croissance algale. Par ailleurs, si le milieu OCDE est adapté aux algues, il est beaucoup moins riche que le milieu de culture de *Lemna minor*

(**tableaux A2-2 et A2-3**), mais la croissance des lentilles d'eau y est significative comme l'ont montré l'ensemble des essais réalisés. Il faut ajouter que le milieu de culture *Lemna* est un milieu extrêmement riche et d'une acidité rarement rencontrée dans les milieux naturels et est destiné avant tout à obtenir une production élevée de lentilles d'eau. Le milieu microcosme 2 L n'est pas, sur le plan minéralisation, très différent des eaux des lacs d'Aiguebelette et Léman (**tableau A2-2**), eaux dont la composition assez proche est liée au faciès calcaire des bassins-versants et qui présentent une dureté plus élevée que celle du milieu OCDE.

La présence d'oligo-éléments est indispensable pour assurer la reproduction des invertébrés. Selon Elendt et Bias (1990) les milieux synthétiques proposés par divers organismes (ASTM, OCDE, ISO, DIN, ...) pour les tests de toxicité sur daphnies ne sont pas adaptés du fait qu'ils ne contiennent que quelques sels. Le sélénium est selon ces auteurs un oligo-élément important par sa fonction de protection des composants cellulaires contre les peroxydations, mais qui fait souvent défaut dans la plupart des milieux et n'est pas fourni par les algues constituant la nourriture des daphnies. Notre milieu d'essai contient quelques oligo-éléments mais pas de sélénium, et les teneurs ont été initialement définies pour les algues et sont donc différentes des teneurs du milieu M4 préconisées pour les invertébrés (Elendt et Bias, 1990). En cela, comme pour le milieu T82MV de Taub, notre milieu n'est pas un milieu d'élevage de daphnies, mais permet, comme on le vérifiera plus loin (*cf* 2.4.3.4.2.1.4) de soutenir une activité de reproduction dès l'instant où les ressources nutritives sont suffisantes.

La dureté, on l'a vu plus haut, est un autre paramètre clé dans la modulation des effets de certains toxiques. La dureté des milieux daphnies tels que le milieu du test de toxicité aiguë (ISO, 1989) et le milieu d'élevage M4 apparaît élevée au regard des valeurs trouvées dans les milieux naturels (*cf* eau du lac d'Aiguebelette et eau du Lac Léman au **tableau A2-2** ; dureté de 117 à 170 mg CaCO₃/L pour 11 lacs du Michigan, Whitmann *et al.*, 2004). A l'opposé, la dureté du milieu OCDE initial que nous avons utilisé dans les essais en microcosmes 2 L et les premiers essais en microcosmes 100 L est faible mais plus appropriée pour des essais sur métaux. Nous avons cependant opté pour une augmentation de dureté dans les essais réalisés en systèmes de 100 L, de sorte à soutenir le développement des cladocères mais aussi des gastéropodes. Toutefois, si cette augmentation de dureté a été importante dans un premier temps (de 31 à 250 mg CaCO₃/L pour l'essai sur percolats de MIOM, Lottmann (2003), Clément *et al.* (2005a)), en se basant sur les valeurs des milieux daphnies, elle a plus récemment été réduite (152 mg CaCO₃/L) à la suite de discussions avec nos collègues québécois du CEAEQ pour limiter les effets de la dureté sur la biodisponibilité des métaux et se caler sur des valeurs plus réalistes.

Outre la dureté, les teneurs en azote et phosphore sont susceptibles d'être ajustées selon les objectifs fixés et les caractéristiques des microcosmes utilisés. La présence de plantes et les difficultés rencontrées pour assurer une croissance suffisante des algues planctoniques en microcosmes de 100 L nous ont récemment incités à augmenter les teneurs en nutriments.

Parmi les composants des milieux synthétiques pouvant interférer sur la biodisponibilité des métaux, l'EDTA fait souvent l'objet de discussions. Ce composé organique est utilisé pour complexer le fer et lui permettre de rester disponible. On a vu que Taub avait cherché à réduire la teneur en EDTA de son milieu pour exacerber les effets du cuivre. Comparativement aux milieux M4 et T82MV (**tableau A2-2**), la teneur en EDTA du milieu OCDE est faible, mais encore suffisante pour moduler la biodisponibilité du cuivre. Nous avons ainsi pu mettre en évidence l'absence de toxicité du cuivre à 10 µg/L sur l'activité de filtration de *Daphnia magna* dans le milieu OCDE alors que dans le même milieu contenant 10 fois moins de FeEDTA le cuivre à cette concentration inhibe de 50% cette activité de filtration (Clément et Zaid, 2004).

Le recours à une eau naturelle est assez fréquent dans les essais en microcosmes de laboratoire. Lors du premier essai 100 L mené en 2004 (programme Solvay, thèse Nicolas Cauzzi) nous avons utilisé l'eau de nappe prélevée au forage de l'ENTPE et distribuée jusqu'au laboratoire. Cette eau avait été utilisée dans le passé pour maintenir des poissons avant expérimentations, plus récemment dans des travaux sur du périphyton (Parent-Raoult, 2004), et nous l'avons testée avec succès sur nos élevages (daphnies, chironomes, amphipodes) depuis 2003. Compte tenu des besoins de renouvellement (10% chaque semaine, soit 60 litres) et du thème de la recherche (évaluation des effets d'un sédiment traité dans un scénario d'immersion en gravière) nous avons opté pour le choix de cette eau d'origine souterraine et facilement disponible. Un apport de phosphore sous forme KH_2PO_4 a permis d'ajuster sa teneur en P à 100 µg/L (0.3 mg PO_4 /L). Sa composition minérale est fournie au **tableau A2-2**. Sont également fournies les valeurs moyennes sur la même eau lors de 9 prélèvements réalisés sur 2000 et 2003. L'analyse de ces données montre une grande stabilité des caractéristiques de l'eau de nappe disponible au laboratoire. Sa composition physico-chimique la rapproche sensiblement, pour ce qui concerne les éléments majeurs, de celle de l'eau du Lac Léman (**tableau A2-2**).

Plus récemment nous avons utilisé l'eau du réseau de la Courly, distribuée sur la plateforme Eedems, lors de l'essai en microcosmes "gravière". Cette eau a également été utilisée au même endroit dans des essais sur périphyton en rivières artificielles (Volatier, 2004). Sa

composition (**tableau A2-2**) se rapproche de celle de l'eau de nappe, ce qui s'explique probablement par l'origine de cette eau pompée dans la nappe alluviale du Rhône.

L'enrichissement en azote et phosphore d'une eau naturelle comme l'eau de nappe ou l'eau du réseau utilisées, ou même d'un milieu synthétique, ne permet pas de garantir des conditions systématiquement favorables à la croissance des producteurs primaires. Le phosphore, facteur limitant, est présent sous différentes formes (particulaire, soluble réactif au molybdate, soluble non réactif au molybdate) qui ne sont pas toutes biodisponibles (Labroue *et al.*, 1995). C'est l'ion orthophosphate qui constitue la principale forme biodisponible du P pour les algues. Lorsqu'on introduit par enrichissement du P sous forme d'un sel d'orthophosphate (K_2HPO_4 par exemple), l'ion orthophosphate se lie avec les ions présents pour donner différentes formes solubles et en principe biodisponibles (HPO_4^{2-} , $CaHPO_4$ (aq), $H_2PO_4^-$, $CaPO_4^-$, etc.), mais, en fonction du pH, il peut aussi précipiter en partie du fait de la présence de calcium, magnésium, fer, aluminium pour donner, dans le cas du calcium, de l'hydroxylapatite ($Ca_5(OH)(PO_4)_3$).

Nous avons, sur différents milieux utilisés au laboratoire et enrichis en P (100 μg P/L), appliqué un modèle géochimique (JCHESS, Ecole des Mines de Paris) pour connaître le devenir du phosphore. Compte tenu de la dureté le plus souvent moyenne à élevée de ces milieux, on observe la formation de calcite et de dolomite, mais aussi, pour certaines eaux, la formation d'hydroxylapatite (**tableau 4**). Ces minéraux vont rejoindre le sédiment, qui peut constituer un piège efficace si sa surface est bien oxygénée ou au contraire une source de phosphore en conditions anoxiques par dissolution des phosphates liés au fer, à l'aluminium et au calcium (Labroue *et al.*, 1995). Les problèmes de croissance algale (phytoplancton) que nous avons rencontrés dans les essais en microcosmes 100 L en eau de nappe et en milieu OCDE plus dur (cf performances) pourraient s'expliquer par une moindre biodisponibilité du P.

Dans les essais en microcosmes 100 L réalisés avec de l'eau de nappe ou du milieu OCDE modifié nous avons pu observer la présence de Diatomées. Ces micro-organismes ont besoin d'environ 1 mg SiO_2/L selon Seguin (2001) pour élaborer leur frustule, et le milieu synthétique T82MV de Taub en contient 48 mg SiO_2/L pour assurer la croissance des Diatomées introduites (*Nitzschia*). L'eau de nappe contient naturellement 11 mg SiO_2/L (analyse réalisée sur un prélèvement de juillet 2004). Aucun apport de silice n'ayant été réalisé dans le milieu OCDE, il est probable que le sédiment lacustre utilisé constitue une source de silice.

Tableau 4. Composition nominale de différents milieux d'essai et % de phosphore précipité sous forme d'hydroxylapatite (teneurs en mg/L ; dureté en mg CaCO₃/L)

	Milieu test Daphnies	Eau de nappe enrichie	Eau réseau	OCDE dureté faible	Essai 100 L juill 2004 (OCDE dureté moyenne)
pH	8	8	7.68	8	8.4
Cl ^[-]	201	16.3	11.6	17	90.46
NH ₃ (aq)	0.42	0.42	0.42	0.42	2.52
NO ₃ ^[-]	12	12	5.1	1.45	8.7
PO ₄ ^[3-]	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1
SO ₄ ^[2-]	14	33	30	5.85	9.39
HCO ₃ ^[-]	145	122	198	91	91
Na ^[+]	55	11	6.7	34	34
K ^[+]	12	2	1.6	0.06	3.06
Mg ^[2+]	20	6.6	6.2	4.35	7
Ca ^[2+]	81	90	68	4.9	49
dureté	286.5	252.72	196.04	30.52	151.9
Précipitation du P	46%	53%	0%	0%	64%

Enfin, nous avons vérifié que l'eau de nappe ne présentait pas de teneurs significatives en xénobiotiques, compte tenu du contexte urbain du forage. Les métaux lourds (Cd, Cr, Cu, Ni) ne sont pas présents à des teneurs détectables par spectrométrie d'absorption atomique (< 1 µg/L). Parmi les solvants organohalogénés analysés par HS/GC/MS (1,1-dichloroéthylène, bromochlorométhane, chloroforme, 1,2-dichloroéthane, 1,1,1-trichloroéthane, tétrachlorure de carbone, dichlorobromométhane, trichloroéthylène, dibromochlorométhane, tétrachloroéthylène, trans-1,2-dichloroéthylène, 1,1-dichloroéthane, cis-1,2-dichloroéthylène, 1,1,2-trichloroéthane, bromoforme), seuls le 1,1,1-trichloroéthane, le trichloroéthylène et le tétrachloroéthylène sont présents à des teneurs détectables (respectivement 6.9, 1.4 et 8.4 µg/L) mais inférieures aux PNEC de ces substances (de 300 µg/L pour le 1,1,2-trichloroéthane proche du 1,1,1-trichloroéthane, de 115 µg/L pour le trichloroéthylène, INERIS, 2001).

2.4.3.2.2. Evolution de la qualité de l'eau au cours d'un essai

Une fois introduite dans les microcosmes, l'eau voit sa composition physico-chimique évoluer au contact du sédiment et au fur et à mesure des prélèvements par les organismes et du développement des populations.

En l'absence d'étude spécifique de l'influence du sédiment, il est difficile de cerner celle-ci parmi les nombreux facteurs évoqués ci-dessus. On peut néanmoins constater (**tableau 5**) que le milieu OCDE, dans sa composition de base (essai MIOM1) ou dans sa composition modifiée (essai MIOM2, du calcium et du magnésium ont été ajoutés de façon à augmenter la dureté de l'eau), voit sa conductivité et sa dureté augmenter au contact du sédiment d'Aiguebelette utilisé dans des essais en microcosmes 100 L (Lottmann, 2003).

Tableau 5. Composition de deux variantes du milieu OCDE modifié utilisé dans les essais en 100 L (Lottmann, 2003)

Essai		MIOM1		MIOM2	
Période		janv à avril 2003		mai à juillet 2003	
Durée essai		90 jours		90 jours	
sédiment		Aiguebelette		Aiguebelette	
Eau		OCDE	Eau surnageante	OCDE dur	Eau surnageante
pH	Unités de pH	7.33	8.0 à 8.3	nd	8.2 à 8.3
Conductivité	μS/cm	300	300 (stable)	611	780 à 680
O ₂ (%)	%	100	93 à 118	100	95 à 111
COD	mg C/L	0	2 à 2.6	0	1.3 à 2.7
NH ₄ ⁺	mg/L	0.42	1.6 à 0.013	0.42	1.56 à 0.05
Cl ⁻	mg/L	17.1	15 à 20	144.5	137
SO ₄ ²⁻	mg/L	5.9	5 à 7	48.3	31 à 40
NO ₃ ⁻	mg/L	1.45	2 à 18	1.45	0.89 à 19
PO ₄ ³⁻	mg/L	0.15	0 à 0.20	0.15	0.01 à 0.90
Na ⁺	mg/L	34.3	30 à 40	34.3	25 à 36
K ⁺	mg/L	0.06	1 à 3	3.06	2.6 à 5.2
Mg ²⁺	mg/L	4.4	4 à 5	12.2	6 à 12
Ca ²⁺	mg/L	4.9	25 à 40	80	71 à 97
Dureté	mgCaCO ₃ /L	31	79 à 121	251	220 à 267

Dans le cas de l'eau de nappe on observe plutôt une diminution des teneurs en calcium (thèse Cauzzi en cours, rapport intermédiaire, 2005). La teneur de l'eau de nappe en sortie de forage est proche de 95 mg/L contre 57 mg/L dans les systèmes en début d'essai. Cette diminution est attribuée à la précipitation de carbonate de calcium, précipitation qui se manifeste par un dépôt incrustant sur les parois des aquariums. Contrairement au calcium, les teneurs des autres ions ne sont pas significativement affectées par le contact entre l'eau de nappe et le sédiment d'Aiguebelette.

Au cours des essais, les paramètres évoluent sous l'influence du développement des organismes, comme on peut le voir dans les essais en microcosmes 2 L (**tableau 6**). Le pH augmente en lien avec la croissance des algues qui se traduit par un déplacement de l'équilibre calco-carbonique par utilisation du CO₂ dissous (Gaillard, 1995), puis se stabilise

ou décroît selon le type de sédiment et son influence sur la colonne d'eau (**figure 9a** et **figure 10**), mais les variations restent modérées, probablement du fait de l'aération forcée des systèmes. Les variations de la conductivité sont sous la dépendance de plusieurs processus qui ne vont pas dans le même sens : le prélèvement de nutriments par les algues a tendance à entraîner une baisse de conductivité, alors que la minéralisation de matières organiques ou/et la diffusion de nutriments à partir du sédiment et des *excreta* des invertébrés peut conduire à une augmentation (**figure 9b** et **figure 10**) suivie le cas échéant d'une diminution pouvant être liée à la dynamique algues-daphnies (**figure 10**). Malgré la régulation de la teneur en oxygène dissous par le système de bullage, on peut observer des variations de ce paramètre dans le cas d'un développement algal important (**figure 9c** et **figure 10**). Enfin, les teneurs en nutriments diminuent sensiblement du fait des prélèvements par les microalgues et l'absence de renouvellement de l'eau ou d'enrichissement en cours d'essai (**figure 9d**). On notera que les teneurs en ammoniacque non ionisé, calculées à partir du pH, de la température et des teneurs mesurées en ammoniacque total (Emerson *et al.*, 1975), sont la plupart du temps inférieures à 2 mg NH₃/L, donc inférieures aux seuils de toxicité chronique pour les organismes du microcosme (Triffault-Bouchet, 2004). Il convient cependant de remarquer que ces valeurs, non négligeables s'agissant d'eau surnageante, pourraient s'avérer problématiques avec des organismes plus sensibles comme *Ceriodaphnia dubia*, pour laquelle la CE50-48 h varie entre 1 et 2 mg NH₃ non ionisé/L pour un pH voisin de 8 (Ankley *et al.*, 1990) et la reproduction est affectée à pH 8 pour des valeurs comprises entre 0.13 et 0.53 mg NH₃ non ionisé/L (USEPA, 1999).

Une fois les échanges réalisés avec le sédiment (diffusion de calcium en particulier), les teneurs en anions et en cations majeurs sont stables dans la colonne d'eau des microcosmes de 2 litres témoins au cours des essais de 30 jours (Triffault-Bouchet, 2004). Il en est de même pour les teneurs en carbone organique dissous (COD) (Triffault-Bouchet, 2004). On notera que si la teneur en COD du milieu synthétique OCDE est en principe proche de zéro (présence de vitamines en faibles quantités), elle augmente dans la colonne d'eau par diffusion du carbone organique de l'eau interstitielle du sédiment et des apports de Tétramin réalisés initialement dans le sédiment (cas du sédiment artificiel) ou en cours d'essai (cas des sédiments naturels) en vue d'alimenter les organismes benthiques, de sorte à atteindre des valeurs entre 3 et 10 mg C/L voire 40 mg C/L (essai 6PPD), valeurs réalistes par rapport aux eaux naturelles lacustres (de 0.5 mg/L pour un lac de montagne à 40 mg/L pour un lac de tourbière, Meybeck, 1995).

Tableau 6. Evolution des principaux paramètres physico-chimiques de la colonne d'eau au cours d'essais en microcosmes 2 L (28 jours) (nd : non déterminé)

		Triffault-Bouchet 2004		Verrhiest <i>et al.</i> 2002b	Cauzzi 2002	Essai 6PPD		Essai témoins	Clément <i>et al.</i> 2004	Avrain 2000
Nombre d'essais		1	6	2	5	1	1	1	1	1
sédiment		artificiel	naturel	artificiel	artificiel	artificiel	naturel	naturel amendé	artificiel	naturel amendé
pH	Unités de pH	8.1 à 8.5	8.1 à 8.6	7.8 à 6.5	7.6 à 8.4	7.9 à 8.4	8.3 à 8.5	8.0 à 8.6	7.4 à 7.7	8.17 à 8.52
Conductivité	µS/cm	330 à 410	270 à 305	195 à 550	268 à 412	377 à 477	263 à 292	267 à 421	273 à 319	352 à 430
O ₂ (%)	%	89 à 100	93 à 120	80 à 100	nd	87 à 111	94 à 103	92 à 111	80 à 98	90 à 97
COD	mg C/L	5.0 +/- 1.2 à 4.0 +/- 1.4		4-11 à 24-39	nd	13.5 à 27	nd	11.3 à 19.4	nd	nd
NH ₄ ⁺	mg/L	6.5 +/- 6.7 à 7.1 +/- 7.7		0.05 à 0.45	0.5 à 2.05	nd	nd	nd	nd	nd
NH ₃ non ionisé	mg/L	0.1-1.8 à 0.05-1.9		0.001 à 0.009	0.008 à 0.15	nd	nd	nd	nd	nd
Cl ⁻	mg/L	18.4 à 19.6		nd	17 à 27	nd	nd	18 à 20	nd	nd
SO ₄ ²⁻	mg/L	7.3 à 8.8		nd	9.4 à 14.4	nd	nd	5.8 à 4.1	nd	nd
NO ₃ ⁻	mg/L	nd		nd	0.1 à 2.4	nd	nd	0.57 à 2.85	nd	nd
PO ₄ ³⁻	mg/L	nd		nd	0 à 0.8	nd	nd	nd	nd	nd
Na ⁺	mg/L	32.6 à 32.1		nd	19 à 34	nd	nd	34 à 33	nd	nd
K ⁺	mg/L	1.0 à 0.9		nd	0.54 à 0.89	nd	nd	1.02 à 2.65	nd	nd
Mg ²⁺	mg/L	3.8		nd	4.75 à 8.01	nd	nd	4.3 à 4.0	nd	nd
Ca ²⁺	mg/L	26.2 à 25.3		nd	69 à 59	nd	nd	22 à 39	nd	nd

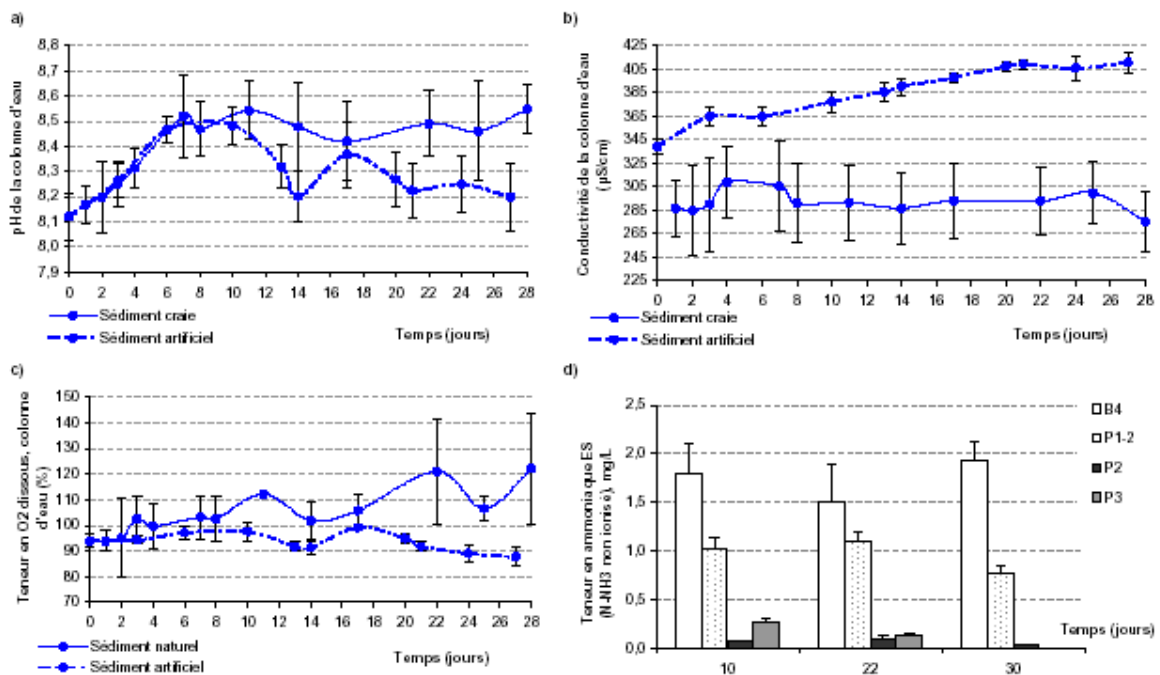


Figure 9. Evolution moyenne des paramètres physico-chimiques décrivant la colonne d'eau des témoins au cours des essais en microcosmes 2 L (a) pH ; b) conductivité ; c) teneur en oxygène ; d) teneur en ammoniaque non ionisé (moyenne +/- écart-type ; ES : eau surnageante) (source : Triffault-Bouchet, 2004)

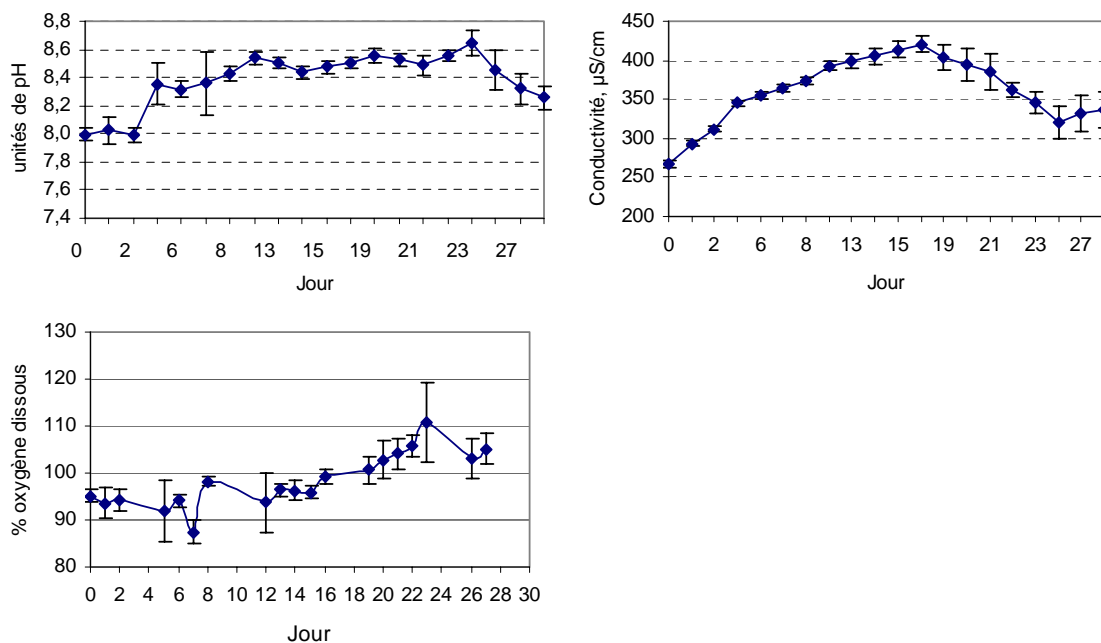


Figure 10. Evolution de quelques paramètres globaux de la colonne d'eau au cours d'un essai en microcosmes 2 L témoins sur sédiment naturel prélevé en 2000 dans le Neyrieux, un affluent de l'Ain (données non publiées) (moyennes +/- écarts-types sur 6 à 30 réplicats selon le jour)

Dans le cas particulier du sédiment artificiel qui a été utilisé à plusieurs reprises, Verrhiest *et al.* (2002b) ont montré que, dans des essais sans organismes supérieurs destinés à étudier le conditionnement du sédiment, le pH et la teneur en oxygène dissous de la colonne d'eau varient peu, que la conductivité augmente et se stabilise, comme pour Triffault-Bouchet (2004), après deux semaines. En revanche, le COD augmente sensiblement au cours de l'essai, passant de 5-10 mg C/L à 2 jours à 40 mg C/L en fin d'essai (30 jours). L'absence d'organismes supérieurs, en particulier chironomes et amphipodes susceptibles de consommer le Tétramin incorporé dans le sédiment, explique probablement cette augmentation par rapport à la stabilité observée par Triffault-Bouchet (2004). Dans le cas d'un sédiment naturel sans apport de Tétramin, Verrhiest *et al.* (2002b) observent aussi une augmentation du COD mais très modérée, et des valeurs finales beaucoup plus faibles (4 mg C/L).

Les essais réalisés dans le cadre de la thèse de Nicolas Cauzzi en microcosmes de 2 L avec du sédiment artificiel (sable de Fontainebleau (74%) + kaolin (20%) + carbonate de calcium (1%) + alpha-cellulose (4.85%) + Tétramin (0.15%)) confirment une faible évolution du pH sur 28 jours (de 7.8 à 8.3 unités pH), une augmentation de la conductivité (de 268 à 412 $\mu\text{S/cm}$), des valeurs de NH_3 non ionisé inférieures à 0.15 mg/L, des teneurs en $\text{PO}_4^{3-} < 1$ mg/L.

2.4.3.2.3. Influence du renouvellement de l'eau

Les écosystèmes aquatiques lenticques ne sont jamais des systèmes clos et bénéficient donc d'un renouvellement de l'eau, aussi faible soit-il. A l'échelle d'un lac les faibles entrées et sorties d'eau dans ces systèmes s'ajoutent à une absence d'écoulement et expliquent les temps de séjour élevés des eaux, allant de quelques semaines à plusieurs dizaines voire centaines d'années (Meybeck, 1995), mais à l'échelle d'une portion de lac (par exemple zone littorale) le renouvellement est plus important. Au laboratoire il peut être utile de travailler en système à renouvellement continu ou intermittent pour mieux mimer la réalité mais également pour éviter l'accumulation de métabolites comme l'ammoniaque, due en partie, dans le cas des essais sur sédiments (Bonnet, 2000) ou de nos essais en microcosmes, à la non consommation de la nourriture apportée, et assurer le renouvellement des nutriments et des sels. Dans le cas des sédiments le renouvellement est souvent recommandé (Ankley *et al.*, 1993) du fait du ratio eau : sédiment assez faible (1.75 chez Bonnet, 2000), et, dans ce cas, aucune aération n'est mise en place. En microcosmes le ratio eau : sédiment plus élevé (de 7 à 20 en microcosmes 2 L selon les travaux, de 20 en microcosmes 100 L) et le nombre de systèmes (jusqu'à 40 en microcosmes 2 L) rendent difficile la mise en oeuvre d'un renouvellement en

continu. L'alternative en conditions statiques consiste à aérer la colonne d'eau en permanence, précaution indispensable lorsque le sédiment et la nourriture ajoutée créent une demande en oxygène. L'ammoniaque éventuellement formé est alors converti en nitrates beaucoup moins nocif pour les organismes. La plupart des travaux réalisés en microcosmes ne renouvellent pas la colonne d'eau, seuls des ajouts sont réalisés pour compenser les pertes par évaporation ou par prélèvement à des fins de mesures. Quelques exceptions existent, notamment les travaux de Brockway *et al.* (1979, 1984). Brockway *et al.* (1979) ont comparé conditions statiques et renouvellement en continu sur des microcosme de 8 L contenant un sédiment naturel. Ils n'obtiennent pas de différences pour les teneurs en nutriments (NH_4^+ , NO_2^- , NO_3^- , PO_4^{3-}), concluant à un bon recyclage de ceux-ci dans les systèmes, en revanche des écarts élevés sont constatés pour la conductivité (sensiblement plus faible en l'absence de renouvellement), le pH (pH de début de journée de 7 en conditions statiques contre 9 en conditions renouvelées), la teneur en COD (2 fois plus élevée en conditions statiques). Si nous avons de notre côté opté dans la majeure partie des cas pour des conditions statiques, pour les raisons indiquées ci-dessus, nous avons eu l'occasion de comparer microcosmes statiques et microcosmes bénéficiant d'un renouvellement intermittent. Nous avons mené un essai en microcosmes 2 L (durée : 28 jours) sur 3 sédiments du Canal de l'Est Branche Sud faiblement à moyennement contaminés (Bray *et al.*, 2001), avec renouvellement complet de la colonne d'eau à 7 et à 14 jours. Le ratio eau : sédiment était d'environ 7. L'apport de nourriture (0.15% de Tétramin) s'est fait en début d'essai par incorporation au sédiment et mélange (sédiments amendés) ou pas du tout. L'aération a été réalisée en continu dans tous les systèmes. Le renouvellement de la colonne d'eau se traduit par une augmentation modérée du pH (maximum 0.3 unité de pH), aucun effet sensible sur la teneur en oxygène, une augmentation de la conductivité dans les systèmes non amendés où ce paramètre diminue du fait des prélèvements par les organismes (notamment microalgues) mais pas d'effet significatif dans les systèmes amendés où la conductivité est maintenue à une valeur plus élevée. La reproduction des daphnies est par ailleurs ponctuellement améliorée (à J9), la croissance des lentilles d'eau est légèrement stimulée et la survie et le développement des organismes benthiques ne sont pas modifiés.

Une autre étude (Triffault-Bouchet, 2004) a été menée sur un sédiment témoin (sédiment d'Aiguebelette) et un sédiment fortement contaminé prélevé dans un canal du Nord de la France (code 12570). Deux taux de renouvellement de l'eau (25% ou 50% par semaine) ont été étudiés simultanément et comparés à la situation sans renouvellement, étudiée lors d'un essai antérieur. La nourriture des organismes benthiques a été apportée au cours de l'essai.

Les paramètres physico-chimiques ne sont dans l'ensemble pas modifiés par le renouvellement, à l'exception de la conductivité qui diminue lorsque le taux de renouvellement augmente, et des teneurs en métaux des eaux interstitielles qui augmentent. La croissance algale n'est pas modifiée, alors que celle des lentilles d'eau est diminuée, la survie et la reproduction des daphnies sont améliorées, et la survie des amphipodes est légèrement améliorée.

Globalement, on voit que les renouvellements pratiqués dans le cadre de ces deux essais n'ont pas eu d'effets marqués sur la plupart des paramètres physico-chimiques et n'ont pas permis d'améliorer sensiblement la survie des organismes en présence de sédiments contaminés. Il est vrai que les taux de renouvellement retenus (25, 50 ou 100% par semaine) étaient faibles par rapport aux taux couramment adoptés dans les tests monospécifiques sur sédiments (volume d'eau renouvelé 2 à 3 fois par jour pour les tests sur 10 ou 14 jours (Bonnet, 2000), et en tout état de cause pas plus de 4 fois par jour pour ne pas entraîner un lessivage des contaminants du sédiment selon Ingersoll et Nelson (1990)).

Dans l'essai en gravières pilotes (contrat Solvay) avec un volume d'eau de 180 L, le renouvellement en continu devait permettre de s'affranchir de l'aération forcée. L'eau du réseau était préalablement déchlorée et aérée dans le bac tampon de façon à obtenir un taux de saturation en O₂ de 90-95%. Le taux de saturation dans les gravières s'est maintenu entre 80 et 95% au cours des 10 premiers jours puis a chuté à des valeurs de 50-60% qui ne semblent pas avoir gêné le développement des organismes les plus sensibles à la teneur en oxygène dissous (cladocères). Cette chute peut être due à l'élimination du périphyton qui se développait de façon excessive sur les parois, lequel périphyton pouvait assurer une oxygénation suffisante de la colonne d'eau. Malgré le renouvellement en continu, l'eau traversait un massif de tout-venant constituant, par la respiration des microorganismes non autotrophes présents, une demande en oxygène non compensée par les producteurs primaires du plan d'eau. D'une certaine manière, le phénomène observé rendait bien compte de l'origine phréatique de l'eau, comme cela peut être observé sur le terrain.

2.4.3.2.4. Influence du ratio eau : sédiment

Cette question est souvent liée à la précédente, dans la mesure où le ratio eau : sédiment dépend étroitement du taux de renouvellement de celle-ci. Dans les tests statiques ce ratio est fixe (en moyenne de 2, et au maximum de 7 (Stewart et Thompson, 1995)), alors que dans les tests dynamiques il augmente par définition en cours d'essai (avec un ratio eau : sédiment instantané de 2 et un renouvellement de 4 volumes par jour, le L : S atteint 80 au bout de 10

jours). Si, dans les essais en microcosmes 2 L, le ratio (statique) a le plus souvent varié entre 7 et 20 selon la quantité de sédiment utilisée (100 à 300 g sec), nous avons eu l'occasion de comparer dans un essai sur un sédiment contaminé trois ratios : 3, 7 et 13 (Triffault-Bouchet, 2004). Les résultats détaillés sont présentés dans Triffault-Bouchet (2004), qui montre un enrichissement (ions, métaux, MOD) de la colonne d'eau lorsque L : S diminue, aucun effet notoire pour les organismes à l'exception de l'amphipode *Hyaella azteca* dont la survie diminue avec L : S.

2.4.3.3. Sédiment

2.4.3.3.1. Importance du sédiment

Les sédiments ont une structure mixte : une phase solide dominante et une phase liquide, l'eau interstitielle. La phase solide particulaire présente une grande variété de constituants (argiles, carbonates, sulfates, détritiques organiques,...). La nature, la dimension et la taille des particules conditionnent les capacités d'adsorption des substances chimiques et déterminent en partie les possibilités de migration de ces substances (Cabridenc, 1991). La composition de l'eau interstitielle dépend évidemment de celle de la phase particulaire mais aussi des processus biologiques qui s'y déroulent. La colonne d'eau au contact du sédiment et de l'eau interstitielle verra également sa composition influencée par celle du sédiment et par les réactions qui s'y déroulent. Wang *et al.* (2005) montrent ainsi que le devenir et la toxicité vis-à-vis de *Daphnia magna* d'un tensio-actif (*polyethoxylated tallowamine*, ou POEA) dans des microcosmes diffèrent selon qu'un sédiment est présent ou non. La présence de sédiment entraîne dans cette étude un abattement important de la substance dans la colonne d'eau.

Il n'existe malheureusement pas de sédiment naturel type, disponible partout et en grandes quantités, la diversité de composition est extrême, comme le montrent les données publiées par Suedel et Rodgers (1994a). On voit ainsi que le COT varie entre 0 et 11.8%, la teneur en matière organique entre 0 et 45%, la capacité d'échange cationique (CEC) entre 0 et 71 meq/100 g, le potentiel rédox entre -409 et +379 mV, le pH entre 6 et 9, la proportion d'argile entre 0 et 60%, celle de limon entre 0 et 95%, et celle de sable entre 2 et 100%. Partant de ce constat, le choix du sédiment est une étape incontournable de tout essai biologique faisant intervenir cette matrice, qu'il s'agisse d'essais monospécifiques ou d'essais en microcosmes.

2.4.3.3.2. Sédiment naturel ou artificiel ?

S'il s'agit d'étudier les effets de polluants par rapport à un site particulier, il semble logique de travailler avec le sédiment du site, tout en étant conscient qu'il existe rarement un seul

sédiment représentatif d'un site donné et qu'il pourra être nécessaire de mettre en œuvre au préalable une stratégie d'échantillonnage, selon l'objectif recherché. Compte tenu de la grande hétérogénéité de nombreux sites, une telle démarche peut rapidement devenir coûteuse par le nombre de prélèvements et d'essais à réaliser. Lors de l'étude sur la 6PPD, nous avons choisi de réaliser, de façon aléatoire, un seul prélèvement en amont du tronçon de rivière qui avait été contaminé par des eaux d'extinction d'un incendie, en supposant ce sédiment caractéristique du contexte géologique. Il s'agissait de tenir compte des propriétés du sédiment du cours d'eau récepteur pour évaluer de façon réaliste l'impact attendu du rejet accidentel, sachant qu'un autre essai était réalisé sur un sédiment artificiel (voir plus loin).

S'il s'agit de reconstituer, au sein du microcosme, un compartiment sédimentaire possédant certaines propriétés fondamentales comme la séquestration des polluants ou l'aptitude au développement d'organismes benthiques, sans référence à un contexte géographique particulier, on choisira de travailler avec un sédiment naturel de référence ou avec un sédiment artificiel reconstitué à partir de matériaux identifiés. La formulation des sédiments artificiels n'est pas standardisée, mais le sable et l'argile sont souvent à la base de leur composition. La granulométrie du sable est variable, généralement limitée à des tailles <2 mm, voire 300 µm (Naylor et Rodrigues, 1995). Le sable est lavé à l'acide ou/et à l'eau déminéralisée avant emploi. L'argile est le souvent du kaolin (Fleming *et al.*, 1998; Naylor et Rodrigues, 1995; Suedel et Rodgers, 1994a, 1994b; Kemble *et al.*, 1999), aluminosilicate bien répandu sur toute la planète, à faible capacité d'échange cationique (CEC de 1 à 20 meq/100 g ou 5-15) et donnant un pH acide (3.4-3.5) (Suedel et Rodgers, 1994a). Le kaolin peut être préalablement incinéré à 550°C pour éliminer toute trace de matières organiques (Fleming *et al.*, 1998). Certains auteurs utilisent de la montmorillonite, à CEC plus élevée (120 meq/100 g, 80-120) et de pH neutre (7.4).

Les principales variations de formulation rencontrées se situent au niveau de la nature de la matière organique qui est le plus souvent :

- de l' α -cellulose, matière organique simulant un apport végétal à un stade de dégradation peu avancé (macrophytes), très peu contaminée et biologiquement inactive (Fleming *et al.*, 1998; Clément et Cadier, 1998; Kemble *et al.*, 1999; OCDE, 1998; Rand *et al.*, 2003);
- de la sphaigne, d'origine végétale également (Watzin *et al.*, 1994; Naylor et Rodrigues, 1995; Fleming *et al.*, 1998; Verrhiest *et al.*, 2000; OCDE, 1998), souvent choisie sur la base de la composition du test OCDE ver de terre (Naylor et Rodrigues, 1995) et, plus

récemment, Chironome (OCDE, 1998), mais aussi parce qu'elle représente une M.O. plus complexe et plus naturelle que la cellulose pure. Cependant, outre ses caractéristiques mal définies, elle est difficile à humidifier et a tendance à flotter en surface (Fleming *et al.*, 1998);

- de l'humus, matière organique complexe, représentative d'un stade de dégradation plus avancé (Suedel et Rodgers, 1994a, 1994b; Suedel et Rodgers, 1996) et d'origine végétale et animale (Suedel et Rodgers, 1994a).

Le **tableau 7** présente des formulations utilisées dans des études auxquelles nous avons participé, ainsi que celle adoptée dans la ligne directrice OCDE du test chironome, proche des premières. Les compositions indiquées sont en % par rapport au poids sec total, l'addition d'une colonne d'eau aboutit en général à un sédiment dont la teneur en eau est d'environ 23% (par rapport au poids humide total). La kaolinite a été retenue parce qu'elle est prête à l'emploi dans le commerce alors que la montmorillonite sodique nécessite un traitement au CaCO_3 qui la transforme en montmorillonite calcique et tamponne son pH, acide au départ. Comme rappelé ci-dessus, la kaolinite est couramment utilisée en sédiment artificiel, ce qui lui confère un autre avantage. Le sable, au départ du sable de Fontainebleau commercialisé et de granulométrie assez fine (150 à 210 μm , sable fin), a été remplacé par du sable de Loire de granulométrie plus grossière (grains $>500 \mu\text{m}$) et qui nécessite un tamisage à 2 mm et un lavage préalables. Le TétraMin incorporé au sédiment apporte une matière organique facilement assimilable par les chironomes et les amphipodes qui permet à ceux-ci de se développer au cours des essais. Le choix d'incorporer au sédiment cette matière organique répond à un souci de disposer au départ de chaque essai d'un sédiment stabilisé au regard de son activité biologique et de l'équilibre des contaminants, ces deux propriétés pouvant être perturbées par un apport de nourriture en cours d'essai (Stewart et Thompson, 1996).

Le choix de l' α -cellulose nous a paru intéressant pour les raisons avancées par Kemble *et al.* (1999) et rappelées ci-dessus. Sur le plan de la représentativité de la matière organique, l' α -cellulose apparaît en revanche plus difficile à justifier, parce qu'elle apporte essentiellement du carbone et qu'elle est difficilement dégradable par les bactéries. La présence de TétraMin, qui apporte aussi des protéines, devait permettre d'abaisser le rapport C/N et de favoriser l'activité bactérienne.

La formulation particulière adoptée pour l'étude sur la 6PPD, qui se traduit par un sédiment à dominante sableuse, était destinée à approcher le faciès de sédiment naturel rencontré localement. On trouvera dans Bonnet (2000) d'autres formulations de la littérature.

Le choix entre sédiment artificiel et sédiment naturel dépend des objectifs poursuivis, chaque type de sédiment présentant des avantages et des inconvénients (**tableau 8**). Ces avantages et inconvénients sont dus au fait que de nombreux paramètres sédimentaires influent sur le développement des organismes d'une part, et sur le devenir et la toxicité des substances présentes ou introduites d'autre part. Nous avons pu, au cours de différentes études, apprécier l'influence de ces paramètres.

2.4.3.3. *Influence de la texture et de la structure du sédiment sur le développement des organismes benthiques*

Le sédiment témoin utilisé doit être propice au développement des organismes benthiques introduits.

H. azteca n'a pas de préférence par rapport à la texture et à la structure du sédiment (naturel ou artificiel), tout au moins pour une exposition généralement de 10 jours (durée d'exposition des essais de survie et de croissance monospécifiques) (Suedel et Rodgers 1994b ; Ingersoll et Nelson, 1990). *C. riparius* tolère également une large gamme de taille de particules (ASTM, 1995; Ingersoll et Nelson, 1990 ; Sibley *et al.*, 1998. Bonnet (2000) confirme ces résultats en montrant des survies comprises entre 60 et 95% pour *C. riparius* et entre 78 et 100% pour *H. azteca* dans six sédiments de granulométries contrastées (teneurs en limon + argiles entre 17 et 87%). Selon Péry *et al.* (2002), qui ont étudié la croissance de *C. riparius* dans divers sédiments et dans différentes conditions d'alimentation, les chironomes croissent mieux dans les sédiments ni trop grossiers (+ de 95% des particules < 200 µm) ni trop fins (plus de 25% des particules au-dessus de 50 µm), c'est-à-dire les sédiments sableux fins à très fins. Selon ces auteurs, la granulométrie intervient dans la facilité à construire les tubes, le retard pris par une larve pour construire son tube pouvant se répercuter sur sa croissance car elle ne se nourrirait qu'une fois son tube construit.

De notre côté nous avons toujours obtenu des survies de ces organismes > 70% dans la plupart des sédiments de référence faiblement contaminés prélevés en rivière ou en lac et de granulométrie variable (teneur en argile + limons entre 6 et 91%, **tableau 9**). Les travaux de Triffault-Bouchet (2004) montrent qu'un sédiment tel que celui prélevé au Lac d'Aiguebelette (sédiment carbonaté appelé « craie »), dont la granulométrie peut varier d'un prélèvement à l'autre (**tableau 9**) mais qui conserve l'aspect d'un sédiment de type sable fin limono-argileux, est propice au développement de *H. azteca* et *C. riparius* sur 28 jours d'essai en microcosmes, comme le montrent les résultats de survie et d'émergence (> 80%).

Tableau 7. Composition de quelques sédiments artificiels (en % de matière sèche)

Sable	Kaolin	Carbonate de calcium	Alpha-cellulose	TétraMin	Tourbe de sphaigne	Spiruline	Extrait de viande	COT	Référence
95.2%	0%	0%	4.80%	0%	/	/	/	2%	Clément et Cadier, 1998
97.5%	0%	0%	2.44%	0% à 0.56%	/	/	/	1% à 1.3%	
65% ⁽¹⁾	30%	0.10%	4.75%	0.15%	/	/	/	2%	Triffault-Bouchet, 2004
65% ⁽¹⁾	30%	0%	4.85%	0.15%	/	/	/	2%	Clément <i>et al.</i> , 2004
65% ⁽¹⁾	30%	0.10%	4.75%	0.15%	/	/	/	2%	Verrhiest <i>et al.</i> , 2001
90% ⁽¹⁾	5%	0%	4.85%	0.15%	/	/	/	2%	Rapport essai 6PPD
77.2% ⁽³⁾	19.9%	0.5% ou 0.10%	2.4%	0.2%	0%	0%	0%	1%	Verrhiest <i>et al.</i> , 2000
				0%	0%	0.075%	0.075%	1%	
			0%	0.2%	2.40%	0%	0%	1.3%	
62 à 66%	29 à 30%	0.1%	0.15%	0 ou 4.75%	3.9, 5.5 ou 9.7% ⁽⁵⁾	/	/	2 à 5.7%	Garric <i>et al.</i> , 2001
75% ⁽²⁾	20%	tel que pH = 7.0	⁽⁴⁾	/	5%	/	/	2%	OCDE, 1998

(1) sable de Loire tamisé à 2 mm, particules entre 500 µm et 2 mm, diamètre moyen 750 µm

(2) sable industriel avec plus de 50% de particules entre 50 et 200 µm

(3) Sable de Fontainebleau (particules de diamètre moyen 150 à 210 µm)

(4) alternative à l'emploi de tourbe de sphaigne

(5) tourbe brune ou blonde

Tableau 8. Avantages et inconvénients de l'utilisation de sédiments artificiels ou naturels

Type de sédiment	Avantages et inconvénients
Sédiment artificiel	Témoin développement des organismes Composition entièrement connue et modulable Etude de l'influence d'un paramètre (% M.O., % fines, etc.) Reproductibilité maximale Contamination initiale quasi-nulle Reconstitution facile Pas de microfaune indigène perturbatrice Fonctionnement microbien non optimal Complexité du sédiment non représentée
Sédiment naturel	Témoin développement des organismes Composition partiellement connue Paramètres fixes pour un sédiment (%M.O., % fines) Reproductibilité faible Contamination initiale possible Microfaune perturbatrice non entièrement éliminable Fonctionnement microbien réaliste Complexité du sédiment prise en compte

C'est également ce sédiment que nous avons finalement retenu pour l'élevage des chironomes au L.S.E.. Tous les sédiments naturels non contaminés ne sont pas pour autant propices au développement des organismes benthiques. Ainsi, le sédiment que nous avons appelé improprement "tourbe d'Aiguebelette" en raison de son origine (sédiment prélevé au pied d'une roselière, à forte teneur en cellulose), et dont nous avons étudié les interactions avec le pyrène, s'est-il révélé médiocre pour la survie et le développement des larves de chironomes (Cauzzi 2002). Selon Péry *et al.* (2002), qui l'ont également étudié dans leur étude de modélisation du développement de *Chironomus riparius*, ce sédiment, en dépit d'une forte teneur en COT, ne présente pas une matière organique endogène adaptée à ces organismes qui voient leur survie affectée en l'absence d'apport alimentaire exogène, contrairement à d'autres sédiments naturels. Selon les mêmes auteurs, le C : N élevé de ce sédiment pourrait refléter une qualité de M.O. non appropriée. La granulométrie de sédiments artificiels à dominante sableuse (**tableau 10**), convient également au développement des organismes benthiques, comme le montrent les résultats de l'essai sur la 6PPD (survie chironomes 28 jours : 88 à 96%).

Tableau 9. Caractéristiques physico-chimiques et granulométriques de sédiments naturels utilisés comme références dans divers essais (Ain et Neyrieux : G. Verrhiest (2001) ; Aiguebelette : Cauzzi (2002) et rapport programme pyrène ; Bédât : étude 6PPD ; nd : non déterminé)

Sédiment	Ain		Neyrieux			Aiguebelette "craie"		Aiguebelette "tourbe"		Bédât	
Prélèvement	06/03/2000	02/10/2000	06/03/2000	18/05/2000	02/10/2000	12/02/2001	15/01/2001	06/03/2001	15/01/2001	06/03/2001	
Teneur en eau (%)	60	65.4	66	34.9	31.3	39	47.9	nd	84.7	nd	19-21
Perte au feu (% poids sec)	8.56	8.77	9.35	2	2.82	3.45	4.89	nd	40.48	nd	1.1-1.3
COT (% poids sec)	3.2	3.2	3.2	0.93	1.27	1.57	1.3	nd	20.9	nd	nd
pH	nd	nd	nd	nd	nd	nd	7.7	nd	6.9	nd	7.1-7.3
Sable grossier % > 500 µm	0	0.5	1	15.5	9.8	5.2	0.0	2.13	19.67	21.24	63.40
Sable moyen % 500-200 µm	0.7	0.5	1	65.5	60.4	48.6	6.54	18.5	32.09	31.77	21.66
Sable fin %200-50 µm	8.8	9.5	13	13.2	21.4	33.9	52.93	54.8	31.78	30.10	7.32
% Limons et argiles < 50 µm	90.5	89.5	86	5.8	8.4	12.3	40.53	24.6	16.46	16.89	7.62

Tableau 10. Granulométrie du sédiment artificiel à dominante sableuse utilisé dans l'étude sur la 6PPD (résultats exprimés par rapport au sédiment tamisé à 2 mm)

Classe de granulométrie	< 2000 μm et > 1000 μm	de 500 à 1000 μm	de 200 à 500 μm	de 50 à 200 μm	< 50 μm
sédiment artificiel reconstitué	79.27%	0%	0.39%	5.06%	14.62%
sec		0%	0%	4.67%	15.33%
récupéré dans des microcosmes					
témoins	85.70%	0.49%	1.58%	3.84%	8.07%
% eau = 25,7% avant séchage		0.85%	1.62%	3.33%	8.15%

2.4.3.3.4. Effet de la quantité de nourriture apportée sur le développement des organismes benthiques

La plupart des auteurs menant des essais sur sédiments naturels choisissent de nourrir les organismes benthiques. En l'absence de nourriture apportée, ceux-ci doivent utiliser la matière organique naturellement présente dans le sédiment, qui peut varier en quantité et en qualité et ne pas s'avérer suffisante pour assurer un taux de survie satisfaisant et une croissance significative (Bonnet, 2000). Péry *et al.* (2002), cherchant à comprendre l'influence de la quantité de nourriture sur la survie, la croissance, l'émergence et la reproduction de *Chironomus riparius*, ont montré que les larves survivaient sans apport exogène de nourriture mais montraient une croissance faible. Mais lorsque la nourriture est limitée, la possibilité d'utiliser la matière organique endogène se traduit par des émergences plus rapides. Enfin, lorsque la nourriture n'est pas limitante (1.4 mg/larve/jour), il n'y a qu'un léger effet du sédiment sur la croissance et sans conséquence sur l'émergence.

En ce qui concerne les sédiments artificiels, la matière organique incorporée est en général peu assimilable (cellulose, humus, tourbe de sphaigne). Pour apporter une matière organique adaptée à la croissance des organismes, lors d'essais sur sédiments naturels ou artificiels, nous utilisons du TétraMin, qui se présente sous la forme de flocons de débris de poissons séchés. C'est cette même matière organique qui est utilisée dans les élevages. Le TétraMin est le plus souvent apporté au cours du test à raison d'une dose journalière pour éviter l'accumulation en surface du sédiment et une dégradation de la qualité du milieu par le développement de fermentations. Nous avons, au cours des différents essais en microcosmes, adopté différentes stratégies. Dans les essais sur sédiment artificiel, nous avons choisi d'incorporer du TétraMin dans la masse du sédiment, au moment de la préparation de ce dernier. A l'issue de tests préliminaires (Clément et Cadier, 1998) nous avons pu retenir une teneur en TétraMin de

0.15% correspondant à 450 mg pour 25 larves de chironomes et 10 amphipodes, soit 0.46 mg/individu/jour (**figure 11**).

Cette valeur est légèrement inférieure aux doses apportées dans les essais monospécifiques sur 10 ou 28 jours (*C. riparius*) ou 14 jours (*H. azteca*) au regard de la littérature (1 mg/larve/jour pour Naylor et Rodrigues, 1995 ; 0.6 mg/larve/jour pour Kemble *et al.*, 1999; 0.25-0.50 mg/larve/jour sur les 10 premiers jours puis 0.5 à 1 mg/larve/jour jusqu'à J28 dans le test d'émergence de l'OCDE (1998)), mais assure une survie, une croissance et une émergence suffisantes (*cf* 2.4.3.4.2). Dans les essais sur sédiments naturels, nous avons opté dans un premier temps pour la même procédure (incorporation initiale de 0.15% de Tétramin), mais cela a conduit à des fermentations qui se sont traduites par un gonflement du sédiment et la production de gaz (non analysé mais probablement du sulfure d'hydrogène), aboutissant à de mauvaises performances. Nous avons alors choisi d'apporter le Tétramin en surface au cours de l'essai, à raison de 10 mg/jour pour 25 larves de chironomes et 10 amphipodes (Triffault-Bouchet, 2004), soit 0.30 mg/individu/jour, une dose légèrement inférieure à celle apportée en sédiment artificiel, déficit souvent compensé par la matière organique endogène du sédiment naturel. Ce dosage a permis d'éviter les problèmes de fermentation évoqués plus haut et d'atteindre des performances satisfaisantes.

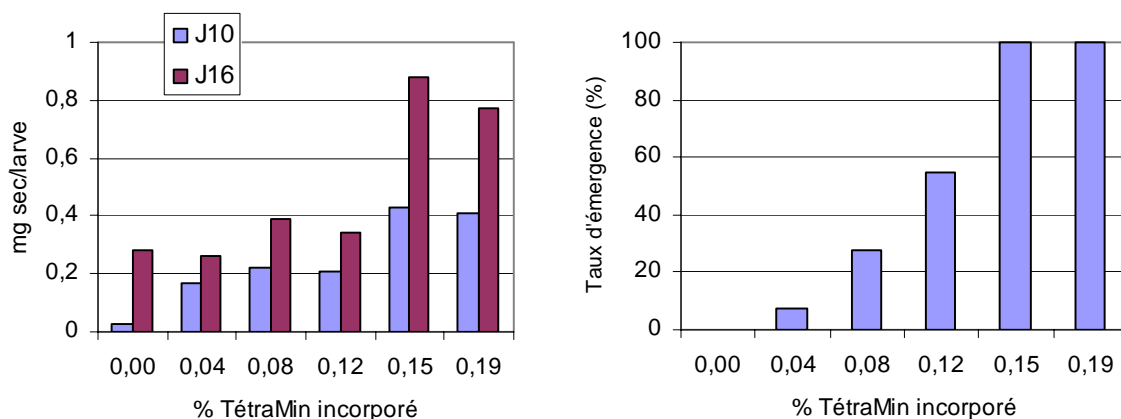


Figure 11. Relation entre dose de Tétramin incorporé au sédiment artificiel et poids sec des larves de chironomes à 10 et 16 jours (a), et taux d'émergence sur 28 jours des chironomes (b) (d'après données de Cadier (1997) et Clément et Cadier (1998)).

Il convient de noter que la façon dont le Tétramin est apporté, par mélange initial au sédiment (cas du sédiment artificiel) ou apport en surface au cours du test (cas des sédiments naturels), n'est probablement pas neutre sur le développement des organismes benthiques. Outre les problèmes de fermentation qui peuvent aussi survenir dans les essais sur sédiment artificiel, il

faut s'attendre à une meilleure utilisation de la nourriture lorsque celle-ci est déposée en surface, comme l'ont observé Naylor et Rodrigues (1995) et plus récemment Péry *et al.* (2002) sur des larves de *C. riparius*. Selon les premiers, l'incorporation initiale du Tétramin au sédiment par mélange dans la masse aboutit, au bout de 10 jours, à des larves de chironomes significativement moins grosses que lors d'un apport en surface étalé sur la durée du test (poids sec : 0.1 mg/larve contre 1.2 mg/larve). Pour Péry *et al.* (2002), les larves utilisent plus efficacement la nourriture apportée en surface que la matière organique endogène répartie dans tout le sédiment, ce qui peut expliquer la faible influence de celle-ci. On peut penser que le Tétramin déposé en surface est plus concentré et plus rapidement disponible pour des organismes qui se tiennent plutôt dans les premiers mm de sédiment, nécessitant une dépense énergétique moindre que lorsque la nourriture est répartie dans tout le sédiment.

La nécessité d'un apport en nourriture exogène dans les essais en microcosmes développés dans ce travail constitue un élément de déception. En effet, le protocole du microcosme est une tentative de recréer un écosystème certes simplifié mais qui se voudrait autonome c'est-à-dire dans lequel les cycles de la matière permettraient de ne compter que sur l'énergie lumineuse et la matière initiale pour, par le biais de la production primaire et de la décomposition de la matière organique produite, initier un fonctionnement en boucle autorisant la pérennisation de chaque maillon nécessaire à l'auto-suffisance du système pendant un temps assez long du fait de la présence de plusieurs niveaux trophiques (Forbes et Forbes, 1994). Visiblement, le turn over de la matière organique n'est pas assez rapide pour assurer aux organismes benthiques une ressource alimentaire suffisante. Nous l'avons également observé dans les essais en microcosmes de 100 et 200 L où une durée de plusieurs mois ne suffit pas à la mise en place d'un système autonome. Ceci est probablement lié à la trop grande simplicité des systèmes, ou/et à des proportions inadéquates en termes de biomasses initiales.

2.4.3.3.5. *Conditionnement de sédiments artificiels*

L'utilisation de sédiments artificiels conditionnés est souvent recommandée pour offrir de meilleures conditions de développement aux organismes benthiques (Suedel et Rodgers, 1994b; Burton, 1996; Fleming *et al.*, 1998; OCDE, 1998, Kemble *et al.*, 1999). Kemble *et al.* (1999) ont observé que la croissance de *Hyalella azteca* sur 10 jours était plus faible en sédiment artificiel qu'en sédiment naturel. Ils ont supposé que ce résultat pouvait être dû à une activité microbienne limitée du sédiment artificiel et se sont interrogés sur le besoin d'une

étape de conditionnement du sédiment artificiel préliminaire aux tests. Le conditionnement consiste à immerger le sédiment artificiel pendant environ une à deux semaines, sous colonne d'eau, dans les conditions du test envisagé. Suedel et Rodgers (1994b) ont conditionné chacun des constituants d'un sédiment artificiel en les hydratant pendant 7 jours avec de l'eau d'un étang. Ces derniers ont observé qu'à l'inverse du sédiment conditionné, le substrat non conditionné était impropre à la survie de *Hyalella azteca*. La colonisation de la matrice par des microorganismes induirait de meilleures conditions de survie et de nourriture pour cet amphipode. D'autres études ont prouvé que le conditionnement d'un sédiment artificiel peut indirectement améliorer la qualité de l'eau surnageante par la stabilisation de certains paramètres physico-chimiques comme l'oxygène dissous et le pH (Sawyer et Burton, 1994; Suedel et Rodgers, 1994a). Bonnet (2000) obtient, pour une douzaine d'essais monospécifiques (*H. azteca* ou *C. riparius*) en sédiment non conditionné et 7 ou 14 essais en sédiment conditionné, une meilleure survie de ces organismes (de 70% à 90%) en sédiment conditionné mais aucune amélioration sur la croissance. Nous n'avons réalisé, dans le cadre du programme PNETOX (Verrhiest, 2001), que deux essais en microcosmes sur sédiment artificiel conditionné ou non, nos résultats ne permettent pas de mettre en évidence une différence significative sur le plan de la survie des organismes benthiques, mais le conditionnement a un effet positif sur la croissance des lentilles et le développement des daphnies (non publié).

L'influence de la durée de conditionnement sur les conditions physico-chimiques et biologiques induites dans le sédiment n'avait jamais été déterminée. Les études entreprises dans le cadre du programme PNETOX Sédiments ont permis de préciser le protocole de conditionnement ou maturation dans le cas de sédiments artificiels constitués de sable, kaolin, alpha-cellulose et Tétramin (Verrhiest *et al.*, 2002b). Le suivi des paramètres physico-chimiques et biologiques du sédiment et de la colonne d'eau a été effectué sur 30 jours d'incubation dans deux laboratoires. Le pH, le rédox, le Carbone Organique Dissous (COD), les teneurs en NH₄ et NO₂, le Carbone Organique Total (COT) ont été mesurés. La communauté bactérienne était caractérisée par la détermination de la densité bactérienne, du nombre de bactéries totales ou d'Unités Formant Colonie (UFC), plusieurs activités enzymatiques (activités β-glucosidase, xylosidase, leucine-aminopeptidase, phosphatase et sulfatase), et trois productions de gaz (CO₂, N₂O et CH₄). La même expérience a été menée avec un sédiment naturel. Un conditionnement de 10 à 15 jours a permis une stabilisation physico-chimique et a correspondu à des changements cinétiques des activités d'hydrolyse. Comparée aux données du sédiment naturel, l'activité biologique du sédiment artificiel a

montré une dynamique différente avec des niveaux d'activités plus faibles. Pour les deux sédiments, une décroissance importante des niveaux d'activités a été observée après 15 jours du fait d'une limitation en substrat. Ce travail a montré qu'un traitement préliminaire de conditionnement du sédiment artificiel permet la stabilisation de paramètres qui peuvent affecter la biodisponibilité de toxiques. C'est la raison pour laquelle nous avons choisi par la suite de conditionner systématiquement les sédiments artificiels utilisés dans certains essais.

2.4.3.3.6. Influence de l'endofaune sur le développement des organismes introduits

L'utilisation de sédiments naturels pour des essais sur organismes benthiques introduits à partir d'élevages doit s'affranchir de possibles interactions entre ces organismes introduits et l'endofaune présente. Celle-ci peut en effet constituer une source de compétition pour l'espace ou/et la nourriture, voire de prédation. Ainsi, Reynoldson *et al.* (1994) ont-ils observé une diminution significative du poids des larves de *Chironomus riparius* en présence de *Tubifex tubifex* à des densités > 1460 individus/m², et une diminution du poids de *Hyaella azteca* de 60% à une densité de *T. tubifex* de 20000 individus/m². Lors des essais en microcosmes de 2 L nous n'avons pas observé de développement d'organismes autochtones, probablement du fait de la durée relativement courte des essais et du stockage préalable du sédiment à 4°C ou à -18°C. En revanche, dans les essais en microcosmes 100 L sur plusieurs mois sur sédiment d'Aiguebelette, pour lesquels le sédiment était conservé moins d'une semaine à 4°C ou deux à trois semaines sous eau à température ambiante, nous avons noté la présence d'Oligochètes et de larves d'Ephéméroptères finissant par émerger (**figure 12**).

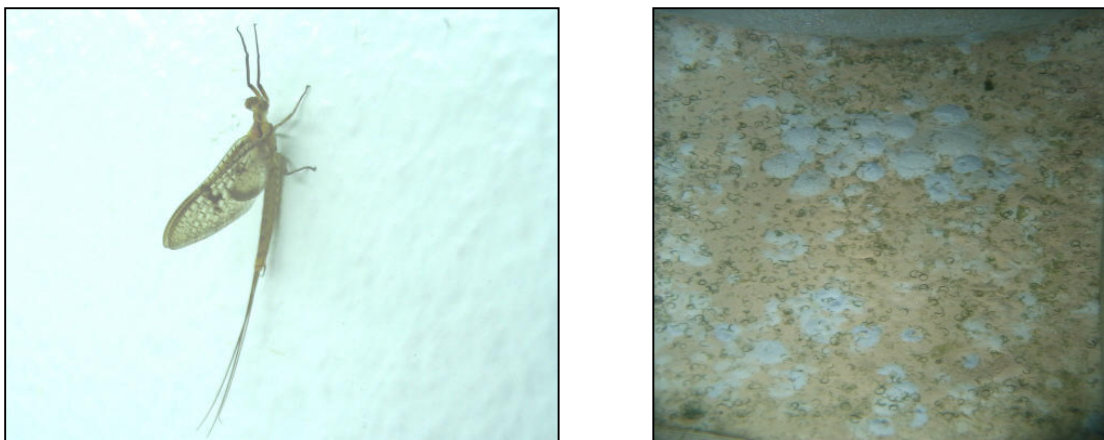


Figure 12. Grande Ephémère ayant émergé du sédiment d'Aiguebelette utilisé en microcosmes 100 et 180 L, et tumulus liés à l'activité des Oligochètes du même sédiment

Si celles-ci ont été observées de façon sporadique au cours des essais 100 L et 180 L, les densités d'Oligochètes atteintes en fin d'essai sur les percolats de MIOM ((5000 individus/m², Lottmann, 2003 ; Clément *et al.*, 2005a) et lors des essais sur sédiments contaminés (programme Novosol phases II et III) ont pu constituer une gêne significative pour les amphipodes et larves de chironomes introduits. En effet, les amphipodes se sont toujours mal développés ou ont très mal survécu, et les taux d'émergence de chironomes ont été en moyenne plus faibles qu'en microcosmes de 2 L, avec dans certains cas une dégradation au cours des essais (**tableau 11**).

Tableau 11. Résultats d'émergences lors des essais en microcosmes 100 L et 180 L

Référence essai	1ère inoculation	2ème inoculation	3ème inoculation
Triffault-Bouchet, 2004	60%	40%	/
Lottmann, 2003	71 ± 9	54 ± 16	/
Novosol phase II essai 100 L n°1	67 ± 4	55 ± 8	80 ± 22
Novosol phase II essai 100 L n°2	Entre 30 et 65%		
Novosol phase III essai 180 L	< 15%		

Le tamisage du sédiment avant emploi, tel que nous l'avons pratiqué (tamisage à 2 mm pour éliminer les débris grossiers, les cailloux et les coquilles de mollusques, Bonnet 2000), n'a pas permis d'éliminer la macrofaune autochtone. Un tamisage à 0.25 mm, comme recommandé par ASTM (1994), aurait peut-être été plus efficace, mais il est consommateur de temps et doit être fait sous eau, ce qui conduit inévitablement à modifier sensiblement le sédiment et perturber la microflore et la microfaune.

2.4.3.3.7. *Influence du sédiment sur la qualité de l'eau surnageante et de l'eau interstitielle*

Nous avons vu (*cf* 2.4.3.2) que le sédiment est un des facteurs qui modulent la qualité de l'eau surnageante. Il n'est pas possible, en l'absence d'expériences spécifiques, de cerner l'influence propre du sédiment. Nous avons vu néanmoins que, dans le cas du sédiment lacustre (Aiguebelette « craie »), la dureté de l'eau augmente par diffusion des ions calcium à partir du sédiment. Nous avons tenté de distinguer l'influence des deux principaux sédiments utilisés au cours des essais en microcosmes 2 L, le sédiment artificiel d'une part et le sédiment lacustre d'Aiguebelette appelé « craie » d'autre part (**tableau 12**). Alors que le pH au-dessus du sédiment lacustre est bien tamponné, le pH au-dessus du sédiment artificiel peut

prendre plus facilement des valeurs légèrement acides en raison de fermentations possibles dues à la matière organique incorporée dans la masse du sédiment (TétraMin), mais il s'est le plus souvent situé entre 7 et 8.5.

Tableau 12. Valeurs minimales et maximales de la qualité de l'eau surnageante au-dessus des sédiments artificiel et lacustre (Aiguebelette « craie »), enregistrées sur l'ensemble des essais en microcosmes 2 L (remarque : valeurs mini et maxi ne correspondent pas nécessairement à un même essai ; / : non mesuré)

		Milieu OCDE	artificiel		lacustre	
			min	max	min	max
pH		7.33	6.5	8.5	8.1	8.7
Conductivité	µS/cm	300	195	475	240	350
NH ₄ ⁺	mg/L	0.42	0.05	5.3	0.3	15.5
NO ₃ ⁻	mg/L	1.45	0	11	1	10
PO ₄ ³⁻	mg/L	0.15	0	3.63	0	0.4
COT	mg C/L	0	4	44	2.5	5.7
Cl ⁻	mg/L	17.1	15	30	3.7	20
SO ₄ ²⁻	mg/L	5.85	4	13.3	3	11
Na ⁺	mg/L	34.3	29	47	22	35
K ⁺	mg/L	0.06	0.5	3.8	0.3	3
Mg ²⁺	mg/L	4.4	4.9	11.3	1	4
Ca ²⁺	mg/L	4.9	11	69	13	30
Dureté	mg CaCO ₃ /L	31	60	191	43	90
Cu	µg/L	traces	/	/	3.3	7.4
Cr	µg/L	traces	/	/	0.1	0.3
Ni	µg/L	0	/	/	0.6	1.6
Pb	µg/L	traces	/	/	< LD	6.5
Zn	µg/L	traces	/	/	/	/

Tableau 13. Valeurs minimales et maximales enregistrées pour les teneurs en métaux lourds des eaux interstitielles des sédiments artificiel et lacustre utilisés au cours des essais en microcosmes 2 L (nombre d'essais avec sédiment artificiel : 2 ; avec sédiment lacustre : 6)

		artificiel		lacustre	
		min	max	min	max
Cd	µg/L	< LD	< LD	< LD	< LD
Cu	µg/L	< LD	1.7	2.5	17.0
Cr	µg/L	< LD	< LD	0.5	5.7
Ni	µg/L	4.6	5.6	0.1	5.6
Pb	µg/L	< LD	< LD	0.3	9.5
Zn	µg/L	60	100	600	900

Tableau 14. Composition des eaux interstitielles des sédiments artificiels ou naturels utilisés lors des essais en microcosmes de 2 L (sédiment artificiel : à base de sable, kaolin, alpha-cellulose, carbonate de calcium et TétraMin, cf tableau ; lacustre : sédiment d'Aiguebelette « craie » ; boues 1 à 4 : thèse Triffault-Bouchet ; HAP : thèse Verrhiest ; 6PPD : contrat industriel sur une substance ; CEBS1 : sédiments Canal de l'Est Branche Sud ; 12570 à 17000 Solvay : sédiments du Nord, thèse Cauzzi ; Essai P1 à P3 : essais sur lixiviats de MIOM, thèse Triffault-Bouchet ; Témoins : essai sur sédiment naturel Neyrieux ; valeurs sur l'ensemble d'un essai sauf précisé ; / : non mesuré)

	Essai	pH séd.	perte au feu %	teneur en eau %	COT mg C/L	NH ₄ ⁺ mg/L	NO ₃ ⁻ mg/L	PO ₄ ³⁻ mg/L	SO ₄ ²⁻ mg/L	Cl ⁻ mg/L	K ⁺ mg/L	Na ⁺ mg/L	Ca ²⁺ mg/L	Mg ²⁺ mg/L
artificiel	Boues 1	6 à 6.7	6.1 ± 1.0	28.7 ± 1.0	141 à 204	/	/	/	/	/	/	/	/	/
artificiel	Boues 2	5.8 - 6.6	/	/	102 à 141	/	1	/	4 à 8	27-30	3 à 4	36-37	14 à 27	9 à 11
artificiel	6PPD	8.6 à 7.9	3.7 à 4.3	28 à 31	250	/	/	/	/	/	/	/	/	/
artificiel	HAP	/	6.2 ± 0.4	18.5 ± 0.6	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/
artificiel	CEBS1	/	/	/	261 ± 55	/	/	/	/	/	/	/	/	/
artificiel	12570 Solvay	/	/	/	/	0.3 à 4.8	0 à 37	0 à 0.5	/	/	/	/	/	/
artificiel	13990 Solvay	/	/	/	/	1.9 à 23.7	/	0.3 à 3.4	/	/	/	/	/	/
artificiel	17000 Solvay	/	/	/	/	0.9 à 3.6	0 à 11	0 à 5.8	/	/	/	/	/	/
lacustre	Boues 3	7.4 à 7.7	/	/	40	2.2 à 3.3	/	/	/	/	/	/	/	/
lacustre	J10	/	/	/	17	1.6	/	/	/	/	/	/	/	/
lacustre	J20	Boues 3bis	/	/	20	3.0	/	/	/	/	/	/	/	/
lacustre	J30	/	/	/	22	1.3	/	/	/	/	/	/	/	/
lacustre	Boues 4	7.6 à 7.8	/	/	17 à 40	1.3 à 3.0	/	/	3.3 à 3.9	5.4 à 63	2 à 17	4 à 17	7 à 19	0.4 - 0.5
lacustre	J7	7.3 ± 0.08	2.8 ± 0.9	32.8 ± 0.04	151 ± 1.1	/	/	/	14.1	23.8	4.6	36.9	57.4	3.3
lacustre	J21	Essai P1	7.4 ± 0.02	2.0 ± 0.05	36.2 ± 0.10	44.7 ± 0.7	/	/	/	/	/	/	/	/
lacustre	J28	/	7.7 ± 0.03	2.0 ± 0.04	35.4 ± 0.63	38.0 ± 0.3	/	/	8.2	25.1	4.3	39.4	42.6	3.3
lacustre	P2	8.0 à 8.2	/	/	23.3	/	/	/	18 à 23	21 à 24	3.2 à 4.7	31 à 33	38.5 à 40.8	4.2 à 4.5
lacustre	P3	7.9 à 8.0	/	/	59.1	/	/	/	13 à 21	21.6 à 21.8	1.4 à 2.5	31 à 45	20 à 31	2.5 à 3.6
Neyrieux	Témoins	/	8	63	6.7 ± 3.2	/	/	/	/	/	0.8 ± 0.2	6.5 ± 2.1	15.5 ± 3.7	0.6 ± 0.2
Neyrieux	HAP	/	8	63	11.9 ± 1.0	/	/	/	/	/	/	/	/	/
Bédât	6PPD	7.2 à 6.8	1.2 à 1.4	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/	/

La conductivité de l'eau surnageante est également plus variable pour le sédiment artificiel. La présence de matière organique facilement dégradable dans le sédiment artificiel peut générer des valeurs de COT plus élevées dans la colonne d'eau. La dégradation de cette matière organique ou/et le simple relargage à partir de celle-ci pourraient également expliquer les maxima en général plus élevés au-dessus du sédiment artificiel pour la plupart des ions. Enfin, aucune analyse de métaux lourds n'ayant été réalisée dans l'eau au-dessus du sédiment artificiel, il n'est pas possible de comparer les deux sédiments, mais les quelques analyses réalisées dans l'eau au contact du sédiment lacustre montrent des teneurs faibles mais significatives par rapport aux valeurs traces du milieu OCDE.

Les différences entre eaux interstitielles du sédiment artificiel et du sédiment lacustre se font sentir pour certains paramètres (**tableau 14**). C'est le cas du COT, qui est en général plus élevé pour le sédiment artificiel du fait du TétraMin incorporé en début d'essai. Cette même matière organique peut générer des valeurs en ammoniacque parfois élevées (23.7 mg/L) mais dans la plupart des cas sans effets sur les organismes benthiques présents. Si les valeurs d'ammoniacque sont du même ordre de grandeur dans les eaux interstitielles du sédiment lacustre, il semble que le risque de teneurs excessives et toxiques est beaucoup plus faible qu'en sédiment artificiel du fait d'une teneur en matière organique endogène faible et d'un apport de TétraMin en surface et étalé dans le temps. Bien que nous ne disposions que de quelques mesures pour le sédiment artificiel, il ne semble pas qu'il y ait de différences entre les deux types de sédiments pour les autres ions. En revanche, comme on peut s'y attendre, les eaux interstitielles présentent des teneurs en métaux lourds généralement plus élevées pour le sédiment lacustre que pour le sédiment artificiel (**tableau 13**), avec des valeurs maximales pouvant s'avérer problématiques vis-à-vis des organismes benthiques introduits dans les microcosmes, si l'on se réfère aux seuils de toxicité reportés dans la littérature (cf tableaux 44 et 45 de Triffault-Bouchet 2004).

2.4.3.4. Biocénoses

2.4.3.4.1. Choix des espèces du microcosme

Conformément aux systèmes gnotobiotiques dont nous nous sommes inspirés (Merlin et Blake, 1991; Merlin *et al.*, 1992, 1993, 1994; Yosowidagdo, 1996 ; Conquest et Taub, 1989; Taub, 1989a, 1989b), nous avons choisi, dans tous les essais menés en microcosmes de 2 à 180 L, d'étudier les réponses de quelques espèces introduites simultanément et le plus souvent élevées/cultivées ou acclimatées au laboratoire (**tableau 15**). L'étude du compartiment

bactérien du sédiment, sur lequel nous reviendrons, a constitué une exception à ce principe. Le choix des espèces a répondu à plusieurs exigences.

Il s'agissait en premier lieu de couvrir les principaux niveaux trophiques : producteurs primaires (algues et lentilles d'eau, plantes enracinées en microcosmes de plus grande taille), consommateurs primaires (cladocères pélagiques et invertébrés épibenthiques (amphipodes) et benthiques (chironomes), ainsi que mollusques gastéropodes (physes et limnées) en microcosmes 100 et 180 L), décomposeurs (microfaune et bactéries de la colonne d'eau et surtout du sédiment, présentes naturellement (sédiment naturel) ou favorisées (sédiment artificiel)). La présence de ces trois niveaux trophiques, si elle n'est pas une condition suffisante pour l'établissement d'un véritable écosystème, est du moins nécessaire pour favoriser les relations interspécifiques et le fonctionnement des cycles de la matière donc assurer la mise en place d'un écosystème même simplifié. Enfin, il était ainsi possible de disposer d'un large spectre de sensibilité aux toxiques par la présence de végétaux, d'animaux et d'organismes procaryotes.

Il s'agissait en second lieu de travailler sur des organismes des milieux lentiques inféodés aux compartiments représentés dans le microcosme et donc susceptibles de rendre compte de différentes voies d'exposition : organismes de la colonne d'eau avec les cladocères, les algues planctoniques, les lentilles d'eau, principalement exposés aux substances dissoutes et particulaires de l'eau surnageante, organismes du sédiment avec les amphipodes et les chironomes, mais aussi le compartiment bactérien du sédiment. Dans les faits, plusieurs organismes ne sont pas strictement inféodés à un seul compartiment et peuvent donc être soumis à différentes voies d'exposition. Ainsi les cladocères évoluant dans la colonne d'eau sont-ils également au contact du sédiment (ASTM, 1993a) lorsqu'ils viennent fouiller la surface pour y remettre en suspension algues et détritiques organiques (Lampert, 1987). Ce comportement de filtreur de particules en suspension ou déposées permet à Burton (1992) de considérer *Daphnia magna* comme une espèce épibenthique. Les algues pélagiques sédimentent en partie et finissent par recouvrir la surface du sédiment. Réciproquement, l'amphipode épibenthique *Hyaella azteca* est également exposé à la colonne d'eau lorsqu'il se déplace à la surface du sédiment ou, plus occasionnellement, lorsqu'il nage en pleine eau. Les plantes enracinées sont au contact de la colonne d'eau par leurs feuilles et leurs tiges, et du sédiment par leur système racinaire. Les mollusques gastéropodes sont ubiquistes, broutant la surface du sédiment et des parois des microcosmes, et se déplaçant dans la colonne d'eau pour gagner la surface et respirer.

Enfin, les organismes utilisés dans les essais sont pour la plupart faciles à élever ou cultiver et sont classiquement choisis comme organismes-tests dans les bioessais de laboratoire, de sorte qu'un nombre élevé de données toxicologiques est généralement disponible pour chacun d'eux, ce qui facilite l'interprétation des effets observés et la discussion des résultats obtenus.

Tableau 15. Organismes introduits dans les microcosmes 2, 100 et 180 L (MOP : matière organique particulaire)

Espèce	Type d'organisme	Niveau trophique	Compartiment principal	Sources de nourriture	Microcosme
<i>Pseudokirchneriella subcapitata</i> <i>Chlorella vulgaris</i>	Micro-algue vertes	Producteur I	Colonne d'eau	Autotrophe	tous types
<i>Lemna minor</i> <i>Spirodela polyrhiza</i>	Macrophyte flottante	Producteur I	Interface atmosphère-colonne d'eau	Autotrophe	tous types 100 et 180 L
<i>Elodea canadensis</i> <i>Groenlandia densa</i>	Macrophyte enracinée	Producteur I	Colonne d'eau/sédiment	Autotrophe	100 et 180 L
<i>Daphnia magna</i> <i>Ceriodaphnia dubia</i> <i>Simocephalus vetulus</i>	Crustacé Cladocère	Consommateur I	Colonne d'eau	Algues pélagiques et benthiques MOP, bactéries	tous types 100 et 180 L 100 et 180 L
<i>Hyalella azteca</i>	Crustacé Amphipode	Consommateur I	Surface sédiment	Algues benthiques MOP, bactéries	tous types
<i>Chironomus riparius</i>	Insecte Chironome	Consommateur I	Sédiment	MOP, bactéries	tous types
<i>Limnaea stagnalis</i> <i>Physa acuta</i>	Mollusque Gastéropode	Consommateur I	Ubiquiste	Périphyton Plantes Lentilles d'eau	100 et 180 L

2.4.3.4.2. Performances et sensibilités des organismes dans les essais en microcosmes

L'évaluation des effets des toxiques introduits dans les microcosmes nécessite de disposer, dans les systèmes témoins non soumis aux toxiques, de conditions favorables au développement des organismes et d'indicateurs d'effets (*endpoint* en anglais) sensibles. Nous avons déjà évoqué (cf 2.4.3.2 et 2.4.3.3) l'importance des compartiments abiotiques (colonne d'eau et sédiment) pour un développement normal des organismes. Nous allons préciser, pour chacun des organismes, les résultats obtenus dans les différents types de microcosmes (2 et 100 L). Cet aspect a déjà été traité par Triffault-Bouchet (2004) pour les résultats obtenus dans son travail de thèse, nous apporterons donc des compléments sur la base de l'ensemble des essais réalisés entre 1997 et 2005. Nous nous attacherons à montrer et à discuter :

- les performances des organismes témoins (taux de survie, croissance, reproduction),
- la variabilité des critères retenus, pour les microcosmes témoins et les microcosmes contaminés,
- la sensibilité des paramètres d'effets retenus.

2.4.3.4.2.1. Organismes benthiques

2.4.3.4.2.1.1. Introduction

Nous avons privilégié l'utilisation de deux espèces benthiques communément employées en écotoxicologie : le chironome *Chironomus riparius* (Insecte, Chironomidae, **figures 13 et 14**) et l'amphipode *Hyalella azteca* (Arthropode, Crustacé, Hyalellidae). De par leur contact plus ou moins étroit avec les sédiments, ces organismes sont très souvent utilisés pour évaluer la toxicité des sédiments contaminés ainsi que la biodisponibilité dans le compartiment sédiment de contaminants issus de la colonne d'eau. On trouvera dans Bonnet (2000) un rapport détaillé de l'écologie de ces espèces et des conditions des essais où elles sont utilisées.

H. azteca est une espèce plus fréquente en milieu lentique qu'en milieu lotique, donc adaptée à nos conditions d'essais. Par ailleurs, c'est une espèce épibenthique qui refléterait assez peu selon Wang *et al.* (2004) la toxicité des sédiments *in situ*. Ces auteurs ont récemment reconsidéré l'idée dominante qui fait de *H. azteca* un amphipode passant une grande partie de son cycle de vie dans le sédiment et donc une espèce idéale pour les tests sur sédiments, et à ce titre très souvent associée à *Chironomus* sp.. Selon leur analyse, il n'existe pas d'observations prouvées d'un comportement d'enfouissement dominant, et il semblerait que ce soient les conditions des tests sur sédiments (notamment éclairage souvent continu, absence d'ombrage pour cet organisme négativement phototactique, absence de support végétal, couche sédimentaire oxygène plus épaisse du fait de l'aération continue de l'eau donc plus favorable à l'enfouissement) qui forcent ou incitent les amphipodes à s'enfouir. *H. azteca* est par ailleurs en conditions naturelles un brouteur épibenthique et surtout épiphytique, ce qui signifie qu'il trouve l'essentiel de sa nourriture dans les algues à la surface du sédiment et des macrophytes plutôt que dans le matériel détritique du sédiment. Des mesures de bioaccumulation par *H. azteca* exposé au cadmium lors d'expériences sur des lacs entiers ont clairement montré que cet amphipode était principalement contaminé *via* la colonne d'eau (Stephenson, 1986, Stephenson et Mackie, 1988, Stephenson et Turner, 1993, Malley *et al.*, 1989, cités par Wang *et al.*, 2004). D'autres références citées par les mêmes auteurs montrent que *H. azteca in situ* répond aux contaminants de l'eau surnageante plutôt qu'à ceux du sédiment et de l'eau interstitielle. Wang *et al.* (2004) passent en revue un certain

nombre d'essais sur sédiment menés au laboratoire pour mettre en évidence que les effets sur *H. azteca* peuvent dans un certain nombre de cas être corrélés aux teneurs des eaux surnageantes, celles-ci étant souvent élevées du fait du faible ratio eau : sédiment dans ce type d'essais. L'utilisation de *H. azteca* dans les essais en microcosmes que nous avons mis en œuvre (en 2, 100 et 180 L) apparaît, au vu de cette étude récente, parfaitement justifiée si l'on considère que ces essais corrigent certains des biais et artefacts des essais sur sédiments classiques et permettent d'exposer cette espèce épibenthique dans des conditions plus proches de leur environnement naturel. Le ratio eau : sédiment plus élevé permet d'aboutir à des teneurs de l'eau surnageante plus réalistes, la hauteur d'eau réduit la pénétration de la lumière, la présence de lentilles d'eau (tous microcosmes) et de plantes enracinées (microcosmes 100 et 180 L) diversifie les supports, la présence d'algues dans la colonne d'eau et à la surface du sédiment permet de diversifier les voies d'exposition.

2.4.3.4.2.1.2. *Chironomus riparius*

Nous utilisons en début d'essai des larves de premier stade (4 jours maximum après éclosion), plus sensibles que celles des stades suivants (Nebeker *et al.*, 1984). Dans les essais en microcosmes 2 L, la survie et la croissance pondérale des larves sont évaluées à différents moments : 7-14-21 jours, ou bien 10-21 jours. La récupération des larves nécessite de sacrifier certains microcosmes, au minimum 3 par traitement pour des raisons statistiques. Les premières émergences sont observées à partir de J14, on verra que dans certains essais le délai d'émergence a été retardé. Les émergents sont récupérés grâce à la fermeture du récipient par un film plastique transparent (microcosmes 2 L) ou par une moustiquaire (microcosmes 100 et 180 L). Mâles et femelles sont dénombrés. Les mâles émergent avant les femelles (Pascoe *et al.*, 1989 ; Péry *et al.*, 2002).

Pour l'analyse des résultats, nous avons considéré l'ensemble des données disponibles des essais réalisés en microcosmes 2 L (Verrhiest, 1991 ; Triffault-Bouchet, 2004 ; DEA et thèse Cauzzi, et autres recherches hors thèses), y compris celles pour lesquelles les résultats montrent des performances médiocres dans les témoins (3 essais sur 12 avec survie moyenne 10 jours des témoins < 60%, 1 essai sur 10 où la survie moyenne 14 jours des témoins est < 60%, 6 essais sur 20 où la survie moyenne 21 ou 28 jours des témoins est < 60%). Les conditions des essais (type de sédiment, mode d'alimentation, renouvellement éventuel de l'eau) et les résultats pour les organismes benthiques sont présentés en **annexe 3 (tableaux A3-1 à A3-4)**.

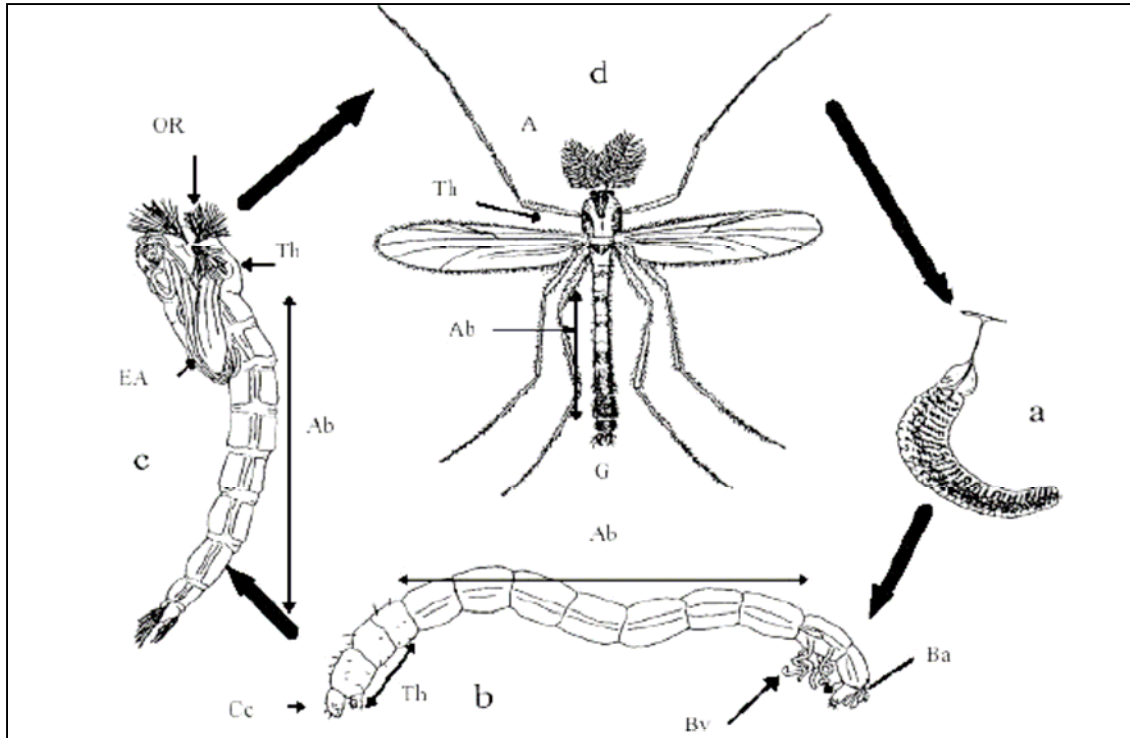


Figure 13. Schéma des différents stades de développement de *Chironomus riparius* (d'après Bonnet, 2000) : (a) masse d'oeufs, (b) larve (Cc - capsule céphalique, Th - segments thoraciques, Ab - segments abdominaux, Bv et Ba - branchies ventrales et annales), (c) nymphe (OR – organes respiratoires) et (d) adultes mâles (A - antennes).



Figure 14. Imagos femelle (photo de gauche) et mâle (photo de droite) de *Chironomus riparius* (d'après Heyvang, 2004)

Le **tableau 16**, construit à partir des données individuelles (résultat pour chaque microcosme) permet de constater que la survie (10, 14, 21 ou 28 jours) des chironomes témoins est dans la plupart des cas (au moins 84% des données) supérieure ou égale à 60%. La proportion ne diminue que de 8 à 13% lorsqu'on considère une survie de 70%. En revanche, du fait que nous

avons conservé les essais où un problème est advenu (larves trop fragiles ou sédiment ou nourriture non adaptée), la survie n'est supérieure à 80% que dans 56% des cas à 21 jours et jusqu'à 69% des cas à 10 jours. Il convient de préciser que les données à 10 et 14 jours sont issues essentiellement de comptages de larves après sacrifice, alors que les données à 21 et 28 jours, plus nombreuses, sont issues en majorité de dénombrements d'émergents. Pour les microcosmes contaminés, les valeurs sont logiquement plus faibles, la présence de toxiques, dans le sédiment ou/et dans la colonne d'eau, induisant des survies < 60% dans 40 à 55% des cas selon la durée d'exposition considérée.

On note par ailleurs, pour les essais pour lesquels on dispose de résultats à différentes expositions, une dégradation de la survie (de > 80% à < 80% entre J10 ou J14 et J28) dans 12 cas sur 55 pour les témoins. On peut donc conclure que les conditions dans la plupart des microcosmes témoins (78%) sont stables au cours des essais.

Nous avons considéré dans un second temps la survie au sein des microcosmes contaminés, afin d'évaluer la sensibilité de ce critère. La **figure 15**, présentée à titre d'exemple, permet de visualiser les résultats pour une durée de 10 jours représentés par des moyennes auxquelles sont associés les écarts-types. Sur 155 groupes de données (un groupe correspondant souvent à 3 microcosmes répliqués contaminés), on trouve un effet statistiquement significatif sur la survie (10, 14, 21 ou 28 jours) pour 44 groupes, soit 28% des moyennes considérées.

Tableau 16. Proportion de résultats de survie ≥ 60 , 70 et 80% pour les larves de chironomes en microcosmes 2 L témoins et contaminés (les survies à 21 et 28 jours sont basées sur les larves retrouvées et sur les émergences)

	à 10 jours	à 14 jours	à 21 jours	à 28 jours
microcosmes témoins				
Nombre de valeurs considérées	48	57	61	71
% valeurs $\geq 60\%$	92	84	85	86
% valeurs $\geq 70\%$	79	75	77	73
% valeurs $\geq 80\%$	69	63	56	58
microcosmes contaminés				
Nombre de valeurs considérées	100	101	169	131
% valeurs $\geq 60\%$	45	56	55	60
% valeurs $\geq 80\%$	25	27	26	40

La variabilité est dans certains cas élevée et ne permet pas de conclure. Si l'on exclut les essais pour lesquels les performances des témoins sont insuffisantes ($< 60\%$), l'impossibilité de conclure à un effet significatif n'est due que rarement à la variabilité des témoins (1 cas sur 25 pour la survie à 10 jours, 0 sur 20 à 14 jours, 3 sur 27 à 21 jours et 1 sur 28 à 28 jours).

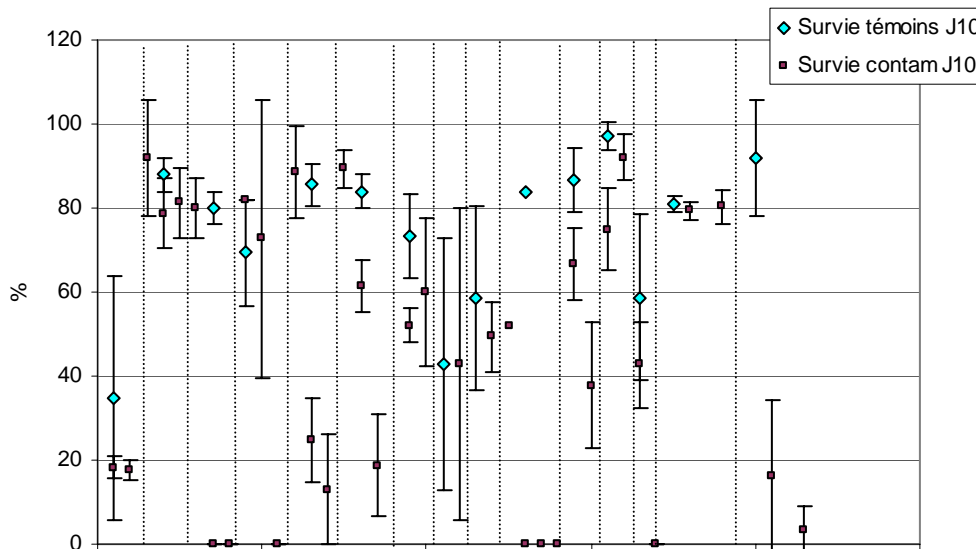


Figure 15. Survie à 10 jours des larves de chironomes des microcosmes témoins et contaminés (moyenne \pm écart-type ; les barres verticales en pointillé séparent les données de deux essais différents).

Il est difficile de faire un choix parmi les différentes durées sur lesquelles la survie est évaluée car nous disposons d'un nombre limité de données. Les résultats à 21 et 28 jours sont basés en grande partie sur les émergences, il s'agit donc d'un autre critère sur lequel nous reviendrons. Quant aux survies à 10 et 14 jours, il est difficile de les comparer car nous ne disposons pas des deux types de données pour les mêmes essais (le premier sacrifice a lieu à 10 ou à 14 jours), et nos résultats ne permettent pas de donner l'avantage à l'une ou à l'autre sur le plan de la variabilité ou du pouvoir de détection par exemple. Si l'on s'intéresse au stade larvaire on aura intérêt à déterminer la survie à 10 jours puisque les émergences de *Chironomus riparius* commencent généralement vers le 13^{ème} jour de vie des larves. Nous avons également obtenu une survie légèrement meilleure à 10 jours qu'à 14, 21 et 28 jours. Par ailleurs, les tests monospécifiques sur cette espèce durent 10 jours, ce qui permet de disposer des données de la littérature pour interpréter nos résultats.

Triffault-Bouchet (2004) propose de retenir, comme critère d'acceptabilité des résultats de survie moyenne 30 jours de *C. riparius* dans les essais en microcosmes 2 L, le seuil de 70%. A la lumière des résultats présentés ici, incluant ceux de Triffault-Bouchet, nous pouvons

confirmer ce seuil en l'appliquant à chaque microcosme, et l'étendre aux autres durées (10, 14 et 21 jours). En effet, nous avons montré ci-dessus que 73 à 79% des valeurs individuelles de survie des chironomes témoins sont supérieures à 70% selon la durée d'évaluation considérée. Par ailleurs, il s'avère que les valeurs moyennes de survie qui sont supérieures à 60% dans nos essais sont également, sauf exception, supérieures ou égales à 70%.

Triffault-Bouchet obtient, sur l'ensemble des données témoins de 4 essais en microcosmes 2 L, une survie moyenne à 30 jours de $84.6 \pm 6.5\%$, et un coefficient de variation correspondant de 7.7%. Nous obtenons de notre côté, sur 37 données issues de 18 essais après élimination des survies < 60% considérées comme anormales, une survie moyenne de $82.25 \pm 11.75\%$, soit un coefficient de variation plus élevé de 14.3%. Nous avons en outre considéré la variabilité inter-réplicats dans l'ensemble des essais et pour toutes les données, y compris les données de survie < 60%. Les résultats figurent au **tableau 17**. Les coefficients de variation (CV) moyens varient entre 19 et 26% pour les témoins, selon le jour considéré, soit des valeurs acceptables s'agissant d'une variable biologique. Les CV maximaux peuvent cependant être élevés. Pour les témoins, c'est à J10 que les résultats sont les meilleurs, avec 71% des CV inférieurs à 20%. Pour les microcosmes contaminés, la variabilité augmente en général, ce qui semble logique du fait de la distribution de sensibilité des individus aux toxiques présents.

Tableau 17. Statistiques relatives aux coefficients de variation (CV) des moyennes des survies de chironomes

	J10		J14		J21		J28	
	témoins	contaminés	témoins	contaminés	témoins	contaminés	témoins	contaminés
nombre de valeurs	14	27	14	28	21	37	23	34
min	2%	0%	3%	0%	0%	0%	0%	2%
max	23%	173%	40%	173%	110%	173%	71%	83%
moyenne	22%	33%	19%	35%	26%	25%	21%	21%
écart-type	26%	41%	12%	39%	30%	32%	19%	20%
médiane	11%	14%	14%	19%	17%	15%	14%	14%
% val < 20%	71%	63%	57%	50%	62%	57%	52%	68%

La croissance des larves de chironomes a été systématiquement mesurée au cours des essais en microcosmes 2 L, grâce aux sacrifices opérés à J7 ou J10, J14, J21 et J28. En principe les larves se transforment en nymphes pour émerger à partir d'un âge de 13 jours, mais les conditions observées en microcosmes témoins et contaminés ont pu retarder ou/et étaler les

émergences, d'où la possibilité de retrouver quelques larves à J21, voire à J28. Comme pour la survie, nous avons analysé l'ensemble des données de poids sec individuel disponibles.

Le **tableau 18** présente les résultats des microcosmes témoins. Les biomasses moyennes calculées sur l'ensemble des valeurs obtenues sont plus faibles que celles obtenues en essais monospécifique, comme souligné par Triffault-Bouchet (2004), les conditions de nourrissage étant moins favorables en microcosmes. La valeur moyenne à 10 jours de 0.69 mg que Triffault-Bouchet (2004) rapporte est supérieure aux moyennes présentées ici, mais toutes ces données, obtenues sur différents essais, sont assorties d'un écart-type élevé (± 0.24 mg pour Triffault-Bouchet et ± 0.33 ou 0.41 pour nous). De la même façon, les données présentées montrent une croissance moyenne pour le sédiment artificiel légèrement supérieure à ce qu'on obtient en sédiments naturels, mais là encore avec des écarts importants entre essais, donc rien de statistiquement significatif. Enfin, si les valeurs moyennes augmentent avec la durée considérée, les variances inter-essais importantes montrent que la croissance des larves est spécifique à chaque essai, comme l'illustrent les **figures 16 et 17**.

Tableau 18. Poids secs moyen des larves récupérées à 7, 10, 14, 21 ou 28 jours au cours des essais sur sédiments témoins naturels ou artificiel (CV : coefficient de variation)

Durée de croissance	J7 ou J10	J14	J21	J28
<i>sédiment artificiel</i>				
nombre de valeurs	14	16	4	0
poids sec moyen	0.535	0.691	0.811	/
écart-type	0.412	0.293	0.498	/
CV(%)	77%	42%	61%	/
<i>sédiments naturels</i>				
nombre de valeurs	21	18	32	13
poids sec moyen	0.478	0.578	0.738	0.520
écart-type	0.328	0.202	0.373	0.158
CV(%)	69%	35%	51%	30%

La variabilité (**tableau 19**) est plus faible que pour la survie, avec des CV inférieurs à 20% dans au moins 77% des cas, s'agissant des témoins. La variabilité augmente sensiblement lorsqu'on considère les données des microcosmes contaminés, ce qui atténue le bénéfice d'une variabilité réduite des témoins. Ainsi, si l'on considère, sur l'ensemble des essais considérés, les cas où le poids sec des larves de microcosmes contaminés a été significativement inférieur à celui des larves de témoins, cela n'est arrivé que 14 fois sur 73. Il convient cependant de préciser que dans 29 cas les moyennes des groupes témoins et

contaminés étaient proches, dans seulement 2 cas c'est la seule variabilité des groupes témoins qui est en cause, et dans tous les autres cas, la variabilité élevée aussi bien des groupes contaminés que des groupes témoins ne permet pas de mettre en évidence un effet.

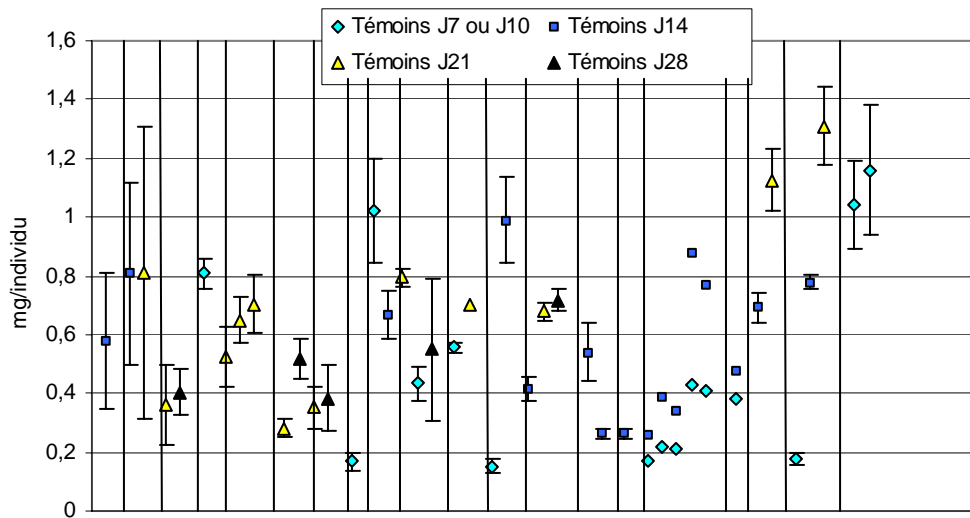


Figure 16. Poids secs moyens des larves de chironomes témoins au cours des essais en microcosmes 2 L (moyenne \pm barre d'écart-type, n = 3 en général)

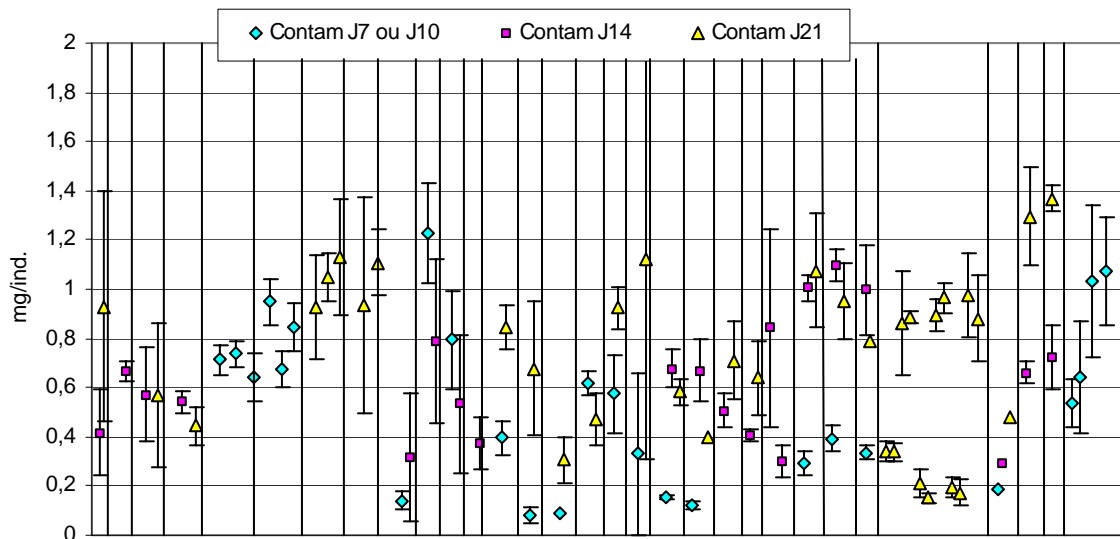


Figure 17. Poids secs moyens des larves de chironomes des microcosmes contaminés au cours des essais en microcosmes 2 L (moyenne \pm barre d'écart-type, n = 3 en général)

Tableau 19. Statistiques relatives aux coefficients de variation (CV) des moyennes des poids secs de larves de chironomes

	J7 ou J10		J14		J21		Toutes durées		Toutes durées
	Témoins	Contaminés	Témoins	Contaminés	Témoins	Contaminés	Témoins	Contaminés	Toutes données
Nombre de données	9	23	13	25	11	33	33	81	114
CV moyen	13.5%	21.0%	17.1%	24.8%	18.6%	21.8%	16.6%	22.5%	20.8%
Ecart-type CV	5.5%	19.3%	12.8%	19.8%	16.9%	15.4%	12.8%	17.8%	16.7%
Médiane	14.6%	16.4%	12.0%	18.4%	12.6%	19.3%	13.3%	17.4%	16.5%
Minimum	2.8%	5.3%	3.1%	5.1%	4.2%	3.0%	2.8%	3.0%	2.8%
Maximum	19.0%	99.0	40.0	83.1%	61.5%	72.3%	61.5%	99.0%	99.0%
% valeurs CV < 20%	100%	65%	77%	56%	82%	55%	85%	58%	66%

Les essais en microcosmes permettent le suivi des émergences des chironomes (**figure 18**), un critère d'effet subléthal intéressant pour évaluer la toxicité chronique des sédiments puisque traduisant le passage du dernier stade larvaire (nymphe) au stade imago et donc la réalisation de la plus grande partie du cycle de vie.

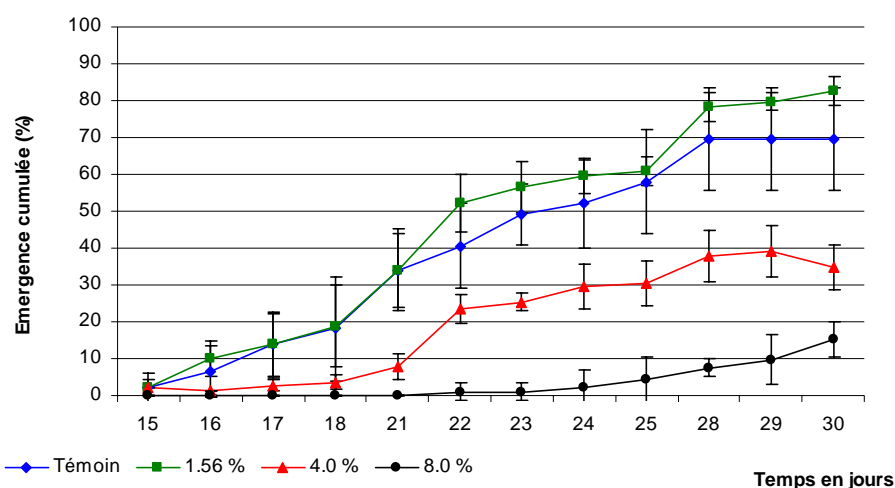


Figure 18. Emergences cumulées dans un essai en microcosmes 2 L mis en oeuvre sur un percolat de MIOM à 3 concentrations (moyenne \pm écart-type pour 3 à 6 réplicats selon le jour considéré) (Triffault-Bouchet, 2004)

En effet, les émergences chez *Chironomus riparius* débutent vers 19 jours à 20°C (à partir de l'éclosion des œufs) (Bonnet, 2000). Nous avons travaillé avec des larves de 2 à 4 jours en début d'essai, ce qui laissait la possibilité, sur un essai de 28 jours, d'observer les premières émergences à partir de 15 à 17 jours. Selon le projet de directive OCDE (1998) d'essai chironome long terme (20 à 28 jours), les émergences avec *C. riparius* doivent se dérouler entre le 12^{ème} et le 23^{ème} jour en partant de larves de premier stade. Péry *et al.* (2002)

obtiennent de leur côté dans divers sédiments naturels et un sédiment artificiel des délais d'émergence de 12.5 à 14.4 jours pour une dose de nourriture élevée (1.4 mg/larve/jour) et de 14.5 à 19.5 jours pour une dose de nourriture faible (0.2 mg/larve/jour). Au cours des essais en microcosmes 2 L, pour lesquels la dose de nourriture est plutôt faible (0.3 mg/larve/jour), nous avons observé des délais d'émergence compris en moyenne entre 11 et 21 jours selon le type de sédiment de référence utilisé (**figure 19a**). On notera que les chironomes émergent en règle générale plus vite dans le sédiment artificiel que dans les sédiments naturels, avec une répétabilité plus élevée et une variabilité intra-essai plus faible, ceci pouvant être dû à une dose de nourriture (incorporée) un peu plus élevée (0.46 mg/larve/jour). Le sédiment d'Aiguebelette, que nous avons retenu pour la plupart des essais en microcosmes (2, 100 et 180 L), a pu dans certains cas entraîner un retard des émergences (premières émergences à plus de 20 jours) pour des raisons non clairement identifiées, peut-être liées à l'état des larves utilisées. Dans ce cas, comme le montre la **figure 19a**, le taux d'émergence à 28 jours est anormalement faible. Hormis ces quelques cas, le taux d'émergence à 28 jours est le plus souvent supérieur à 60%. Une autre différence entre le sédiment artificiel et le sédiment d'Aiguebelette est observée au niveau du temps nécessaire pour obtenir 50% d'émergence (TE50%), autre critère utilisé pour évaluer la toxicité d'un sédiment dans la mesure où celle-ci pourra se traduire par un retard et/ou un étalement des émergences. Le TE50% est très proche du premier jour d'émergence dans le cas du sédiment artificiel, ce qui n'est pas toujours vrai avec le sédiment d'Aiguebelette (**figure 19b**). En dépit de ces différences et des performances moins régulières du sédiment d'Aiguebelette, nous pouvons confirmer la conclusion de Triffault-Bouchet (2004), sur un échantillon d'essais plus large que celui utilisé par celle-ci : les conditions des essais en microcosmes 2 L, réalisés avec le sédiment artificiel ou le sédiment d'Aiguebelette, sont propices à l'observation des émergences et conformes aux exigences de la directive OCDE (délai d'émergence entre 12 et 23 jours, et taux d'émergence 28 jours compris entre 50 et 70%). Pour autant, le critère d'émergence n'a pas offert, dans les essais réalisés, un pouvoir de discrimination très élevé puisque, sur les 31 moyennes de valeurs d'émergence à 28 jours en microcosmes contaminés, seules 2 moyennes ont été significativement plus faibles que les moyennes des microcosmes témoins, alors que les émergences en microcosmes contaminés étaient plus élevées dans 6 cas sur 31. La variabilité des données est en cause dans 6 cas. En considérant les émergences à 21 jours, des effets significatifs apparaissent dans 5 cas sur 17, avec un problème de variabilité dans 2 cas. La variabilité propre à différents paramètres relatifs à l'émergence est précisée au **tableau 20**. La variabilité relative aux taux d'émergence 21 et 28 jours est du même ordre que pour la survie

(**tableau 16**), avec une majorité de CV < 20%, et non différente entre témoins et contaminés. C'est pour le jour de 1ères émergences et le TE50% que la variabilité est la plus faible, avec des CV maximaux respectifs de 17 et 18%. Un effet significatif a été mis en évidence dans 8 cas sur 39 groupes contaminés avec le critère "jour de 1ères émergences" et dans 12 cas sur 34 avec le critère "TE50%".

Le **tableau 21** résume les appréciations portées sur les différents critères biologiques d'effets sur *Chironomus riparius*. La plupart des critères ont généralement montré de bonnes performances, avec une appréciation moins bonne pour le poids sec du fait de valeurs plus faibles que dans les essais monospécifiques et d'une variabilité inter-essais assez élevée. Certains critères (survie et poids sec à 10 jours, jour de 1ères émergences et TE50%) présentent une variabilité intra-essai moindre, ce qui en fait de bons candidats en termes de sensibilité. Il est difficile de porter une appréciation définitive sur la sensibilité des chironomes dans les essais en microcosmes car nous avons surtout testé des matrices multi-contaminées avec une toxicité potentielle modulée par divers composants (sulfures, matière organique, ...) et très peu de substances pures en dehors d'HAPs au demeurant peu toxiques au regard des doses étudiées (cf 2.5.1). Nos résultats montrent que des effets ont rarement été obtenus pour plus de 30% des groupes de microcosmes contaminés. Ce sont les critères de survie et d'émergence qui offrent la meilleure sensibilité, le poids sec n'ayant permis de mettre en évidence un effet que dans 19% des cas malgré une faible variabilité intra-essai. Pour Bonnet (2000), le poids sec à 10 jours offre une moins bonne sensibilité que la survie à 10 jours, mais en raison d'une plus grande variabilité, alors que selon Bonnet (2000) la plupart des auteurs s'accordent pour dire que les critères sublétaux comme le poids sec sont plus sensibles que la survie.

Tableau 20. Statistiques relatives aux coefficients de variation (CV) des moyennes de paramètres relatifs à l'émergence des chironomes

	Emergences J21		Emergences J28		Jour 1 ^{ères} émergences		Jour 50% émerg.	
	Témoins	Contaminés	Témoins	Contaminés	Témoins	Contaminés	Témoins	Contaminés
nb valeurs	9	30	13	31	19	34	17	31
min	0%	4%	0%	0%	0%	0%	0%	0%
max	78%	65%	135%	87%	17%	12%	10%	18%
moyenne	26%	23%	26%	18%	5%	4%	5%	7%
écart-type	24%	17%	36%	19%	5%	4%	3%	5%
médiane	14%	16%	20%	11%	4%	5%	6%	6%
% val < 20%	56%	60%	46%	71%	100%	100%	100%	100%

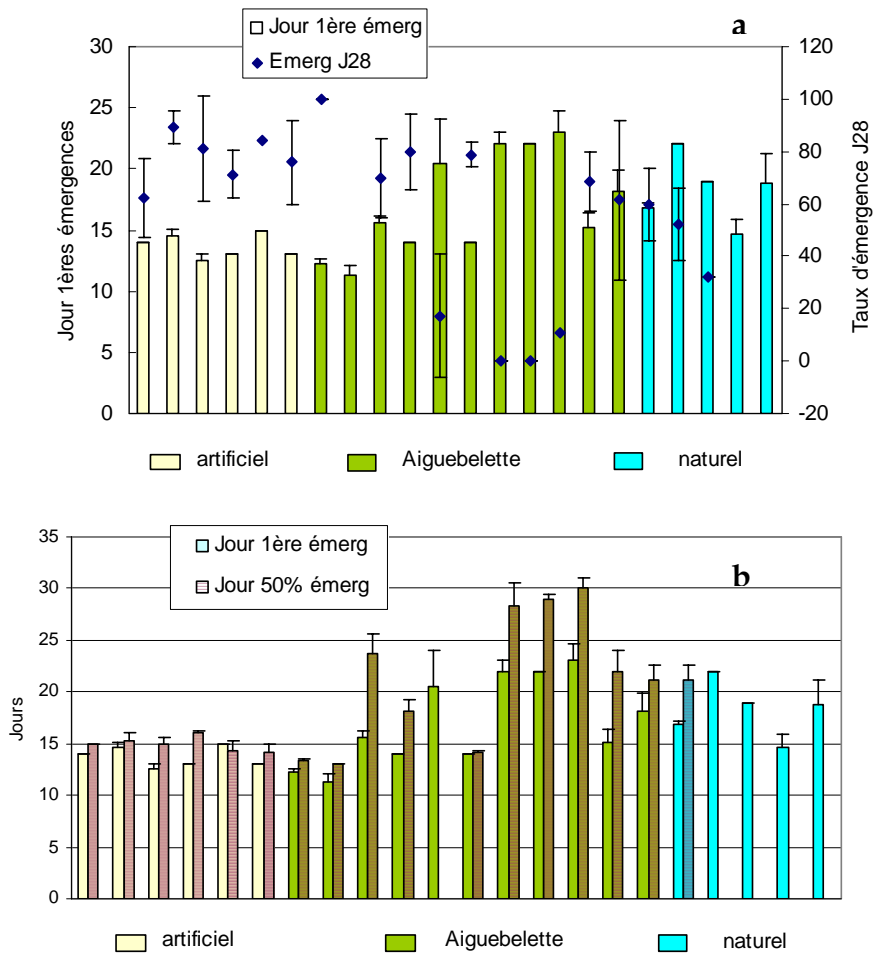


Figure 19. Résultats relatifs aux émergences de *Chironomus riparius* au cours des essais en microcosmes 2L

Dans les essais en microcosmes 100 et 180 L des larves ont été introduites dans les systèmes en vue de suivre les émergences. Compte tenu des délais d'émergence normalement rencontrés et de la durée de ces essais (de 90 à 172 jours), il a été possible de réaliser plusieurs introductions de larves et d'observer ainsi plusieurs périodes de développement et d'émergence permettant par exemple de comparer les conditions de vie pour les chironomes avant et après contamination (**figure 20**). Les résultats sont résumés en **annexe 4 (tableau A4-1)**. Tous ces essais ont été réalisés avec le sédiment d'Aiguebelette, en principe apte au développement de *Chironomus riparius*. Comme dans les essais en microcosmes 2 L nous avons complété les ressources alimentaires des systèmes par des apports de nourriture (TétraMin), en tenant compte des amphipodes également présents. Malgré ces apports, les taux d'émergence ont souvent été bien inférieurs à ce qu'on observe en 2 L : 35-40% en 100 L et maximum 12% en 180 L.

Tableau 21. Résumé de l'analyse des critères biologiques relatifs aux chironomes suivis au cours des essais en microcosmes 2 L (+/- : performance passable ou variabilité élevée ; + : performance satisfaisante ou variabilité acceptable ; ++ : performance bonne ou variabilité faible; +++ : performance excellente ou variabilité très faible)

	Performance	Variabilité intra-essai	Sensibilité
Survie			Effet dans :
10 jours	++	++	40% des cas
14 jours	+	+	30% des cas
21 jours	+	+	25% des cas
28 jours	+	+	23% des cas
Poids sec			Effet dans :
J7 ou J10	+/-	+++	24% des cas
J14	+/-	++	11% des cas
J21	+/-	++	21% des cas
Emergences			
J21	++	+	effet dans 29% des cas
J28	++	+	effet dans 6% des cas
jour 1 ^{ères} émergences	++	+++	effet dans 21% des cas
jour 50% émergences	++	+++	effet dans 35% des cas

Nous avons observé de façon quasi-systématique le développement d'Oligochètes dans le sédiment et l'émergence d'éphémères, favorisés par la durée des essais ; comme expliqué au 2.4.3.3.6 (*influence de l'endofaune*), tous ces organismes apportés avec le sédiment et non éliminés au cours des manipulations (tamisage, conservation à 4°C ou sous eau à température ambiante) ont pu constituer pour les larves de chironomes une concurrence pour la nourriture voire une pression de prédation s'agissant des larves d'éphémères. Dans d'autres cas, les résultats ont été brouillés par des masses déposées par les émergents et non retirées car souvent difficiles à repérer, ce qui a donné lieu à des émergences supplémentaires dans certains systèmes ou à un nombre de larves élevé en fin d'essai (cas de l'essai en gravières 180 L).

Dans la mesure où le suivi des chironomes n'est possible que par observation des émergences puisque des sacrifices intermédiaires sont difficilement envisageables en microcosmes de grande taille, nous avons choisi d'introduire également des larves encagées, de façon à évaluer leur survie et leur croissance au sein des systèmes sur des périodes plus courtes (14 jours), devant permettre ainsi de contrôler les expositions des chironomes et d'évaluer leur réponse en fonction des étapes de l'essai (pré-contamination, contamination et post-contamination) (Clément *et al.*, 2005a). Différents systèmes ont été testés (**figures 21 à 23**), avec l'objectif de favoriser les échanges avec le milieu environnant en ménageant des ouvertures au moyen de mailles en nylon, mais les résultats sont aléatoires. Dans bien des cas la survie et la croissance

ne sont pas satisfaisantes, pour diverses raisons : confinement conduisant à une dégradation des conditions à l'intérieur des cages (teneur plus faible en oxygène, accumulation de métabolites nocifs), fuites possibles des larves à l'état jeune, pertes lors des manipulations fréquentes (tous les deux jours pour apport de nourriture). Même lorsque les résultats peuvent être considérés comme normaux, les larves sont exposées, du fait du confinement inévitable, dans des conditions qui peuvent être peu représentatives de celles du microcosme. Dans l'essai en gravières pilotes de 180 L, le renouvellement de l'eau en continu n'a visiblement pas été suffisant pour éviter le confinement, ce phénomène étant probablement aggravé par un taux d'oxygénation assez bas (seulement 50% en moyenne) dans l'ensemble du plan d'eau. La technique de l'encagement doit être appliquée dans des conditions qui permettent de s'affranchir de ces biais, par exemple en mares extérieures ou en rivière où le renouvellement de l'eau dans les pièges est suffisant.

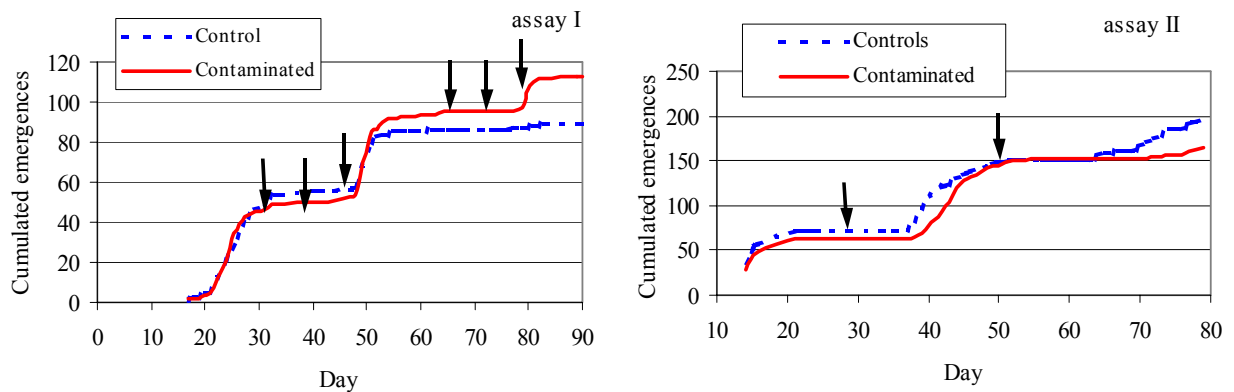


Figure 20. Emergences cumulées de *C. riparius* lors des deux essais en microcosmes 100 L sur percolats de MIOM (Clément *et al.*, 2005a) (flèches : contaminations)

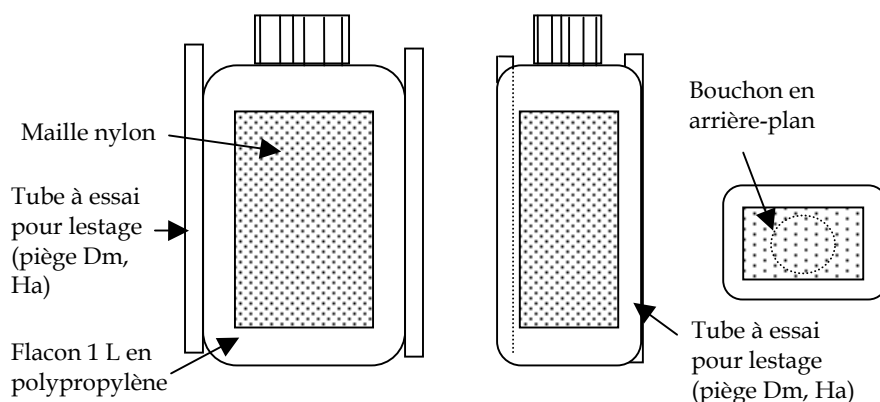


Figure 21. Piège à daphnies et amphipodes exposés à la colonne d'eau - Vue de dessus, vue de profil et vue du fond d'un piège à daphnies (position debout) (Vaille, 2005)



Figure 22. Photo d'un piège à daphnies



Figure 23. Piège pour amphipodes/chironomes

2.4.3.4.2.1.3. *Hyaella azteca*

Dans les essais en microcosmes sont évalués la survie et la croissance pondérale des individus sur 28 jours en microcosmes 2 L. Dans les essais en microcosmes 100 L, *H. azteca* (**figure 24**) est exposée en piège avec un suivi sur 14 jours (survie et croissance). L'introduction d'individus libres dans ces systèmes doit permettre d'évaluer, par un comptage final, le développement de la population sur 3 mois. Dans la plupart des cas, des individus âgés de 7 à 14 jours en début d'essai sont utilisés. Ils peuvent être complétés par des individus âgés de 1 à 7 jours ou de 14 à 21 jours en cas de nombre insuffisant dans les élevages de la première catégorie. Bonnet (2000) a montré que le taux de survie est satisfaisant pour les classes d'âge 2-9 jours et 7-14 jours, alors que la sensibilité aux toxiques varie peu jusqu'à 24 à 26 jours d'âge (Collyard, 1994). La maturité sexuelle acquise à partir de 5 semaines (Bonnet, 2000) ne permet pas, même en partant d'individus âgés de 7 à 14 jours en début d'essai, d'obtenir une reproduction significative au bout des 28 jours d'essai en microcosmes 2 L. Des jeunes ont rarement été observés en fin d'essai, leur petite taille constitue d'ailleurs un obstacle à leur dénombrement dans le sédiment.

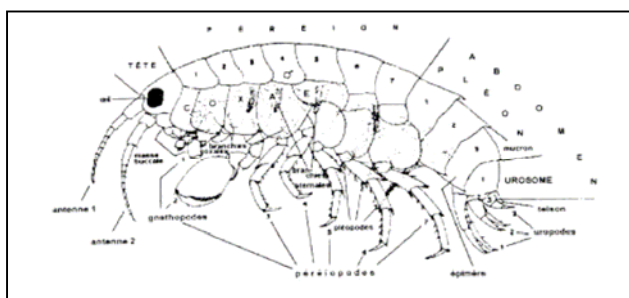


Figure 24. L'amphipode *Hyaella azteca* (à gauche, schéma tiré de Bonnet 2000; à droite photo B. Clément)

Une des raisons de l'intérêt porté à *H. azteca* est sa tolérance à la composition physico-chimique de l'eau (température, oxygène dissous, pH, salinité, ammoniacale, Bonnet (2000)). En microcosmes, où les conditions sont difficilement prévisibles et peuvent évoluer au cours d'un essai, notamment en présence de sédiment naturel, cette tolérance est un avantage.

Comme pour les chironomes, nous avons considéré l'ensemble des données disponibles des essais réalisés en microcosmes 2 L (Verrhiest, 2001 ; Triffault-Bouchet, 2004 ; DEA et thèse Cauzzi, et autres recherches hors thèses), y compris celles pour lesquelles les résultats montrent des performances médiocres dans les témoins (2 essais sur 32 avec survie moyenne < 50%). Les résultats détaillés pour les amphipodes sont présentés en **annexe 3 (tableaux A3-1 à A3-4)**. Cela concerne 271 microcosmes témoins et 533 microcosmes contaminés.

Les performances en termes de survie en microcosmes témoins (**tableau 22**) sont très satisfaisantes puisque la survie de 7 à 28 jours est toujours supérieure à 70% pour au moins 82% des valeurs individuelles, et $\geq 80\%$ pour au moins 69% des valeurs considérées. Les meilleures performances sont obtenues à 7 ou 10 jours si l'on considère le seuil de survie de 80%, mais il n'y a pas de différences entre durées d'exposition avec le seuil de survie de 70%. Il n'y a pas de différences entre microcosmes contenant du sédiment artificiel et microcosmes contenant du sédiment d'Aiguebelette. En microcosmes contaminés, la survie est évidemment significativement plus faible, mais tout de même $\geq 60\%$ pour la moitié des valeurs considérées. Si l'on considère l'ensemble des durées d'exposition on trouve qu'un effet significatif est obtenu pour 67 groupes de microcosmes contaminés sur 170, soit dans 39.4% des cas (de 37 à 50% des cas selon la durée). A noter que la variabilité est rarement en cause dans l'absence d'effet observée.

Nous proposons, sur la base de ces résultats, de retenir 70% de survie individuelle (pour chaque microcosme) comme critère d'acceptabilité pour la survie 28 jours. Cette valeur est inférieure au seuil habituellement adopté de 80% pour les essais monospécifiques sur 14 jours (Bonnet, 2000) et proposé par Triffault-Bouchet (2004) pour les essais en microcosmes 2 L, mais d'une part le critère d'acceptabilité proposé par celle-ci porte sur la moyenne des témoins d'un essai alors que nous proposons de l'appliquer à chaque microcosme, ce qui peut en définitive s'avérer plus exigeant, d'autre part, retenir 80% comme seuil d'acceptabilité individuel pour des essais en microcosmes pourrait amener à rejeter des microcosmes témoins pour lesquels d'autres paramètres biologiques seraient satisfaisants, alors que les conditions ne peuvent pas être aussi optimales que dans les essais monospécifiques. Enfin, nous disposons d'un plus grand nombre de données, incluant celles de Triffault-Bouchet.

Triffault-Bouchet (2004) obtient, à partir des données obtenues dans sa thèse (4 essais), une survie moyenne à 30 jours de $94.3 \pm 5.5\%$, soit un coefficient de variation de 5.8%. Nous obtenons de notre côté, sur 88 valeurs de survie 28 jours, après élimination des survies $< 60\%$, une survie moyenne de $84.6 \pm 16.5\%$, soit un coefficient de variation plus élevé de 19.5%. Les résultats relatifs à la variabilité inter-réplicats dans l'ensemble des essais en microcosmes 2 L sont présentés au **tableau 23**. Pour les témoins, la variabilité est en général acceptable, avec des CV moyens de 9 à 20%, et des CV $< 20\%$ pour la majorité des moyennes considérées. C'est pour la durée d'exposition de 14 jours que la variabilité est la plus faible. Pour les microcosmes contaminés la variabilité est plus élevée, ce qui, comme pour les chironomes, semble inhérent aux effets dus à la contamination.

Tableau 22. Proportion de résultats de survie ≥ 60 , 70 et 80% pour les amphipodes en microcosmes 2 L témoins et contaminés

	à 7 ou 10 jours	à 14 jours	à 21 jours	à 28 jours
microcosmes témoins				
Nombre de valeurs considérées	49	55	71	96
% valeurs $\geq 60\%$	94	95	86	92
% valeurs $\geq 70\%$	84	87	82	85
% valeurs $\geq 80\%$	80	69	72	69
microcosmes contaminés				
Nombre de valeurs considérées	92	105	174	162
% valeurs $\geq 60\%$	51	48	49	45
% valeurs $\geq 80\%$	24	34	39	30

Tableau 23. Statistiques relatives aux coefficients de variation (CV) des moyennes des survies de amphipodes

	J7 ou J10		J14		J21		J28	
	témoins	contaminés	témoins	contaminés	témoins	contaminés	témoins	contaminés
nombre de valeurs	15	24	14	26	21	44	28	40
min	0%	0%	0%	5%	0%	0%	0%	0%
max	31%	173%	23%	100%	78%	173%	49%	69%
moyenne	13%	41%	9%	27%	20%	39%	13%	23%
écart-type	10%	55%	7%	24%	19%	44%	11%	18%
médiane	12%	21%	8%	22%	13%	30%	11%	16%
% val $< 20\%$	67%	46%	93%	46%	76%	45%	75%	40%

La croissance des amphipodes a été suivie au moyen de mesures de poids frais et poids sec. Ce dernier paramètre étant *a priori* affecté d'une plus grande précision que le poids frais, nous n'avons retenu dans ce rapport que les données de poids sec. Bonnet (2000) préfère pour sa

part le paramètre « taille », du fait de son incapacité à mesurer le poids sec avec précision et du constat selon lequel la taille serait un paramètre plus sensible que la biomasse (Steevens et Benson, 1998). Nous n'avons pas cherché à vérifier ceci, étant pour notre part mieux équipé pour la pesée que pour la mesure de longueur, et considérant que la première est plus rapide que la seconde puisqu'elle se fait sur un groupe d'individus.

Comme pour les larves de chironomes, le poids sec des amphipodes, pour une durée d'exposition donnée, est très dépendant de l'essai. Ainsi le poids sec moyen a-t-il varié au cours des essais de 0.05 à 0.7 mg/individu pour une durée de 7 jours, de 0.1 à 0.63 mg/ind. pour 14 jours, de 0.15 à 0.85 mg/ind. pour 21 jours, et de 0.3 à 1 mg/ind. pour 28 jours. Ces variations ne sont pas imputables au type de sédiments utilisés (artificiel ou naturel), comme le montre le **tableau 24**.

Tableau 24. Poids secs moyen des amphipodes récupérés à 7 ou 10, 14, 21 et 28 jours au cours des essais sur sédiments témoins naturels ou artificiel (CV : coefficient de variation)

Durée de croissance	J7 ou J10	J14	J21	J28
<i>sédiment artificiel</i>				
nombre de valeurs	21	21	24	33
poids sec moyen	0.105	0.225	0.340	0.686
écart-type	0.060	0.112	0.165	0.184
CV(%)	58%	50%	49%	27%
<i>sédiments naturels</i>				
nombre de valeurs	43	37	50	71
poids sec moyen	0.169	0.352	0.440	0.738
écart-type	0.166	0.217	0.195	0.213
CV(%)	99%	62%	44%	29%

Si la variabilité inter-essais est grande, la croissance des amphipodes introduits dans les microcosmes est effective, comme le montre la **figure 25**. Le poids sec est multiplié en 3 semaines (de J7 à J28) par un facteur variant de 2 à 15, ce qui montre à nouveau la difficulté à maîtriser le devenir de cet organisme en microcosmes. Il est vrai que le poids sec à J7 varie, pour les données utilisées ici, de 0.04 à 0.54 mg/individu, et que les conditions ont pu varier d'un essai à l'autre, à commencer par l'âge des amphipodes (7-14 jours le plus souvent, 14-21 jours dans certains cas). On notera que le type de sédiment ne permet pas d'expliquer les différences de taux de croissance, et que le sédiment d'Aiguebelette semble offrir une certaine stabilité vis-à-vis de ce paramètre.

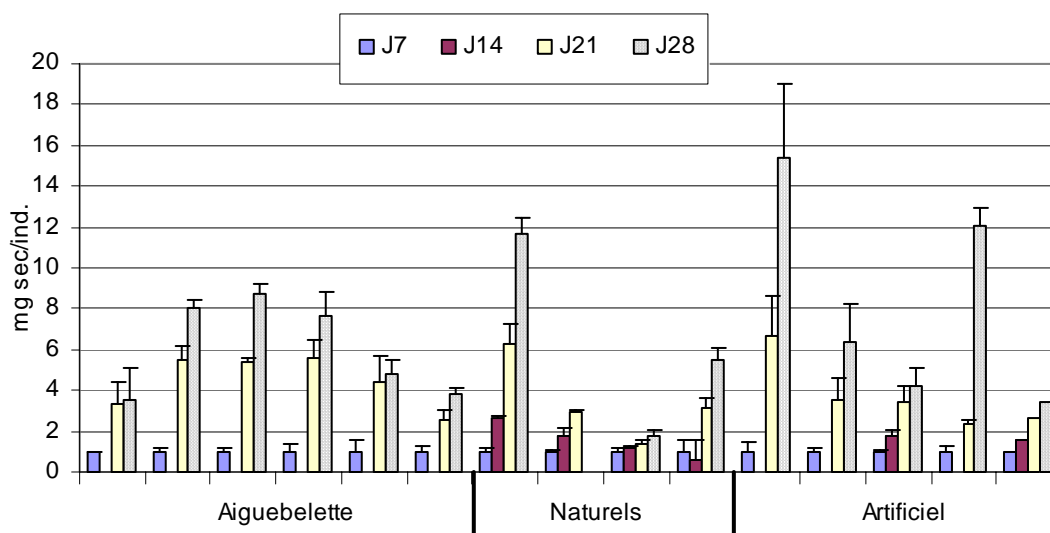


Figure 25. Croissance de *Hyalella azteca* dans les essais en microcosmes témoins 2 L pour lesquels on dispose des données à J7, J14, J21 et J28 (la valeur du poids sec moyen individuel à J7 a été ramenée à 1 pour faciliter la comparaison des séries ; celles-ci ont été regroupées par type de sédiment : sédiment lacustre d'Aiguebelette, sédiments naturels autres, et sédiment artificiel).

La variabilité intra-réplicats (**tableau 25**) est acceptable, avec des coefficients de variation < 20% pour une majorité de moyennes de poids sec (de 50 à 76% pour les témoins). La variabilité pour les amphipodes des microcosmes contaminés est du même ordre (CV < 20% pour 52 à 60% des moyennes considérées).

La proportion d'échantillons pour lesquels le poids sec en microcosmes contaminés était significativement inférieur au poids sec des témoins est assez faible puisque cela concerne seulement 19 moyennes sur 125, soit 15%. Jusqu'à 21 jours cette proportion varie entre 15 et 20%, puis elle chute sensiblement à 28 jours (6%), ce qui pourrait être dû au fait que les individus qui survivent finissent par rejoindre les témoins en termes de croissance. A noter que la variabilité (témoins ou contaminés) n'est en cause, dans l'absence d'effets observés, que dans 12.5% des cas.

Le **tableau 26** résume les appréciations portées sur les différents critères biologiques d'effets sur *Hyalella azteca*. La plupart des critères ont généralement montré de bonnes performances, en particulier la survie à 7 ou 10 jours. La variabilité est toujours acceptable, qu'il s'agisse de la survie ou du poids sec, mais elle n'est pas toujours minimale simultanément pour ces deux critères, de sorte que c'est à 21 jours qu'on obtient la meilleure combinaison en termes de variabilité minimale, de performance et de sensibilité.

Pour évaluer en première approche les sensibilités respectives de *C. riparius* et *H. azteca* on peut, en prenant en compte tous les paramètres mesurés pour les deux organismes (survies et poids secs à J7, J14, J21, J28 pour les deux espèces, et émergences à J21 et J28 pour *C. riparius*), mesurer la fréquence de réponses positives pour chaque essai. Par exemple, si *C. riparius* a montré un effet significatif pour 2 critères sur 8, cela correspond à une fréquence de réponse de 0.25, à comparer avec celle de *H. azteca* pour les critères considérés (par exemple 0.50 dans le cas où 4 critères sur 8 ont été significativement affectés). On constate ainsi que *H. azteca* a plus souvent répondu que *C. riparius* dans 28% des cas, alors que *C. riparius* a plus souvent répondu dans 23% des cas, et que les deux organismes ont montré la même sensibilité (réponse positive ou absence de réponse) dans 51% des cas. Noter que les résultats sont identiques si l'on exclut les critères d'émergence. Il convient de préciser que dans 19% des cas *H. azteca* fournit une réponse positive alors que *C. riparius* ne montre aucun des effets pris en compte, et que l'inverse est observé dans 12% des cas (avec ou sans le critère d'émergence). Cette rapide analyse comparative ne permet pas de conclure en l'état sur la sensibilité relative de chaque espèce, puisqu'elle ne prend pas en compte l'intensité des réponses, mais il est possible de conclure que les deux espèces fournissent des informations complémentaires sur la moitié des échantillons.

Tableau 25. Statistiques relatives aux coefficients de variation (CV) des moyennes des poids secs d'amphipodes

	J7 ou J10		J14		J21		J28	
	Témoins	Contaminés	Témoins	Contaminés	Témoins	Contaminés	Témoins	Contaminés
Nombre de données	22	25	12	21	21	41	25	35
CV moyen	23%	22%	22%	19%	19%	22%	16%	22%
Ecart-type CV	17%	17%	17%	12%	11,3%	19%	13%	17%
Médiane	16%	18%	18%	17%	16%	14%	12%	17%
Minimum	4%	2%	6%	2%	4%	1%	3%	5%
Maximum	72%	58%	61%	52%	48%	80%	58%	83%
% valeurs CV < 20%	55%	52%	50%	57%	62%	56%	76%	60%

En microcosmes 100 et 180 L, l'introduction d'amphipodes libres n'a jamais permis un développement significatif de la population (**tableau A4-2 en annexe 4**), au mieux les effectifs ont été multipliés par trois et, dans bien des cas, ont été diminués. Nous attribuons à cette survie médiocre les mêmes causes que pour les larves de chironomes : compétition pour la nourriture avec les organismes indigènes (oligochètes et éphémères), voire prédation (éphémères).

Tableau 26. Résumé de l'analyse des critères biologiques relatifs aux amphipodes suivis au cours des essais en microcosmes 2 L ((a) : aucune donnée de référence sur le poids sec de *H. azteca*)

	Performance	Variabilité intra-essai	Sensibilité
Survie			Effet dans :
7 ou 10 jours	+++	+	50% des cas
14 jours	+	+++	35% des cas
21 jours	++	++	37% des cas
28 jours	+	++	45% des cas
Poids sec			Effet dans :
J7 ou J10	(a)	+	15% des cas
J14	(a)	+	19% des cas
J21	(a)	++	20% des cas
J28	(a)	++	6% des cas

Comme pour les chironomes, l'exposition d'amphipodes en cages, avec les mêmes objectifs, présente beaucoup d'inconvénients qui expliquent les résultats aléatoires obtenus.

2.4.3.4.2.2. Algues et cladocères

En l'absence de toxiques, les micro-algues introduites dans les microcosmes se multiplient sous l'influence d'une part des nutriments et oligo-éléments apportés par l'eau et par le sédiment, d'autre part des cladocères qui les consomment (*Daphnia magna* dans tous les essais, mais aussi *Simocephalus vetulus* dans certains essais, et *Ceriodaphnia dubia* dans les essais en 100 et 200 L). Algues et cladocères (**figure 26**) forment donc un véritable couple et il n'est pas possible de considérer le développement d'une population sans prendre en compte l'autre, ce qui peut gêner dans certains cas l'interprétation des résultats mais apporte aux essais un degré supplémentaire de réalisme écologique par la possibilité de mettre en évidence des effets indirects (moindre reproduction voire extinction des daphnies du fait de l'inhibition de la croissance algale, transfert du toxique vers les daphnies *via* ingestion d'algues contaminées, etc.).

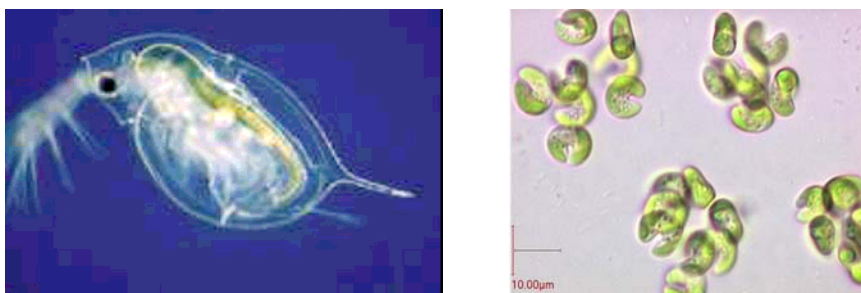


Figure 26. Le cladocère *Daphnia magna* et l'algue verte *Pseudokirchneriella subcapitata*

Les daphnies, par leur activité de broutage (filtration des algues en suspension au moyen de leurs appendices thoraciques et ingestion) et leur taux de reproduction élevé, jouent un rôle central dans les écosystèmes. En effet, elles sont capables de répondre à des niveaux variés de production algale et par là-même de réguler de façon significative la densité algale (Lampert *et al.*, 1986; Sterner, 1986; Lampert, 1987; Böing *et al.*, 1998), comme l'illustre la phase d'eaux claires classiquement observée dans les lacs au printemps (**figure 27**).

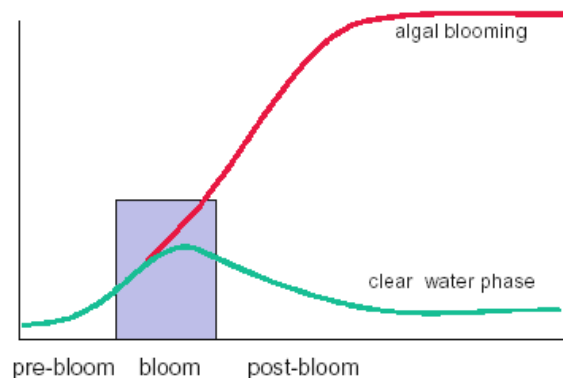


Figure 27. Période critique pour le contrôle du développement algal par le broutage des cladocères. Un broutage efficace se traduit par une phase d'eaux claires, alors qu'un broutage inefficace peut résulter en une croissance exponentielle des algues allant jusqu'à une phase d'eaux turbides, avec un risque pour l'écosystème de passer à un stade eutrophe persistant (d'après Foekema *et al.*, 1996).

En présence de doses sublétales de toxiques, l'activité de broutage peut être inhibée, comme l'ont montré de nombreux travaux (Cooley, 1977; Geiger et Buikema, 1981; Flickinger *et al.*, 1982; Day et Kaushik, 1987; Wong, 1989; Fernandez-Casalderrey *et al.*, 1993; Bitton *et al.*, 1995; Juchelka et Snell, 1995; Villaroel *et al.*, 1998, 1999), ce qui peut affecter cette régulation et conduire à un développement algal plus important. Ces considérations amènent à examiner sous un autre angle les problèmes d'eutrophisation que connaissent nombre de plans d'eau qui reçoivent certes des phosphates en excès mais sont également contaminés, même à faibles doses, par des substances toxiques. Les travaux auxquels j'ai participé de 1996 à 1998 au sein du laboratoire T.E.P.E. de l'Université de Savoie en association avec d'autres laboratoires étrangers (TNO, Pays-Bas et Université d'Alicante, Espagne) visaient à illustrer une nouvelle approche d'analyse des problèmes d'eutrophisation (Scholten *et al.*, 1994; Foekema *et al.*, 1996). La contribution du labo TEPE, portant sur la réalisation d'essais algues-daphnies en béciers de 2 L et en l'absence de sédiment, a permis de définir des conditions (éclairage, teneur en nutriments, densités d'algues et de daphnies) permettant de

détecter, en conditions dynamiques (croissance algale plus ou moins contrôlée sur une semaine), l'effet d'un toxique sur le broutage. Nous avons appliqué ce protocole au TEPE à l'étude du fluoranthène et du diméthoate (un inhibiteur de l'activité acétylcholine estérase), puis au L.S.E. à deux autres substances toxiques : le cuivre et le lindane (insecticide organochloré) (Zaid, 2001 ; Clément et Zaid, 2004). La toxicité de ces deux substances a été étudiée sur chacun des organismes au moyen de tests monospécifiques (croissance des algues sur 72 h, survie et activité de broutage des daphnies sur 48 h), puis en conditions dynamiques au cours d'essais en microcosmes « algues-daphnies » de 6 jours. Des effets sur l'activité de broutage sont obtenus à des concentrations proches de la NOEC-survie des daphnies (concentration sans effets observables) (**figure 28**), ce qui confirme l'intérêt de ce critère de toxicité sublétales pour d'une part la détection d'effets précoces et d'autre part la compréhension du mode d'action des toxiques et des conséquences pour l'écosystème.

Nous inspirant des observations réalisées dans ces microcosmes simplifiés nous avons pu fixer les conditions initiales pour les microcosmes de 2 L (10 jeunes daphnies et 10000 cellules algales/mL) après étude d'une gamme de densités (4200 à 12000 cells/mL pour 14 jeunes daphnies, Clément et Cadier, 1998).

Dans les essais en microcosmes 2 L la densité algale est suivie par mesure des teneurs en chlorophylle *a* lors des sacrifices à J7, J14, J21 et J28 (possibilité de récupérer la totalité de la colonne d'eau pour filtration des algues et extraction acétonique de la chlorophylle). Dans les essais en microcosmes de grande taille (100 et 200 L) les mesures sont les mêmes à un rythme hebdomadaire sur une plus longue période et ne nécessitent pas de sacrifice. Les daphnies (et autres cladocères le cas échéant) sont dénombrées de façon exhaustive une à deux fois par semaine dans tous les cas. Dans les premiers essais en microcosmes de 2 L (Clément et Cadier, 1998) nous réintroduisons l'ensemble des daphnies (adultes et jeunes), ce qui permettait un suivi de la population avec prise en compte des effets sur différentes générations mais conduisait à des sur-densités pouvant déséquilibrer le système et finalement biaiser l'analyse des effets.

Nous avons choisi par la suite (Clément *et al.*, 2004) d'éliminer les jeunes à l'occasion des comptages, l'évaluation réalisée se rapprochant davantage de celle d'un test de reproduction. En revanche, dans les essais en microcosmes 100 et 180 L nous continuons de suivre la population.

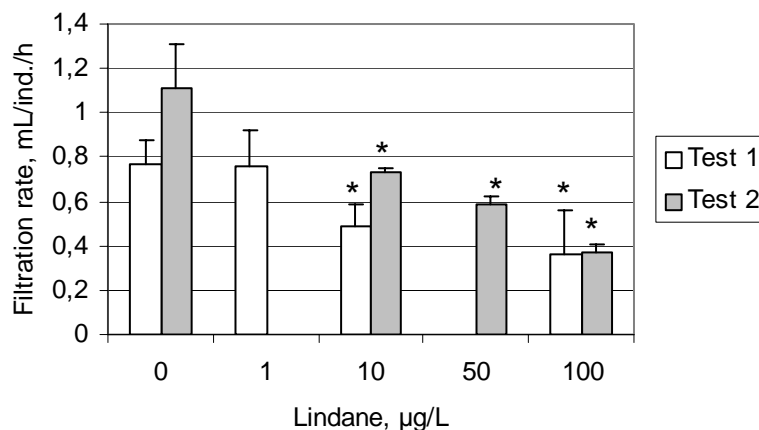


Figure 28. Taux de filtration (mL/daphnie/heure) dans des tests de filtration en conditions statiques à différents teneurs en lindane (moyennes de 3 valeurs \pm barres d'écart-type; *: effet significatif, $p < 0.05$) (d'après Clément et Zaid, 2004). Un effet significatif sur l'activité de broutage de *D. magna* est obtenu dès 10 $\mu\text{g/L}$, à une concentration inférieure à la NOEC survie 48 h (50 $\mu\text{g/L}$) de ce cladocère.

Dans les essais en microcosmes 2 L les daphnies témoins survivent bien jusqu'à 21 jours (survie moyenne de 71%, **tableau 27**) si l'on exclut de l'analyse les 3 essais sur 25 pour lesquels la survie a été très problématique ($< 40\%$) dès le début de l'essai. Au-delà la survie devient moins satisfaisante en moyenne, même si dans certains cas elle peut encore atteindre 90% en fin d'essai. A noter que cette période de 21 jours couvre la période du cycle de vie de *D. magna* pendant laquelle elle se reproduit de façon significative, elle est donc suffisante pour permettre l'observation d'effets sur la reproduction. La variabilité intra-essai est assez élevée, comme le montrent les statistiques relatives aux coefficients de variation autour des survies moyennes intra-essai (CV moyens de 8, 30, 34 et 50% respectivement à J7, J14, J21 et J28). On peut cependant noter que pour 50% des survies moyennes considérées les coefficients de variation restent inférieurs à 20% jusqu'à J21. La survie dans les microcosmes contaminés est en moyenne logiquement plus faible, pouvant être nulle dès J7 dans certains cas. Dans un tel cas, des réintroductions de daphnies sont pratiquées et les effets peuvent être confirmés ou atténués (**figures 29 et 30**) si la prise en charge des polluants conduit à réduire leur biodisponibilité ou/et modifier leur partition par divers processus (adsorption sur sédiment, photodégradation, etc.). La variabilité est plus élevée pour les microcosmes contaminés, comme l'attestent les valeurs moyennes des coefficients de variation intra-essai (de 31% à J7 à 69% à J28, **tableau 27**). Cette augmentation de la variabilité, déjà mise en exergue pour les organismes benthiques, est inhérente à la perturbation introduite par les contaminants.

La reproduction dans les microcosmes témoins débute aux alentours du 10^{ème} jour d'essai et se poursuit pour l'essentiel jusqu'au 21^{ème}. Le nombre moyen de jeunes produits au cours de l'essai est d'environ 400. Si l'on exclut de l'analyse les données de 6 essais sur 24 pour lesquels la reproduction a été anormalement basse, on obtient en moyenne environ 50 jeunes par mère (500 jeunes au total puisqu'on a 10 mères par microcosme), soit la performance minimale des essais de reproduction 21 jours. A noter qu'on a pu obtenir jusqu'à 1000 jeunes en 21 jours, soit deux fois plus. Les performances dans les microcosmes contaminés ne sont pas très sensiblement différentes, en moyenne. Ceci est corroboré par le fait qu'on n'a pu mettre en évidence un effet sur la reproduction que dans 47 cas sur 187 (soit 25.5%) en prenant en compte les données à J7, J14, J21 et J28. Ce manque de sensibilité du paramètre reproduction est en partie dû à une variabilité notablement plus élevée que pour la survie, avec des coefficients de variation moyens de 40 à 52% (**figure 31**).

Tableau 27. Résultats relatifs à la survie des daphnies en microcosmes 2 L témoins et contaminés à 7, 14, 21 et 28 jours (*nota : les statistiques portent sur les valeurs moyennes de chaque essai*)

	J10		J14		J21		J28	
	témoins	contaminés	témoins	contaminés	témoins	contaminés	témoins	contaminés
nombre de groupes	21	60	20	57	22	56	17	40
min %	43	0	60	0	40	0	5	0
max %	100	100	100	98	100	97	87.5	95
survie moyenne %	92 ± 12	62 ± 32	84 ± 11	62 ± 29	71 ± 16	54 ± 34	59 ± 23	30 ± 28
médiane %	95.71	70.56	84.17	73.33	73.33	66.67	63.33	32.50
CV moyen %	8.4	30.9	29.6	43.0	33.5	43.3	50.1	69.1
écart-type CV %	6.9	32.0	41.9	44.9	36.0	45.1	34.8	48.4
Médiane CV %	6.5	20.6	13.0	25.0	20.2	25.0	34.8	57.5

Ces résultats confirment en partie l'analyse de Triffault-Bouchet (2004) sur ses données (5 essais), représentant une partie des données analysées ici. Elle obtenait en microcosmes témoins des survies moyennes de 93, 83 et 61% à respectivement J9, J20 et J30, avec des coefficients de variation moyens respectifs de 1.9, 10.2 et 49.2%, soit une variabilité légèrement plus faible à J9 et J20 mais du même ordre à J30. Triffault-Bouchet (2004) obtenait en moyenne 116 ± 48 jeunes par mère sur 30 jours avec un CV de 42% (4 essais), contre environ 39 ± 37 jeunes par mère sur 28 jours avec un CV moyen de 46% pour l'ensemble des 23 essais que nous avons considérés.

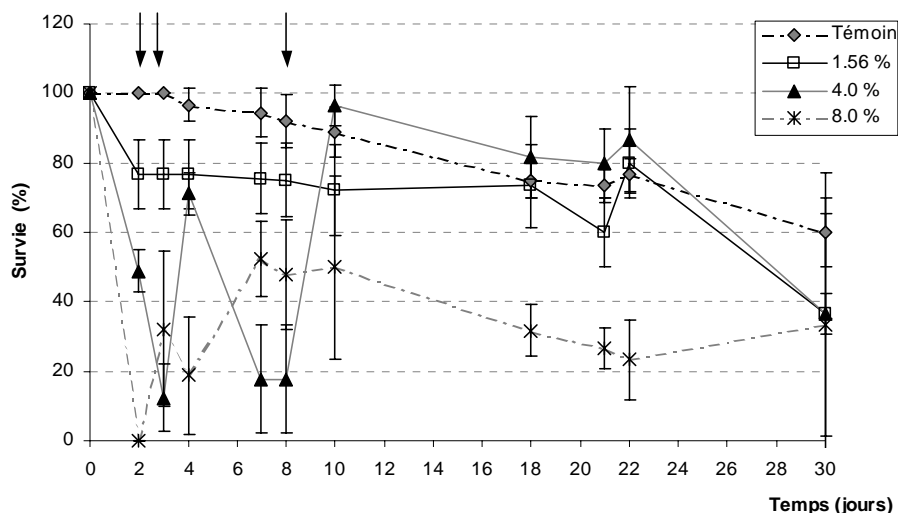


Figure 29. Amélioration de la survie de *Daphnia magna* en microcosmes contaminés par un percolat de MIOM (concentrations 4 et 8%) après trois réinoculations de daphnies (moyenne \pm écart-type, n = 3 au minimum). Les flèches indiquent l'introduction d'un nouveau lot de daphnies dans les microcosmes à J2, J3 et J8 (Triffault-Bouchet, 2004).

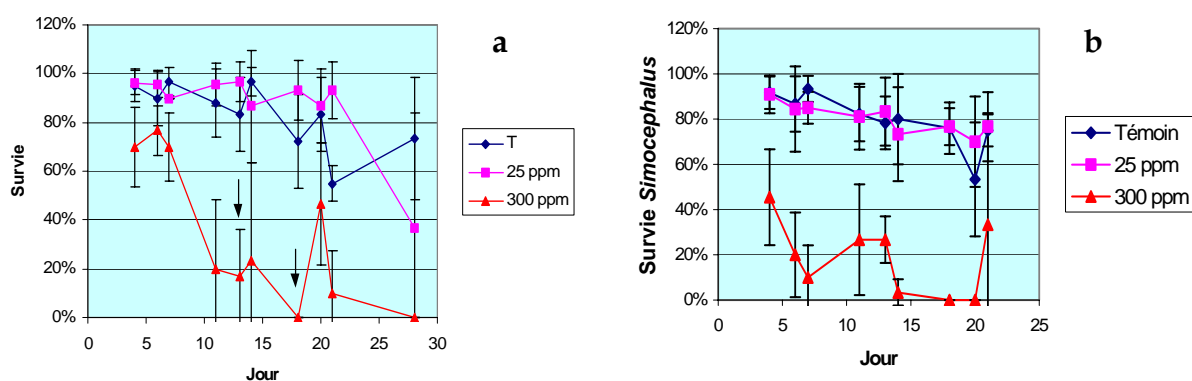


Figure 30. Survie de *Daphnia magna* (fig. a) et de *Simocephalus vetulus* (fig. b) au cours de l'essai n°2 sur un sédiment naturel de rivière dopé à la 6PPD (flèches à J13 et J18 fig. a : addition de jeunes daphnies (âge < 1 jour) à 300 ppm pour compléter à 10 le nombre de daphnies par microcosme ; moyennes \pm barres d'écart-type) (source : rapport pour le compte de l'industriel).

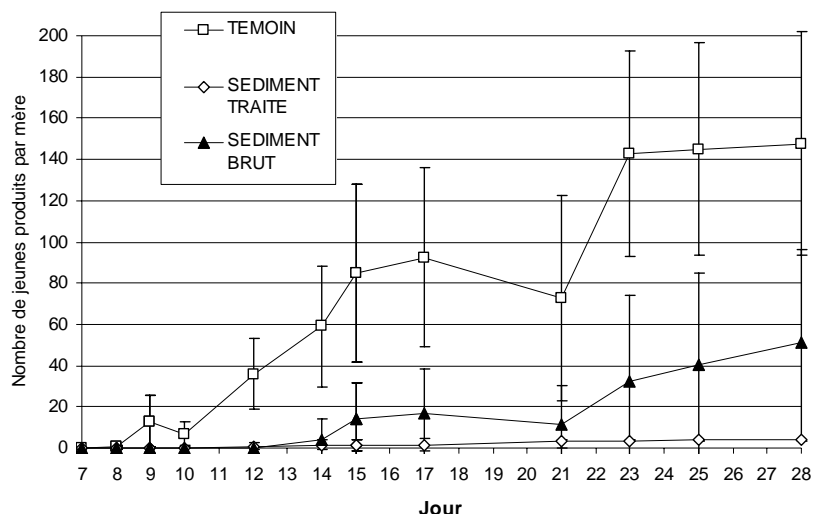


Figure 31. Reproduction de *D. magna* au cours d'un essai en microcosmes 2 L sur sédiment 12570 brut et traité Novosol® (témoin : sédiment artificiel ; moyenne \pm écart-type sur 5 à 14 microcosmes selon le jour) (thèse Cauzzi).

Dans l'ensemble des essais en microcosmes 2 L, nous avons introduit l'espèce *Pseudokirchneriella subcapitata*, une des deux espèces d'algues vertes, avec *Chlorella vulgaris*, utilisées dans nos élevages de Cladocères et qui est également classiquement utilisée dans les tests d'inhibition de croissance algale. Dans le milieu OCDE modifié que nous avons choisi pour les essais en microcosmes 2 L (cf 2.4.3.2), les algues, en l'absence de daphnies et de sédiment mais avec un bullage d'air au moyen d'une pipette Pasteur, présentent une croissance exponentielle sur 7 jours avec un taux de croissance moyen de 0.6 jour^{-1} (figure 32), correspondant à un doublement de la population algale en environ 1 jour. Ce taux de croissance est égal à $\ln(A/A_0)/t$, où A_0 = densité algale initiale, A = densité algale au temps t (jours). Avec une densité algale initiale de 10000 cells/mL, un taux de croissance de 0.6 jour^{-1} signifie qu'on obtient en moyenne 470000 cells/mL au bout d'une semaine. A noter qu'après 7 jours on commence à observer une inflexion illustrant le début de la phase plateau liée à l'épuisement des nutriments et à l'auto-ombrage (figure 33). En présence de sédiment, une partie des algues sédimentent, la densité dans la colonne d'eau est donc plus faible (Cadier, 1997). En présence de daphnies, une partie des algues sont prélevées par broutage et l'on observe dès les premiers jours, avant que les daphnies ne se reproduisent, une croissance moindre fonction de la densité de daphnies (figure 34). En microcosmes 2 L (sédiment), les algues peuvent être assez rapidement éliminées de la colonne d'eau sous l'effet de la sédimentation et surtout du broutage accentué après 10 jours par la reproduction des daphnies

(**figure 35**). L'incidence de celle-ci peut être partiellement atténuée si l'on récupère les jeunes à intervalles de temps rapprochés. On peut essayer d'identifier les nombreux facteurs qui interviennent sur la croissance algale en microcosmes témoins (pas de toxique) :

- milieu synthétique (teneurs en N et P),
- sédiment (capte une partie des algues, peut enrichir la colonne d'eau mais également piéger le phosphore, cf *chapitre 2.4.3.2. Eau surnageante*),
- daphnies (broutage),
- autres consommateurs potentiels (amphipodes),
- compétiteurs (lentilles d'eau, qui peuvent également générer un certain ombrage, algues apportées avec le sédiment si celui-ci est naturel).

En présence de toxique, les effets de celui-ci peuvent s'exercer sur la plupart de ces composantes : enrichissement du milieu par des apports en azote, phosphore ou composé utilisable par les algues (exemple possible de la 6PPD, un composé azoté pouvant libérer de l'azote en se dégradant, cf 2.5.2), effets sur les daphnies (mortalité, inhibition du broutage ou/et de la reproduction), effets sur les autres consommateurs d'algues et les compétiteurs des mêmes algues, et naturellement effets directs (inhibition ou stimulation) sur les algues elles-mêmes.

On mesure ainsi la difficulté à prédire la croissance algale dans les essais en microcosmes 2 L même en présence de sédiment artificiel. La variabilité de chacun des facteurs listés ci-dessus ajoutée à celle propre aux algues, déjà soulignée par Triffault-Bouchet (2004), confère à la croissance algale un comportement quasi-aléatoire. Inversement, la variabilité observée au niveau de la reproduction des daphnies peut s'expliquer en partie par celle liée à la croissance algale. Cette variabilité est illustrée par les données du **tableau 28**, qui montre des CV de 47 à 80% en moyenne, avec des valeurs maximales pouvant aller jusqu'à 171%. On notera que, sur la base moyenne d'une teneur en chlorophylle *a* de 1 µg/L pour une densité de 4000 cells/mL, les densités atteintes dans les microcosmes témoins vont de 2029 à 733722 cells/mL, contre 2723 à 1918043 cells/mL dans les microcosmes contaminés. Les données présentées dans ce tableau ne rendent compte ni de la dynamique algale dans chacun des essais, ni de l'influence du broutage, que nous avons déjà évoquée. La **figure 36**, tirée des essais menés sur percolats de MIOM dans le cadre de la thèse de Triffault-Bouchet (2004), permet d'illustrer différentes situations d'interactions entre algues, daphnies et toxiques. A J14 la teneur en chlorophylle dans les microcosmes témoins (T4 à T9), bien que variable, est en moyenne plus faible qu'à 1.56% (D1-4 à D1-9), alors qu'on obtient le résultat inverse pour la reproduction. A noter que la teneur en chlorophylle n'est pas directement liée au nombre de jeunes produits puisque

ceux-ci sont récupérés régulièrement (leur contribution à l'activité de broutage est donc faible), mais une bonne reproduction témoigne d'une activité de broutage élevée pour les mères. Ainsi, la concentration 1.56% n'a pas d'effet sur la survie des mères mais inhibe leur reproduction et probablement leur activité de broutage, ce qui a pour conséquence des teneurs en chlorophylle plus élevées que dans les témoins. Les concentrations de percolat de 12% (D2-4 à D2-9) et 25% (D3-4 à D3-9) entraînent à la fois, à J14, une faible croissance algale et une très faible survie des daphnies donc une reproduction quasi-nulle. A J21 la teneur en chlorophylle des témoins baisse, résultat du broutage mais aussi de la limitation de la croissance algale (*cf ci-dessus*), et la situation dans les microcosmes à 1.56% de percolat n'est pas très différente, attestant d'un rattrapage dû à la poursuite de la reproduction dans ces microcosmes. Aux concentrations supérieures (12 et 25%), la survie est toujours quasi-nulle, ce qui permet aux algues de se développer, avec une croissance moindre à 25% du fait de la toxicité du percolat. A J28 la situation a peu évolué dans les témoins et à 1.56%, alors que les algues continuent de se multiplier aux concentrations supérieures, ce qui permet de constater que la toxicité du percolat vis-à-vis des algues est faible sinon nulle.

Dans tous les essais en microcosmes 100 et 180 L les teneurs en chlorophylle de la colonne d'eau ont rarement dépassé 10 µg/L (**figure 37**), correspondant approximativement à 40000 cells/mL (*cf ci-dessus*). Les algues introduites à des densités initiales voisines de celles adoptées en microcosmes 2 L (environ 16000 cells/mL) n'ont pas engendré de bloom algal, rapidement consommées par les cladocères ou/et sédimentant. Van Donk *et al.* (1995) ont effectué des observations similaires dans leurs essais en microcosmes 600 L. Ils expliquent le développement limité du phytoplancton par une rapide disparition des nutriments pouvant être due à l'adsorption par les sédiments, à leur consommation par les organismes chlorophylliens et éventuellement à la dénitrification. La limitation des algues peut être aussi due à l'action du zooplancton (Copépodes et Cladocères) dont la densité a augmenté dans les microcosmes enrichis en nutriments.

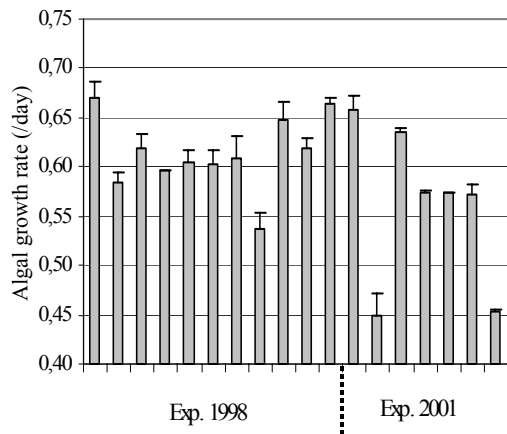


Figure 32. Taux de croissance algale dans des essais en béciers 2 L remplis de milieu OCDE au cours d'essais menées en 1998 et 2001 (sans daphnies et sans sédiment ; moyenne sur 3 valeurs \pm barres d'écart-type) (in Clément et Zaid, 2004)

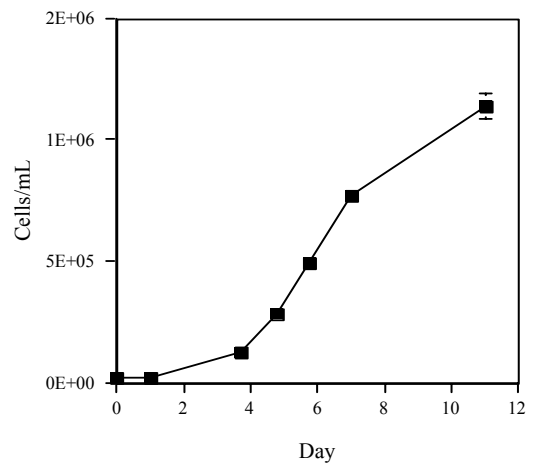


Figure 34. Croissance exponentielle des algues en milieu OCDE (béciers 2 L) jusqu'à 7 jours puis début de la phase plateau visible à 11 jours (Clément, 1995-1998).

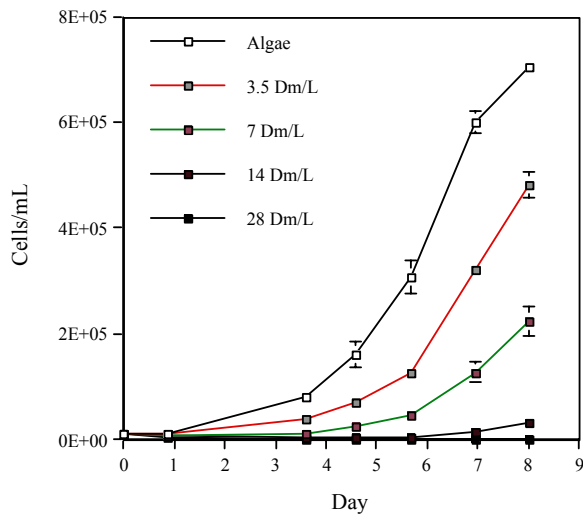


Figure 33. Illustration de l'effet du broitage des algues par les daphnies (Dm) en béciers 2 L (sans sédiment) (Clément, 1995-1998)

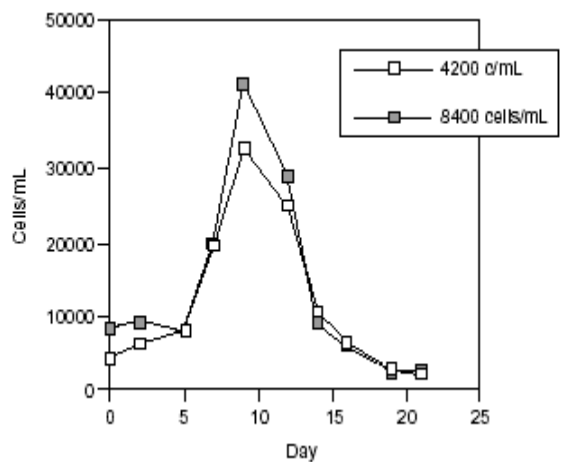


Figure 35. Evolution de la densité algale en microcosmes 2 L en présence de sédiment artificiel, de daphnies (14 individus initialement), et de 4200 ou 8400 cells/mL en début d'essai (in Clément et Cadier, 1998)

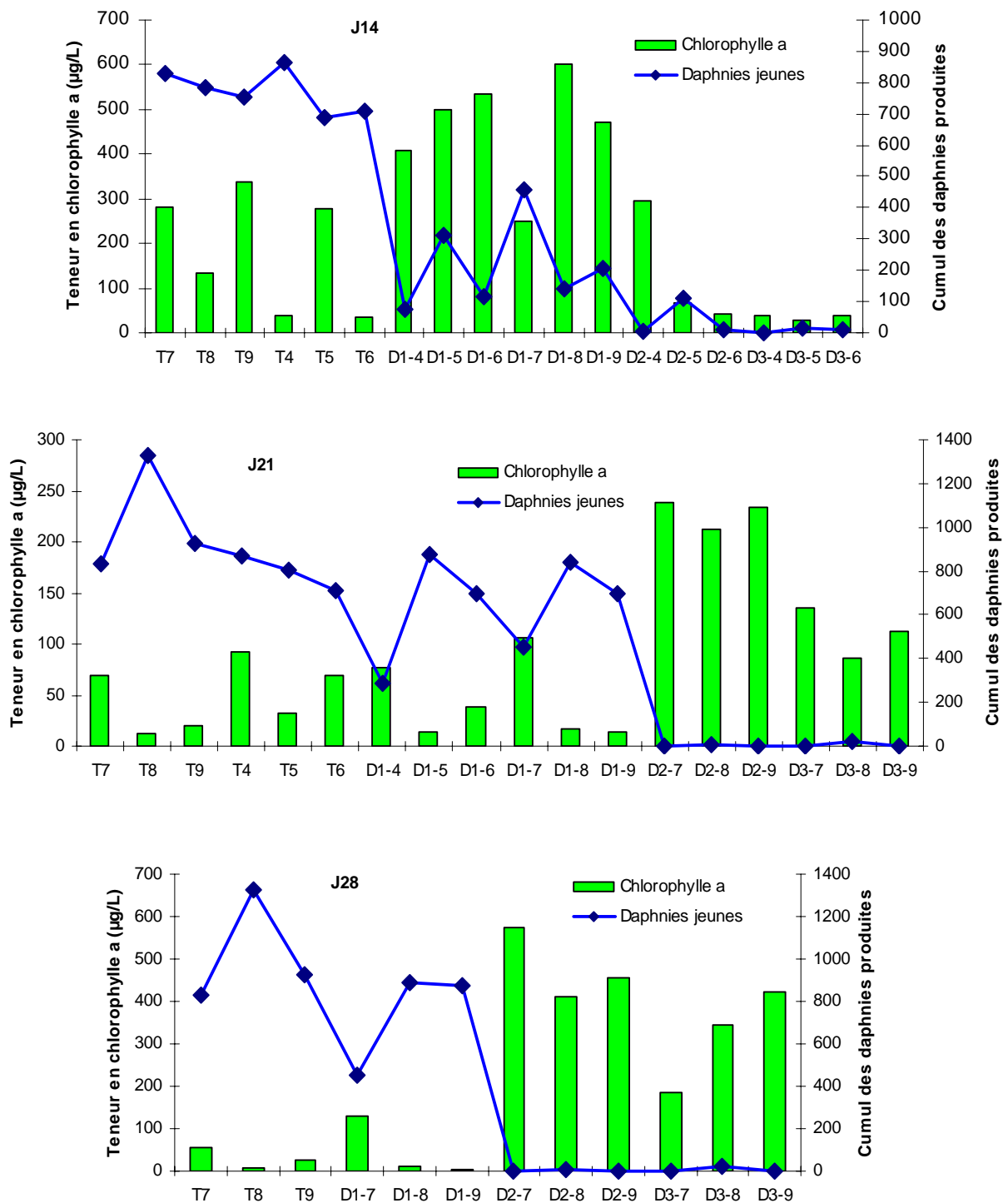


Figure 36. Illustration des interactions entre daphnies et algues dans les microcosmes 2 L contaminés par des percolats de MIOM (thèse Triffault-Bouchet, données non publiées) (T4 à T9 : microcosmes témoins; D1-4 à D1-9 : microcosmes + 1.56% de percolat ; D2-4 à D2-9 : microcosmes + 12% de percolat ; D3-4 à D3-9 : microcosmes + 25% de percolat)

Tableau 28. Résultats relatifs à la reproduction des daphnies (nombre de jeunes) en microcosmes 2 L témoins et contaminés à 7, 14, 21 et 28 jours (*nota : les statistiques portent sur les valeurs moyennes de chaque essai*)

	J10		J14		J21		J28	
	témoins	contaminés	témoins	contaminés	témoins	contaminés	témoins	contaminés
nombre de groupes	20	45	24	57	23	52	23	39
min	1.1	0.0	9.6	0.0	17.3	0	0	0
max	75	143	782	533	986	867	1046	828
effectif moyen	22	25	237	194	393	278	394	262
écart-type	24	30.0	230	167.7	338	247.8	369	257.7
médiane	10	12.5	214	163.0	364	248.8	212	227.3
CV moyen	40.4	47.3	52.2	56.9	38.9	51.1	45.8	55.0
écart-type CV	32.5	43.8	32.8	45.7	21.9	48.8	47.1	50.0
Médiane CV	40.7	37.7	51.1	37.4	39.7	33.4	27.5	33.6

Tableau 29. Résultats relatifs à la teneur en chlorophylle *a* ($\mu\text{g/L}$) en microcosmes 2 L témoins et contaminés à 7, 10, 14, 21 et 28 jours (*nota : les statistiques portent sur les valeurs moyennes de chaque essai*)

	J7		J10		J14		J21		J28	
	témoins	contaminés	témoins	contaminés	témoins	contaminés	témoins	contaminés	témoins	contaminés
nombre de groupes	4	10	9	20	6	16	17	51	17	36
[Chl a] min	1.3	1.7	5.9	2.7	4.3	4.1	0.7	1.6	0.5	1.1
[Chl a] max	140.6	116.1	143.0	137.8	183.4	460.7	90.7	228.5	131.0	479.5
[Chl a] moy	40 \pm 67	23 \pm 34	54 \pm 57	39 \pm 38	53 \pm 66	81 \pm 125	16 \pm 24	39 \pm 54	18 \pm 31	65 \pm 100
médiane	8.7	12.4	27.2	25.0	26.8	29.7	7.7	10.4	7.0	22.5
CV moyen %	47.4	52.7	65.2	55.6	54.0	58.1	57.1	46.5	79.6	67.3
écart-type CV	44.0	36.5	47.9	37.5	10.3	42.8	32.2	32.6	48.1	47.1
Médiane CV	41.5	38.8	46.5	55.9	51.1	42.2	52.7	38.1	80.3	54.7
CV min	0.0	10.0	18.1	5.3	45.1	16.9	6.2	6.0	5.7	7.0
CV max	106.4	132.4	151.2	129.5	71.8	171.2	125.0	147.8	156.4	155.8

Il est difficile d'apprécier le taux intrinsèque de croissance algale en microcosmes, mais nous avons eu l'occasion de tester l'aptitude des eaux utilisées (notamment eau de nappe enrichie dans plusieurs essais et eau du réseau enrichie) à la croissance des algues. Comme déjà expliqué dans la partie "Eau" (*cf 2.4.3.2*), cette aptitude est variable et en général inférieure à celle d'un milieu algues synthétique même après enrichissement en N et P, ce qui explique les moindres performances observées en microcosmes 100 et 180 L. Plusieurs réinoculations ont été nécessaires en cours d'essai, aboutissant généralement à un pic rapidement résorbé (**figure 37**). Si les algues en suspension ont eu du mal à se maintenir dans la colonne d'eau, nous avons toujours constaté le développement de périphyton sur les parois, plus ou moins contrôlé par les mollusques (physes et limnées), et que nous avons pu quantifier dans certains essais par une mesure de chlorophylle par unité de surface (Clément *et al.*, 2005a).

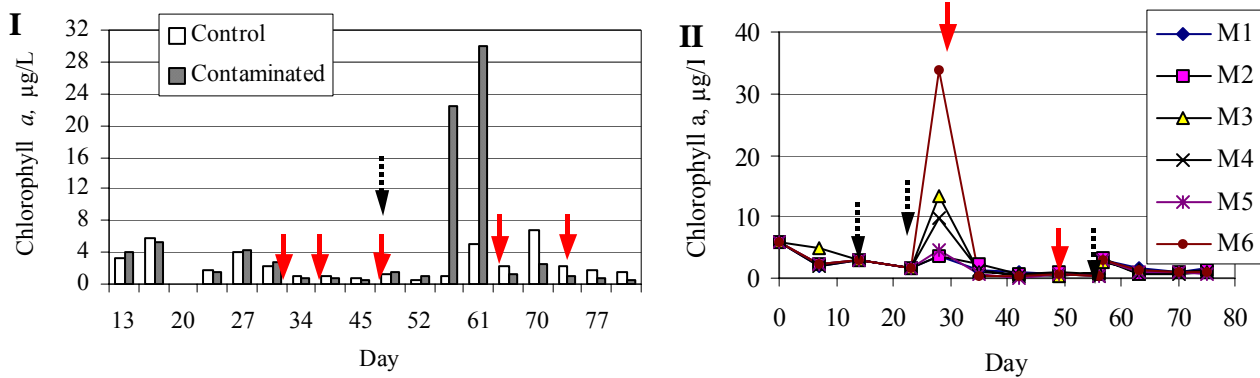


Figure 37. Evolution des teneurs en chlorophylle de la colonne d'eau des microcosmes 100 L lors des essais sur percolats de MIOM (flèches en pointillé : réinoculations en algues ; flèches en plein : apports de percolats) (figure tirée de Clément *et al.*, 2005a)

Le suivi et la gestion des populations de cladocères introduits librement dans les systèmes (*Daphnia magna*, *Ceriodaphnia dubia* et *Simocephalus vetulus* dans certains essais) se sont avérés délicats et lourds à mener. La récupération des individus en vue d'un dénombrement est difficile et consommatrice de temps sur des volumes de 100 et 180 L. C'est la raison pour laquelle nous avons adopté d'autres stratégies en parallèle, sur lesquelles nous reviendrons.

Dans plusieurs cas les populations ont eu du mal à se développer (cf **tableaux A4-3 et A4-4 en annexe 4**), de façon variable selon les microcosmes, nécessitant des interventions destinées à réinoculer, après élimination ou non des survivants. Il n'a pas toujours été possible de comprendre les causes des problèmes rencontrés en l'absence de toxiques, un milieu non optimal (cf chapitre "Eau") et un déficit possible en nourriture (croissance algale insuffisante) pouvant faire partie des causes premières. Dans un cas (1er essai 100 L sur sédiments contaminés dans le cadre du contrat Solvay, thèse Cauzzi), nous avons pu identifier la présence d'une cyanobactérie (*Microcystis* sp.) pouvant être responsable de la mortalité observée dans un microcosme, l'élimination de ce microorganisme par filtration se traduisant, dans des essais en parallèle menés sur les eaux surnageantes, par une amélioration significative de la survie et de la reproduction des daphnies.

Le fait d'utiliser simultanément plusieurs espèces de cladocères a permis de montrer des réponses différentes entre ces espèces, en l'absence et en présence de toxiques. Des résultats obtenus il ressort que, dans les témoins, les populations de *D. magna* sont progressivement remplacées par celles de *C. dubia* et *S. vetulus*, espèces de plus petite taille peut-être favorisées par les conditions limitantes en nourriture, comme nous avons pu l'observer au cours du 2ème essai sur percolats de MIOM (Lottmann, 2003, **figure 38**). Dans les témoins

(M1 à M3) les daphnies *D. magna* sont d'abord dominantes avec les cériodaphnies *C. dubia*, puis sont largement dépassées par *C. dubia* et *S. vetulus*, *C. dubia* étant généralement dominante. Dans les microcosmes contaminés (M4 à M6), le même déclin relatif de *D. magna* est constaté, dégénérescence probablement accentuée par les effets des percolats, ainsi qu'une inversion de domination au cours de la période de contamination (J49 à J78), avec cette fois une domination de *S. vetulus* et un rattrapage final par *C. dubia*, deux espèces insensibles à la contamination.

La difficulté d'évaluer les densités de populations de cladocères libres dans les systèmes, un échantillonnage n'étant pas possible du fait de leur répartition non uniforme, nous a conduit dans un premier temps (Lottmann, 2003, Triffault-Bouchet, 2004, thèse Cauzzi) à concevoir des compartiments (cf **figure 3**) permettant d'isoler une fraction du plan d'eau tout en assurant, par des ouvertures latérales de maille 50 µm, une circulation de l'eau et des algues entre petit et grand compartiments. Les daphnies étaient introduites en même temps dans le grand compartiment et dans les petits, à des densités équivalentes. Par ailleurs, l'un des deux petits compartiments ne comportait pas de sédiment, ceci en vue d'examiner une éventuelle influence du sédiment sur le développement de la population et la réponse aux toxiques. Le suivi des populations de ces petits compartiments était plus aisé puisque portant sur un volume et des effectifs inférieurs. Une différence fondamentale était cependant introduite par le fait d'éliminer les jeunes lors des comptages des PC, alors que la population totale des GC était conservée, l'objectif du suivi des PC étant d'évaluer la reproduction des mères sur des périodes adaptées (de l'ordre de 20 jours). Les résultats (**tableau 30**) montrent que les petits compartiments sont rarement représentatifs de ce qui se passe dans le grand compartiment, avec souvent une production de jeunes plus élevée, probablement liée au fait que les jeunes sont éliminés dans les petits compartiments. Dans tous les cas la variabilité est élevée. Il est difficile de parler de confinement dans ce cas puisque chaque PC était aéré, mais force est de reconnaître que l'environnement des cladocères ne pouvait être le même entre PC et GC (ratio surfaces : eau et développement du périphyton, interactions avec autres organismes, disponibilité des algues, composition physico-chimique de l'eau du fait d'un mélange imparfait des eaux entre compartiments induit par la paroi de séparation, ...), ce qui peut suffire à introduire des différences significatives entre populations. Dans ces conditions, il semble préférable de supprimer cette compartimentation qui alourdit les essais et fournit des informations divergentes ou en tous cas peu corrélées.

Nous avons également introduit des daphnies encagées, soit dans des béciers de verre immergés et fermés par le haut au moyen d'une maille de 200 µm, soit dans des pièges plus

élaborés (cf **figure 21**) permettant, par plusieurs ouvertures, un contact plus grand avec la colonne d'eau et le sédiment. Ce dernier type de piège, utilisé dans l'essai en gravières pilotes, n'a pas donné les résultats escomptés, pour des raisons proches de celles évoquées avec les organismes benthiques (confinement du fait d'un renouvellement insuffisant de l'eau et d'un niveau d'oxygène général assez faible, pertes lors des manipulations, problème de nourriture, etc.). L'utilisation de béciers s'est avérée plus intéressante, notamment pour suivre la réponse à court terme (de quelques jours à 3 semaines) des organismes à une contamination, mais là encore les conditions imposées (pas d'exposition au sédiment, échanges limités avec la colonne d'eau nécessitant un renouvellement de l'eau des béciers tous les deux jours) limitent le degré de représentativité de ces essais en cages.

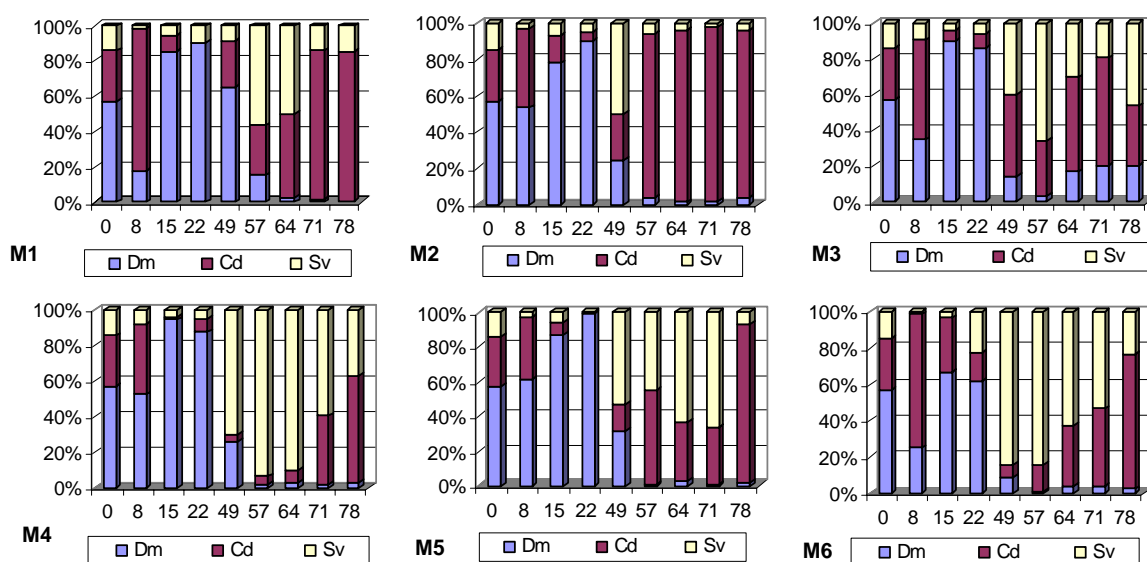


Figure 38. Répartition des populations de cladocères entre les 3 espèces introduites lors du 2^{ème} essai sur percolats de MIOM (M1 à M3 : microcosmes témoins ; M4 à M6 : microcosmes contaminés ; Dm : *Daphnia magna* ; Cd : *Ceriodaphnia dubia* ; Sv : *Simocephalus vetulus* ; contaminations à J30 et J50) (Lottmann, 2003).

2.4.3.4.2.3. Lentilles d'eau

Les lentilles d'eau sont des hydrophytes flottants présents dans de nombreux milieux aquatiques des zones tempérées, essentiellement dans des eaux calmes, qui forment des colonies de 2 à 4 frondes au minimum, de taille réduite (2 à 4 mm). Les frondes sont reliées entre elles par un pétiole ou sont libres. Chacune détient une racine unique filiforme pouvant atteindre 10 centimètres de long, leur taille dépendant du degré de trophie du milieu. Les lentilles d'eau sont caractérisées par une reproduction végétative. Chaque fronde mère peut produire, par bourgeonnement successif latéral, 10 à 20 frondes. Leur grande capacité de

multiplication en fait des organismes envahissants. Ces macrophytes sont une source de nourriture importante pour les oiseaux aquatiques, les gastéropodes, les gammares, etc. Ces organismes participent en retour à la dissémination de ces plantes (MATE, 1997).

Tableau 30. Comparaison des populations des petits et grands compartiments dans les essais 100 L (PC : petit compartiment ; GC : grand compartiment ; PCAS : petit compartiment avec sédiment ; PCSS : petit compartiment sans sédiment)

Essai	Période	Facteur multiplicatif population daphnies	
		Témoins	Contaminés
Essai MIOM 2	pré-contam 21 jours	PCAS : 15 ± 8	/
		PCSS : 20 ± 9	/
		GC : 18 ± 5	/
	contam 21 jours	PCAS : 22 ± 11	PCAS : 8 ± 2
		PCSS : 20 ± 9	PCSS : 9 ± 5
		GC : 3 ± 1.4	GC : 9 ± 5
Essai Solvay n°1	pré-contam 21 jours	PC : 4.6 ± 3.5	/
		GC : 23 ± 10	/
Essai Solvay n°2	pré-contam 21 jours	PC : 24 ± 17	/
		GC : 6.7 ± 4.1	/
	pré-contam 33 jours	PC : 43 ± 23	/
		GC : 27 ± 33	/
	contamination	PC : production de jeunes négligeable GC : production variable impossible de comparer PC et GC	



Figure 39. Populations de *Lemna minor* et *Spirodela polyrhiza* en microcosme 180 L (photo B. Clément)

Ayant utilisé l'espèce *Lemna minor* avec succès dans l'évaluation de la toxicité de lixiviats de décharge (Clément et Bouvet, 1993; Clément et Merlin, 1995; Clément *et al.*, 1996, 1997), nous avons conservé cet organisme dans les essais en microcosmes 2, 100 et 180 L, en y ajoutant l'espèce *Spirodela polyrhiza* dans les essais 100 et 180 L, une lentille d'eau aux frondes plus grosses et aux racines plus nombreuses. Il convient de préciser que *Lemna minor* fait l'objet de plusieurs normes et directives de bioessais à l'élaboration desquelles nous avons collaboré (Afnor, 1996; OCDE, 2000; ISO, 2003).

En microcosmes 2 L *Lemna minor* n'est consommée par aucun des organismes présents, en revanche les deux espèces sont consommées par les limnées (gastéropodes) qui sont introduites en microcosmes 100 et 180 L, c'est la raison pour laquelle celles-ci sont compartimentées et nourries avec de la salade. L'autre espèce de gastéropode, *Physa acuta*, se contente de brouter les surfaces des lentilles sur lesquelles croissent des algues périphytiques, les dommages aux lentilles sont insignifiants et cette espèce est laissée libre dans les systèmes.

La croissance de *Lemna minor*, en l'absence de toxiques, n'est donc fonction que du milieu (colonne d'eau et sédiment) qui apporte les nutriments, oligo-éléments, et des conditions abiotiques fixées dans les essais en microcosmes (éclairage et température). Le milieu synthétique utilisé (milieu OCDE) dans les essais en 2 L, l'eau de nappe (essais 100 L) ou l'eau de réseau enrichie (essais 180 L) ne constituent pas, nous l'avons déjà remarqué au 2.4.3.2 des milieux optimaux comme ceux utilisés dans les essais normalisés (milieu de Steinberg par exemple). Par ailleurs, les conditions d'éclairage (2000 lux 16 h/jour) et de température (20 °C) choisies sont éloignées des conditions des essais normalisés où l'on recherche une forte croissance pour augmenter la sensibilité du test sur une période assez courte (4 à 7 jours) : une intensité lumineuse d'environ 6000 lux, ou encore 85 à 125 $\mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, et une température de 24 °C. Enfin, les teneurs en nutriments sont également influencées par les prélèvements réalisés par les micro-algues en microcosmes 2 L, et les micro-algues et plantes enracinées en microcosmes 100 et 180 L, tous ces producteurs primaires apparaissant ainsi comme des compétiteurs potentiels pour les lentilles d'eau. La synthèse des données acquises au cours des essais en microcosmes 2 L mis en œuvre depuis 1997 (**tableau 31**) confirme que dans la grande majorité des essais la croissance des témoins est linéaire donc limitée (**figure 40**), contrairement à ce qu'on obtient dans les essais normalisés où cette croissance est exponentielle. On peut noter que le sédiment artificiel procure en général une meilleure croissance que le sédiment d'Aiguebelette que nous avons appelé "craie", le même milieu OCDE étant utilisé dans les deux cas, et une croissance équivalente à celle observée en

présence d'autres sédiments, mais on note une variabilité inter-essais certaine (coefficients de variation voisins de 50%, valeur qui confirme celle obtenue par Triffault-Bouchet, 2004). Dans deux cas seulement de sédiments de référence naturels nous avons pu observer une croissance exponentielle (**figure 41**), avec un taux de croissance moyen de 0.137 jour^{-1} correspondant à un temps de doublement du nombre de frondes de 5 jours environ, supérieur cependant au temps de doublement maximal de 2.5 jours adopté dans les essais normalisés comme critère de validité.

Au-dessus de sédiments contaminés ou dans des microcosmes contaminés par des effluents (cas des essais sur percolats de MIOM), la croissance de *L. minor* est en moyenne plus élevée que dans les témoins, mais peut être linéaire ou exponentielle (**tableau 32**). La proportion de cas où la croissance est exponentielle est plus élevée que pour les témoins, ceci s'expliquant par le fait qu'une majorité de situations concerne des sédiments pollués qui enrichissent la colonne d'eau en nutriments (en particulier ammoniacque). En fait ces chiffres regroupent des situations contrastées puisqu'ils incluent aussi bien les cas où une inhibition significative a été observée que ceux où la croissance a au contraire été stimulée. Comme on peut le constater, l'inhibition de croissance est plutôt observée dans les cas de croissance linéaire, alors que la stimulation concerne en grande majorité les cas de croissance exponentielle. On peut également observer que dans près de 60% des cas aucun effet, dans un sens ou dans l'autre, n'a été mis en évidence. On peut encore affiner l'analyse, en précisant que, si l'on considère différentes durées à l'intérieur de l'essai en microcosmes (7, 14, 21 et 28 jours en général), on ne note un effet d'inhibition que pour 16 groupes sur 263 (soit 6% des cas) et un effet de stimulation pour 50 groupes sur 263 (soit 19% des cas). Ainsi l'inhibition est-elle plus rarement observée et de préférence en fin d'essai, alors que la stimulation de croissance est plus fréquente et observée plus tôt (J14). La durée d'exposition est importante à prendre en compte, car des effets comme un retard de croissance peuvent ne se manifester qu'en début d'essai.

Au cours des essais, mais seulement à l'occasion des sacrifices d'une partie des microcosmes (à J7 ou J10, J14, J21 et J28), ont également été mesurées les biomasses (poids secs). Pour chaque essai, il existe une corrélation, plus ou moins bonne, entre biomasse (PS) et nombre de frondes (NF). La **figure 42** montre deux exemples illustrant ceci. En **fig. 42a**, qui concerne un essai sur sédiments contaminés, la corrélation est très bonne, alors qu'en **fig. 42b** (essai sur percolat de MIOM) la relation est perturbée par le fait que lentilles témoins et lentilles contaminées se comportent différemment, l'existence d'un effet significatif sur le nombre de frondes se traduisant par une bonne corrélation de pente plus élevée (losanges pleins), qui

signifie des frondes plus petites. On voit ici l'intérêt de disposer également du paramètre biomasse, facile à mesurer à l'occasion des sacrifices. Ce paramètre peut en outre apporter une appréciation différente sur les effets observés, puisque, sur les 48 groupes de résultats pour lesquels on dispose des moyennes pour les nombres de frondes et les biomasses, les appréciations fondées sur les deux paramètres ne concordent pas dans 23% des cas (effet significatif pour un paramètre et non significatif pour l'autre). Par ailleurs, dans un cas, les effets observés ont été opposés (stimulation pour le nombre de frondes et inhibition pour le poids sec). Dans la majorité des cas où les effets sont concordants, les intensités des effets sont différentes selon qu'on considère le nombre de frondes ou bien la biomasse, le premier traduisant la multiplication végétative, le second l'augmentation de poids, un toxique pouvant avoir peu d'effet sur la première et inhiber la seconde (aboutissant dans ce cas à des frondes plus petites que celles du témoin, Clément et Bouvet, 1993 ; Clément et Merlin, 1995). Pour achever cette comparaison sur ces deux critères de croissance, le **tableau 33** permet d'apprécier leurs sensibilités relatives en considérant les fréquences d'occurrence d'effets significatifs observés.

Le ratio poids sec sur nombre de frondes, ou poids sec par fronde, permet d'intégrer les effets sur le nombre de frondes et/ou la biomasse pondérale. Ce rapport fluctue entre 0.15 et 0.28 mg sec/fronde pour les témoins. Du fait de son caractère intégrateur, ce paramètre permet de mettre en évidence un écart significatif par rapport au témoin dans 68% des traitements ou 52% des groupes de valeurs considérés, c'est-à-dire dans un plus grand nombre de cas que si l'on considère le nombre de frondes ou la biomasse totale.

Nous avons déjà évoqué ci-dessus la variabilité inter-essais, assez élevée due en partie à des sédiments différents. La variabilité intra-essais est nettement plus faible puisqu'une majorité (souvent > 60%) de valeurs moyennes sont assorties d'un CV < 20%, que ce soit pour le nombre de frondes, le poids sec ou le poids sec par fronde (**tableaux A5-1 à A5-3 en annexe 5**). On ne note qu'une légère dégradation à 28 jours. Cette variabilité est acceptable bien que souvent plus élevée que celle observée en tests monospécifiques (CV < 10% pour des durées d'essai de 4 à 7 jours, d'après une analyse de la variabilité sur 11 références réalisée par l'auteur dans le cadre d'une contribution à la mise au point d'une ligne directrice OCDE) où les facteurs de variation sont moins nombreux et les conditions plus faciles à contrôler, comme par exemple l'intensité lumineuse (permutation des flacons plus aisée, voire dispositif de plateaux tournants devant une rampe lumineuse (Clément, 1994)).

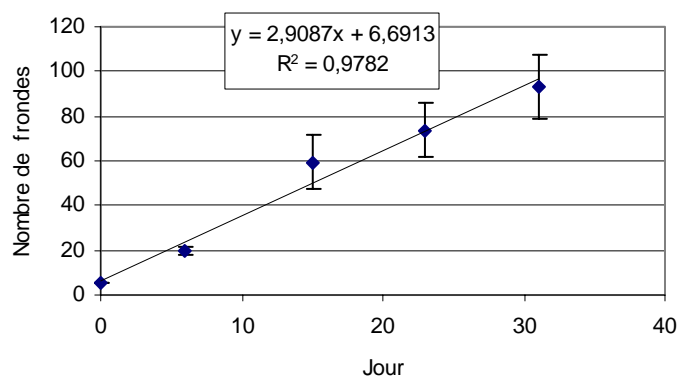


Figure 40. Croissance linéaire type en microcosmes de 2 L (sédiment artificiel et sédiment "craie")

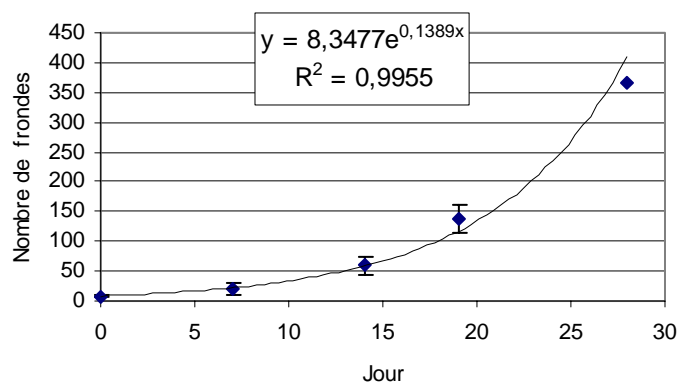


Figure 41. Croissance exponentielle type en microcosmes de 2 L (sédiment naturel)

Tableau 31. Statistiques concernant la croissance (taux de croissance à partir du nombre de frondes, en j^{-1}) de *Lemna minor* en microcosmes 2 L témoins

	Sédiment artificiel	Craie	Autres sédiments naturels	
Type croissance	linéaire	linéaire	linéaire	exponentielle
Nombre d'essais	9	11	5	2
Taux croiss. moyen	2.913	2.093	2.919	0.137
écart-type	1.655	0.994	1.276	0.003
Coeff. de variation (%)	57	47	44	2
Taux croiss. min	1.236	0.608	1.116	0.134
Taux croiss. max	5.777	3.395	4.174	0.139
Taux croiss. médian	2.591	2.045	2.607	0.137

Tableau 32. Statistiques sur la croissance (nombre de frondes) de *Lemna minor* en microcosmes 2 L contaminés

Croissance	linéaire	exponentielle
Nombre de sédiments	38	32
Taux de croissance (j^{-1})		
moyenne	3.366	0.138
écart-type	1.823	0.022
coeff variation (%)	54	16
min	0.398	0.092
max	6.178	0.169
médiane	3.671	0.142
Inhibition	10 essais sur 38	1 essai sur 32
Stimulation	6 essais sur 38	13 essais sur 32

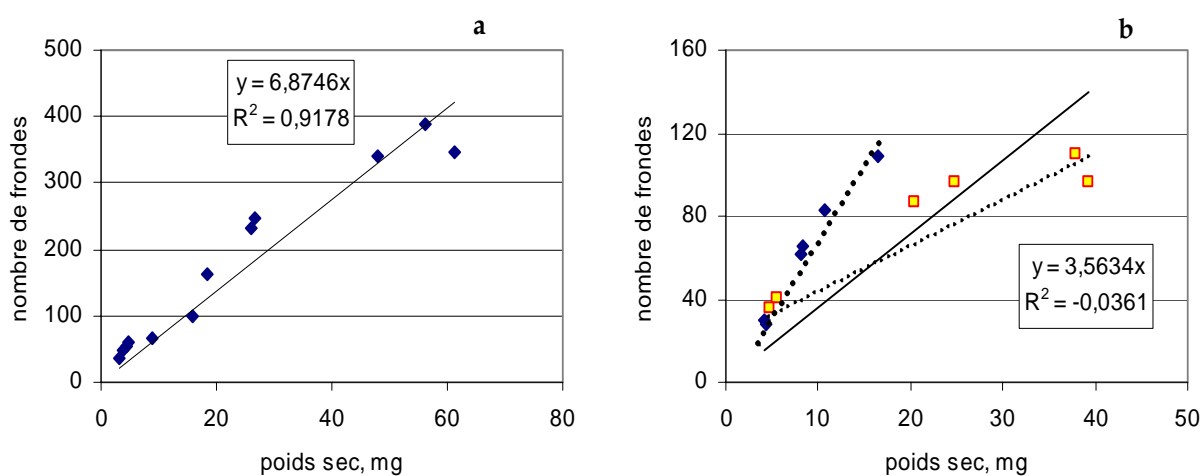


Figure 42. Corrélations plus ou moins bonnes entre poids sec et nombre de frondes dans deux essais en microcosmes 2 L (a : essai sur sédiments contaminés, thèse Triffault-Bouchet ; b : essai sur percolat de MIOM, thèse Triffault-Bouchet ; dans cet essai les losanges pleins sont relatifs aux microcosmes contaminés où un effet est significatif, les carrés clairs sont relatifs aux témoins et aux microcosmes contaminés sans effet significatif)

Tableau 33. Fréquence d'occurrence d'effets d'inhibition ou de stimulation de croissance selon le critère de croissance considéré (le terme « traitement » renvoie à une situation de contamination particulière, un sédiment ou une dose de toxique ou d'effluent, le terme « groupe » à une moyenne de valeurs relatives à plusieurs réplicats)

	Nombre de frondes	Poids sec
Inhibition		
% traitements	15.7%	26%
% groupes	6%	18.4%
Stimulation		
% traitements	27.1%	26%
% groupes	19%	15.4%

En microcosmes 100 et 180 L la croissance de *Lemna minor* a présenté également les deux types (linéaire ou exponentiel) (**tableau A4-5 en annexe 4**). Si le sédiment a toujours été celui d'Aiguebelette, l'eau utilisée a différé selon les essais, ce qui peut expliquer en partie ces différences de croissance : eau de nappe enrichie pour les essais 100 L sur percolats de MIOM et le 1er essai Solvay, pour lesquels une croissance linéaire a été principalement observée, milieu OCDE enrichi pour le 2ème essai Solvay et eau de réseau enrichie et renouvelée en continu pour l'essai en gravières pilotes, avec dans les deux cas une croissance exponentielle. Plusieurs facteurs interviennent : composition physico-chimique de l'eau, taux de renouvellement de l'eau, compétiteurs (macrophytes, algues pélagiques, périphyton), ... Dans la plupart des cas le milieu eau + sédiment est assez riche pour assurer une production régulière sur plusieurs mois, ce qui a souvent obligé à éliminer une partie des lentilles pour faciliter le comptage rapidement fastidieux au-delà de 100 frondes, mais des exceptions ont pu se produire avec les témoins (exemple de la seconde période du 1er essai Solvay, où la croissance des microcosmes témoins est beaucoup plus faible que celle des microcosmes contaminés). La présence de sédiments contaminés (essais Solvay) conduit à des effets d'inhibition (sédiment traité dans le cas de l'essai en gravières pilotes) ou au contraire de stimulation (sédiment brut dans le même essai), ce qui permet de renseigner sur la biodisponibilité des polluants et le relargage de nutriments par le sédiment. La variabilité est dans certains cas élevée (CV de 43% à 159% dans 9 cas sur 17), mais elle peut être acceptable (CV < 25% dans 6 cas sur 17), même sur des périodes supérieures au mois.

Une autre espèce de lentilles d'eau, *Spirodela polyrhiza*, a été utilisée simultanément avec *Lemna minor* dans certains essais 100 et 180 L (**tableau A4-6 en annexe 4**). Les résultats pour ces deux espèces sont assez bien corrélés, comme le montre la **figure 43** qui concerne les cas de croissance exponentielle, mais on relève une tendance à une croissance plus forte pour *L. minor*. *S. polyrhiza* présente concomitamment avec *L. minor* une croissance linéaire dans certains essais. Par ailleurs, la variabilité est moindre pour *S. polyrhiza* (**figure 37**).

2.4.3.4.2.4. Macrophytes enracinées

Nous avons eu la possibilité d'utiliser plusieurs espèces de macrophytes enracinés dans les essais en microcosmes 100 et 180 L, la taille des systèmes permettant l'implantation de plantes dans le sédiment des aquariums ou dans des béciers immergés remplis du même sédiment (**figure 44**).

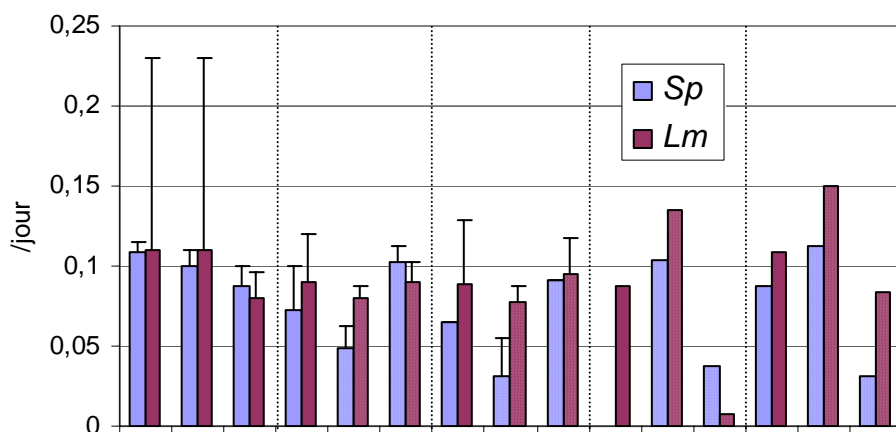


Figure 43. Résultats de croissance (exprimés sous la forme de taux de croissance exponentielle, en jour⁻¹) des deux espèces de lentilles d'eau (*Spirodela polyrhiza* (*Sp*) et *Lemna minor* (*Lm*)) utilisées simultanément dans certains essais en microcosmes 100 et 180 L (moyenne ± barre d'écart-type ; barres pleines : microcosmes témoins, barres pointillées : microcosmes contaminés ; les traits verticaux pointillés délimitent des essais)

L'utilisation de béciers permet des observations plus précises et plus faciles à réaliser du fait de la possibilité de sortir les béciers. Nous avons utilisé occasionnellement *Groenlandia densa* et *Myriophyllum spicatum*, la première ayant été récupérée avec l'aimable autorisation du Pr Gérard Blake dans les mares artificielles de l'Université de Savoie où elle est peu abondante, la seconde ayant été plus récemment fournie par une collègue allemande, Ute Feiler, qui utilise cette espèce dans des bioessais sur sédiment (Feiler *et al.*, 2004). Nous avons systématiquement introduit une troisième espèce, *Elodea canadensis*, également récupérée dans les mares de Chambéry où elle est plus abondante que *G. densa*. Tous ces macrophytes sont des hydrophytes (immersion totale et permanente) caractéristiques de milieux lentiques. Ce sont des plantes supérieures comme les lentilles d'eau mais elles sont enracinées et développent à ce titre un contact étroit avec les sédiments constitués et stables (sables limoneux, argiles, vases organiques) (Testard, 1995). Elles tirent leurs besoins en azote et phosphore à la fois de l'eau et du sédiment, ce qui ne permet pas d'établir une relation univoque entre composition en nutriments de l'eau et croissance des plantes (Carr *et al.*, 1997).

Les blooms phytoplanctoniques précoces et une forte turbidité entravent leur développement et entraînent leur remplacement éventuel par des végétaux flottants ou à feuilles flottantes (Testard, 1995). La multiplication végétative est favorisée par rapport à la reproduction

sexuée, d'où une capacité de propagation élevée pour certaines espèces envahissantes (Merlin et Blake, 1991).

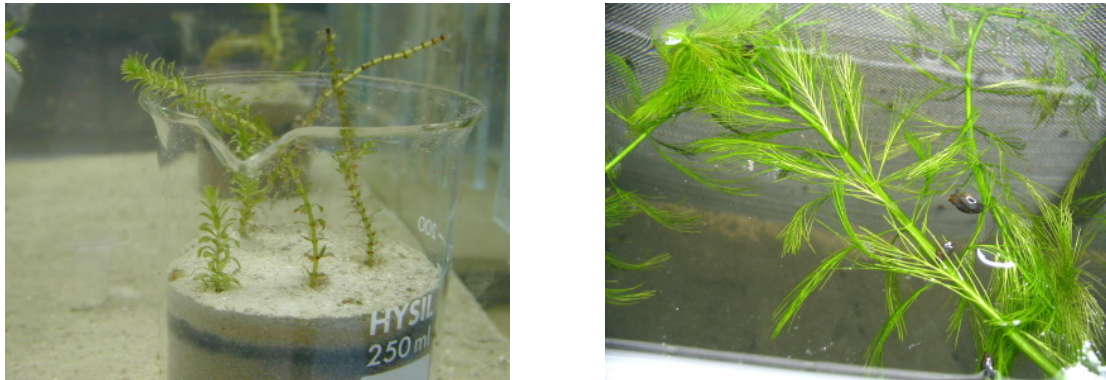


Figure 44. Macrophytes *Elodea canadensis* en b cher et *Myriophyllum spicatum* (photos B. Clément)

Outre l'influence de leurs activités respiratoire et photosynthétique sur le bilan en oxygène de la colonne d'eau, les macrophytes enracinés peuvent oxyder le sédiment par la capacité oxyg nante de leur rhizosphère, propriété détoxifiante qui peut conditionner leur survie et leur développement sur des sédiments anoxiques (Testard, 1995). Les macrophytes se caractérisent par une grande capacité de stockage d'éléments inorganiques, azote et phosphore mais aussi métaux (bore, cuivre, zinc, cadmium, plomb, aluminium, baryum, cobalt, chrome, fer, manganèse, nickel, Mal *et al.*, 2002 ; Désy *et al.*, 2002 ; Sivaci *et al.*, 2004 ; Cardwell *et al.*, 2002 ; Samecka-Cymerman et Kempers, 2004) qu'ils extraient de l'eau et des sédiments, mais ils participent également à la redistribution de ces éléments, contribuant à l'enrichissement global des eaux lacustres en nutriments et en carbone (Testard, 1995). Les herbiers de macrophytes constituent un support actif pour le périphyton algal, une ressource d'habitat et de nourriture pour de nombreux micro- (protozoaires, rotifères, cladocères, ...) et macroinvertébrés (oligochètes, chironomes, mollusques, ...), mais aussi pour des vertébrés terrestres (oiseaux, micro-mammifères, reptiles), amphibiontes (batraciens) ou aquatiques (poissons) (Testard, 1995). Les macrophytes ont été depuis de nombreuses années utilisées comme bioindicateurs pour déterminer l'impact des polluants sur les étangs, les lacs et les cours d'eau, et plus récemment comme organismes tests dans des bioessais de laboratoire (Lewis, 1993). Si des essais normalisés sur lentilles d'eau ont été mis au point durant les dix dernières années (Afnor, 1996; OCDE, 2000; ISO, 2003), les macrophytes enracinées comme *Myriophyllum spicatum*, *Elodea canadensis*, *Vallisneria americana*, *Ceratophyllum demersum* et *Hydrilla verticillata* sont également utilisées dans des bioessais (Merlin, 1988 ;

Merlin et Blake, 1991 ; Van den Brink *et al.*, 1997 ; Kähkönen et Kairesalo, 1998 ; Mal *et al.*, 2002 ; Nyström *et al.*, 2002 ; Wendt-Rasch *et al.*, 2003) mais la normalisation n'est pas encore effective. L'intérêt de ces plantes enracinées réside dans leur exposition aux toxiques de la colonne d'eau et du sédiment, et des efforts sont aujourd'hui dirigés en Europe vers la mise au point de tests sur macrophytes enracinées permettant d'évaluer la toxicité des sédiments contaminés (Feiler *et al.*, 2004). Enfin, les macrophytes enracinées sont depuis longtemps intégrées aux essais en microcosmes et mésocosmes (Giddings et Eddlemon 1979 ; Cragg et Fry, 1984 ; Merlin et Blake 1991 ; Merlin *et al.* 1992 ; Thiébaud *et al.* 1994 ; Van Donck *et al.* 1995 ; Barry et Logan 1998 ; Crum *et al.*, 1998 ; Cuppen *et al.* 2000 ; Girling *et al.*, 2000 ; Van den Brink *et al.*, 1997, 2000 ; Sanderson *et al.* 2002 ; Hanson *et al.*, 2002, 2003 ; Wendt-Rasch *et al.*, 2003), où elles apportent un degré de réalisme supplémentaire.

De nombreux paramètres peuvent être mesurés pour évaluer les effets sur les plantes. La croissance est mesurée simplement à travers la longueur des tiges (Girling *et al.*, 2000 ; Mal *et al.*, 2002 ; Hanson *et al.*, 2002, 2003 ; Wendt-Rasch *et al.*, 2003), le nombre d'entre-nœuds (Hanson *et al.*, 2002, 2003), le nombre de tiges (Girling *et al.*, 2000 ; Feiler *et al.*, 2004), la biomasse finale des plantes (Van den Brink *et al.*, 1997 ; Girling *et al.*, 2000 ; Hanson *et al.*, 2002 ; Feiler *et al.*, 2004), le développement de racines (Wendt-Rasch *et al.*, 2003), leur nombre (Hanson *et al.*, 2002) ou leur biomasse (Mal *et al.*, 2002). Des mesures plus complexes sur des processus liés à l'activité des plantes peuvent également être mises en œuvre : mesure des activités photosynthétique et respiratoire de fragments foliaires ou plantes entières au travers des échanges d'oxygène (Merlin, 1988 ; Merlin et Blake, 1991), mesure de la fluorescence chlorophyllienne (Nyström *et al.*, 2002), variation des teneurs en N et P des plantes sous l'effet des toxiques étudiés (Kähkönen et Kairesalo, 1998), teneur en chlorophylle *a* ou/et *b* des feuilles (Hanson *et al.*, 2002, 2003 ; Wendt-Rasch *et al.*, 2003 ; Feiler *et al.*, 2004), contenu en carténoïdes (Hanson *et al.*, 2002, 2003), contenu en citrate des plantes (Hanson *et al.*, 2002, 2003). La mesure des teneurs en polluants des plantes peut également être réalisée (linuron dans *M. spicatum* pour Crum *et al.*, 1998).

Nous avons pour notre part mesuré à une fréquence de 2 à 3 semaines la longueur totale des tiges (tige principale et pousses), le nombre d'entre-nœuds, le nombre de pousses nouvelles, et la biomasse en fin d'essai.

Les résultats pour *Elodea canadensis* et *Myriophyllum spicatum* sont synthétisés sous la forme de taux de croissance (à partir d'ajustements linéaire ou exponentiel selon les cas) au **tableau A4-7 en annexe 4**. *E. canadensis* présente quasiment toujours une croissance linéaire, qui peut cependant être forte, comme dans le 2ème essai Solvay (2 à 4 entre-

noeuds/jour correspondant à 1.5-2 cm/jour), mais elle finit en général par décliner après deux mois (les tiges se cassent, la croissance est ralentie). Dans un cas (essai Solvay en gravières pilotes), la croissance a été exponentielle dans le sédiment traité, peut-être en raison des quantités de phosphore relargué. Les variations observées d'un essai à l'autre peuvent évidemment être dues aux conditions qui diffèrent (notamment type d'eau) mais sont également imputables au succès de reprise des boutures implantées dans les microcosmes. Ces boutures sont réalisées à partir de plantes prélevées *in situ* puis acclimatées (quelques jours à quelques semaines) dans des aquariums, l'état initial des plantes et une maîtrise imparfaite des cultures pèsent lourdement sur la capacité de reprise des plantes. La variabilité intra-essai (donc inter-plantes) pour cette espèce reste assez élevée (coefficients de variation > 20% dans 8 cas sur 10), en partie pour les raisons qui viennent d'être exposées. Il semble que la variabilité soit un peu plus faible avec le paramètre "entre-nœuds", qui, comme le nombre de frondes pour les lentilles d'eau, reste cependant une variable discrète donc biaisée de la croissance.

Le seul essai où nous avons utilisé *Myriophyllum spicatum* a permis de constater l'intérêt de cette plante : forte croissance (**figure 45**), capacité discriminante élevée vis-à-vis de sédiments différents (**figure 46**), enracinement rapide, bonne tenue dans le temps (très bon état des plantes observé à 2 mois). En revanche nous n'avons pas de recul sur sa sensibilité aux toxiques puisque, dans l'essai réalisé, c'est dans le sédiment le plus contaminé qu'elle s'est le plus développée, alors que sa croissance a été la plus faible dans le sédiment témoin (Aiguebelette). Ne disposant que d'un spécimen par microcosme, nous n'avons pas pu apprécier la variabilité des paramètres de croissance pour cette espèce.

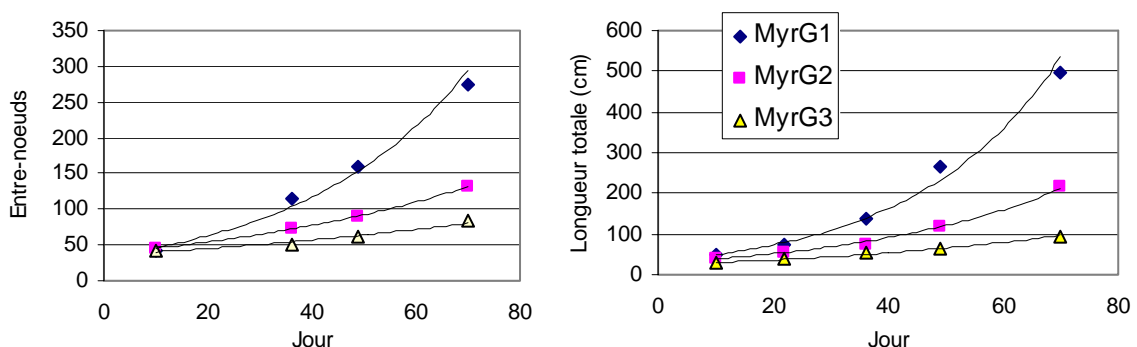


Figure 45. Croissance exponentielle de *Myriophyllum spicatum* dans l'essai en gravières pilotes (0 : jour de contamination ; G3 : sédiment témoin ; G1 : sédiment contaminé ; G2 : sédiment traité)

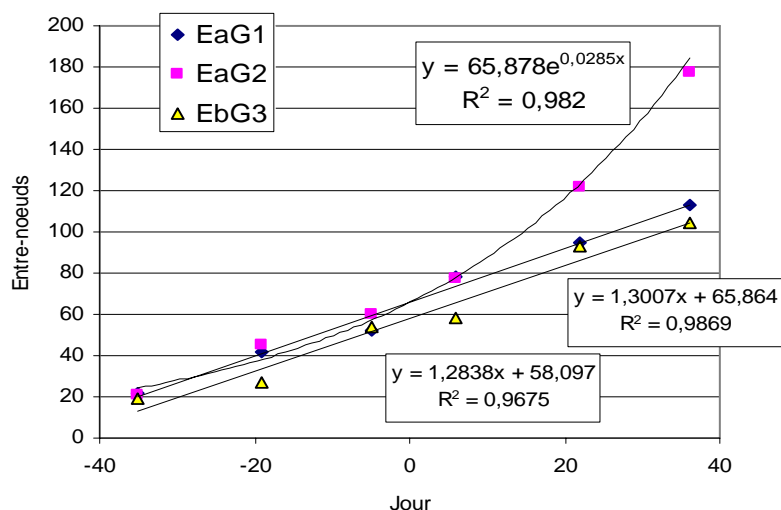


Figure 46. Exemples de croissance linéaire et exponentielle d'*Elodea canadensis* dans l'essai en gravières pilotes (0 : jour de contamination ; G3 : sédiment témoin ; G1 : sédiment contaminé ; G2 : sédiment traité)

2.4.3.4.2.5. Mollusques gastéropodes pulmonés

Nous avons incorporé les mollusques gastéropodes pulmonés *Lymnaea stagnalis* et *Physa acuta* (**figure 47**) dans les essais en microcosmes 100 et 180 L. Le premier provenait d'un élevage de l'Université Lyon 1 (Arnaud Elger) à partir d'individus récupérés dans la zone de confluence Ain-Rhône, le second des mares artificielles de l'Université de Savoie (Pr Gérard Blake). *Lymnaea stagnalis* a également été utilisé en microcosmes 2 L pour l'étude des effets génotoxiques de sédiments contaminés (Clément *et al.*, 2004).



Figure 47. Mollusques gastéropodes pulmonés *Lymnaea stagnalis* (à gauche) et *Physa acuta* (à droite) utilisés en microcosmes 100 et 180 L.

Les gastéropodes pulmonés constituent un groupe important de macroinvertébrés en biomasse (Gomot, 1998). Ils représentent une composante significative du régime alimentaire des poissons (Lodge *et al.*, 1986, in Gomot 1998). Ce sont également des brouteurs efficaces du

périphyton (Brönmark, 1989, in Gomot 1998) qui ont par cette activité un effet positif sur la croissance des macrophytes (Brönmark, 1985, in Gomot 1998), bien que certaines espèces comme *Lymnaea stagnalis* consomment et endommagent des macrophytes comme *Elodea canadensis* (Pieczynska, 2003). Leur présence dans l'ensemble du milieu aquatique, dans la colonne d'eau, à la surface du sédiment et des macrophytes, en fait de bons témoins d'exposition aux polluants. La facilité de leur élevage et leur reproduction élevée en font des organismes aisés à étudier.

Lymnaea sp. (*stagnalis*, *acuminata*, *palustris*) a fait l'objet de nombreux essais de toxicité :

- acétone (Bluzat *et al.*, 1979),
- insecticides comme le lindane, le fenthion et le carbaryl (Bluzat et Seuge, 1979 ; Seuge et Bluzat, 1979 ; Canton et Slooff, 1977 ; Tripathi et Singh, 2004),
- herbicides comme la 2,4-D et la 2,4,5-T (Seuge *et al.*, 1978) et l'atrazine (Russo et Lagadic, 2004),
- polluants organiques comme le DTDMAC (ditallow dimethyl ammonium chlorure, Roghair *et al.*, 1992), la 2,2'-dichlorobiphényl (Wilbrink *et al.*, 1992), les 2,2'- et 4,4'-dihalobiphényls (Wilbrink *et al.*, 1987),
- composés polaires narcotiques (Ramos *et al.*, 1998),
- polluants métalliques (Cd, Gomot, 1998 ; Hg, Cu, Pb, Sn, Salanki *et al.*, 2003),
- disrupteurs endocriniens (β -sitostérol, 4-nonylphénol, tributylétain (TBT), *t*-méthyltestostérone, Czech *et al.*, 2001).

Des études de bioaccumulation ont également été menées sur *L. stagnalis* (chlorobenzènes et chlorthion, Legierse *et al.*, 1998 ; métaux, Desouky *et al.*, 2003; composés polaires narcotiques, Ramos *et al.*, 1998).

Des limnées sont également intégrées dans des essais en mésocosmes extérieurs où elles sont étudiées libres ou encagées (*L. palustris*, *L. stagnalis*, *Physa fontinalis* pour Caquet *et al.*, 1996), mais également en microcosmes de laboratoire (*L. stagnalis* et *Physella acuta* pour Van den Brink *et al.*, 2000; *Lymnaea peregra* pour Sanchez et Tarazona, 2002). Certaines études en mésocosmes extérieurs font intervenir aux côtés de limnées et de physes de nombreuses espèces de mollusques gastéropodes (Cuppen *et al.*, 2002).

Les espèces du genre *Physa* (e.g. *Physa acuta*, *Physa fontinalis*) ont été moins souvent utilisées en écotoxicologie. On peut noter les travaux de Kefford et Nugegoga (2005) sur l'effet de la salinité sur la croissance et la reproduction de *P. acuta*, de Liwarska-Bizukojc *et al.* (2005) sur l'effet de détergents ioniques et anioniques sur la survie à 24 h de *P. acuta*, qui montrent une sensibilité à ces composés plus grande que celle du micro-crustacé *Artemia*

salina, de Leung *et al.* (2004) sur les effets du TBT sur le développement et le taux de croissance de *P. fontinalis*.

Les mesures généralement réalisées portent sur la survie (Ramos *et al.*, 1998 ; Sanchez et Tarazona, 2002), la reproduction (nombre de masses, nombre d'œufs, Gomot 1998 ; Czech *et al.*, 2001 ; Sanchez et Tarazona, 2002; Tripathi et Singh, 2004 ; Kefford et Nugegoga, 2005), la croissance (Czech *et al.*, 2001 ; Kefford et Nugegoga, 2005), l'éclosion (Czech *et al.*, 2001 ; Sanchez et Tarazona, 2002 ; Tripathi et Singh, 2004), et le développement des embryons (Gomot, 1998). Des mesures des contaminants bioaccumulés et de la teneur en lipides sont également effectuées (Ramos *et al.*, 1998). La locomotion de *L. stagnalis* est étudiée par Salanki *et al.*, 2003. Les limnées se prêtent bien aux études biochimiques telles que celles menées par Russo et Lagadic (1994) (suivi de la densité d'hémocytes de *L. stagnalis* pendant 28 jours, caractérisation de l'activité phagocytaire des hémocytes envers *Escherichia coli* et détermination de la production d'oxy-radicaux associée à la phagocytose), Tripathi et Singh (2004) (teneurs en glycogène, pyruvate, lactate, protéines, acides aminés) et activités enzymatiques (lactate déshydrogénase, succinate déshydrogénase, cytochrome oxydase, protéase, aminotransaminase, acétylcholine estérase, phosphatase), ainsi qu'aux observations histopathologiques (Czech *et al.*, 2001).

En microcosmes et mésocosmes on mesure l'abondance des gastéropodes (Caquet *et al.*, 1996 ; Van den Brink *et al.*, 2000 ; Sanchez et Tarazona, 2002 ; Cuppen *et al.*, 2002), la survie des adultes (Sanchez et Tarazona, 2002), le nombre de masses et d'œufs (Sanchez et Tarazona, 2002), le taux d'éclosion (Sanchez et Tarazona, 2002).

Dans un essai en microcosme 2 L nous avons mesuré les dommages à l'ADN évalués au moyen de l'essai comètes sur le gastéropode pulmoné *Lymnaea stagnalis* (Clément *et al.*, 2004). Les gastéropodes ont été testés dans les mêmes conditions mais séparément des autres espèces compte tenu des perturbations engendrées par ces organismes (excréta) et de la nécessité de les nourrir en propre (laitue).

Dans les essais en microcosmes 100 et 180 L réalisés au L.S.E. nous avons évalué la survie (*L. stagnalis*), la croissance par mesure de la taille de la coquille (*L. stagnalis*) et du poids sec en fin d'essai (*L. stagnalis* et *P. acuta*), le développement de population (*P. acuta*), la reproduction (nombres de masses, nombres d'œufs (*L. stagnalis*), la consommation de laitue (*L. stagnalis*). Faute de disponibilité de mon collègue Alain Devaux, il n'a pas été possible de mesurer les dommages à l'ADN des limnées, ce qu'il est très probablement possible de faire dans les conditions des microcosmes 100 et 180 L compte tenu des bons résultats obtenus en 2 L (Clément *et al.*, 2004).

Une dizaine d'individus de *L. stagnalis* étaient introduits dans un compartiment isolé du reste du microcosme de façon à éviter la consommation des lentilles et des plantes par cette espèce vorace qui consomme les macrophytes (Elger et Barat-Segretain, 2002 ; Pieczynska, 2003), et nourris avec de la laitue apportée tous les deux jours. La compartimentation par une paroi constituée de moustiquaire permettait le passage de l'eau, des algues et du zooplancton (**figure 48**). Les limnées étaient introduites jeunes (longueur de coquille 16 mm environ), puis elles commençaient à se reproduire quand elles atteignaient 25 mm, correspondant à des individus âgés de 56 à 63 jours (Elger et Barat-Segretain, 2002). Les pontes étaient collectées tous les deux jours pour étude de la reproduction. Une dizaine de *Physa acuta* étaient introduits libres dans les microcosmes, où ils consommaient le périphyton, sans porter atteinte à l'intégrité des lentilles d'eau et des macrophytes.

Les résultats sont synthétisés au **tableau A4-8 en annexe 4**. En dehors de quelques cas où nous avons rencontré des problèmes au niveau de l'élevage, la survie de *L. stagnalis* en microcosmes témoins est en général supérieure à 80%. Si les percolats de MIOM peuvent affecter la survie et l'activité d'ingestion de ce mollusque (2ème essai MIOM, **figure 49**), les sédiments contaminés étudiés n'ont pas eu d'influence sur ce critère.



Figure 48. Compartiment Limnées en pilote de gravière (la séparation se fait au moyen d'une moustiquaire) (photo B. Clément)

La croissance de la coquille de *L. stagnalis* peut être élevée (jusqu'à 0.4 mm/jour), mais là également non affectée par la contamination du sédiment. La reproduction est également élevée (de 0.12 à 0.35 ponte/individu/jour, et 4 à 21 œufs/individu/jour, soit des valeurs comparables à ce qu'on trouve dans la littérature (Gomot, 1998 ; Czech *et al.*, 2001)), et sensible à la contamination des sédiments (essai en pilote de gravières, **figure 50**). Nous pouvons en conclure que les conditions obtenues en microcosmes 100 et 180 L sont

favorables à l'étude de *L. stagnalis*, sous réserve de disposer au départ d'individus en bon état physiologique, donc d'un élevage satisfaisant.

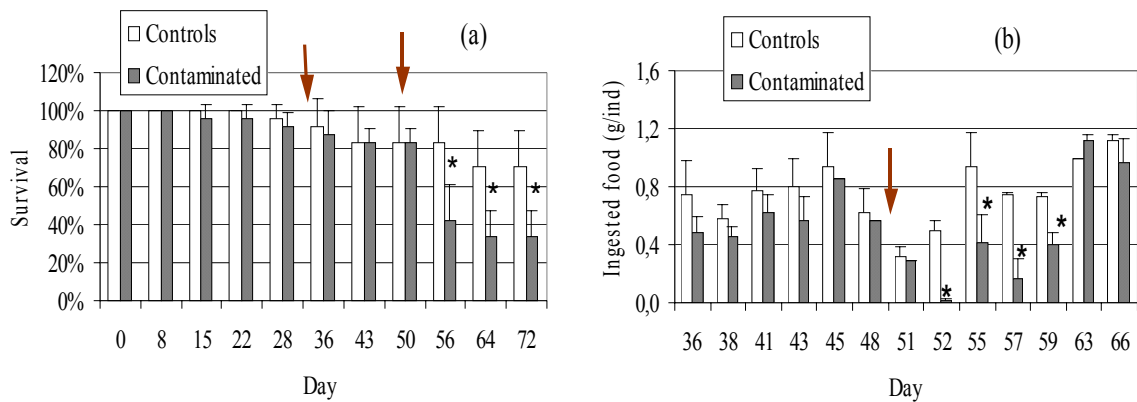


Figure 49. Effet de percolats de MIOM sur la survie (à gauche) et l'activité d'ingestion (à droite) de *Lymnaea stagnalis* au cours d'un essai en microcosmes 100 L (Clément *et al.*, 2005a) (flèches : apport de percolat ; * effet significatif)

L'étude des réponses de *Physa acuta* aux contaminations s'est bornée au suivi de la population qui s'est développée, par dénombrement par classes de taille (longueur de coquille < 5 mm, entre 5 et 10 mm, > 10 mm et < 15 mm). Le **tableau A4-9 en annexe 4** présente une synthèse des principaux résultats. Partant de 10 individus, on arrive à 500 (**figure 51**) voire 1200 individus en 90 jours.

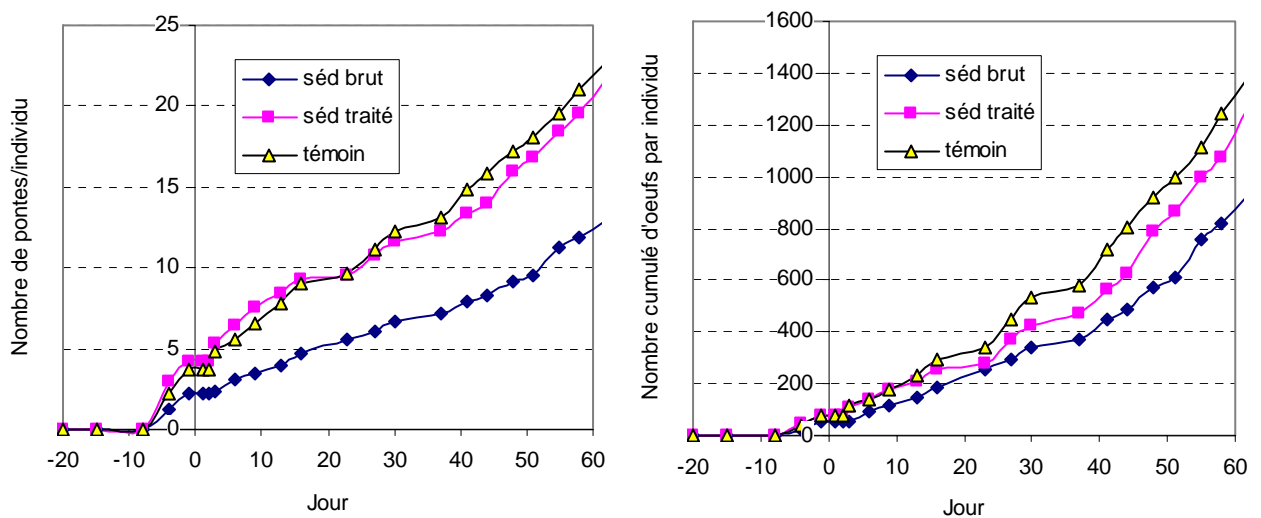


Figure 50. Reproduction (nombres cumulés de pontes et d'oeufs) de *Lymnaea stagnalis* lors de l'essai en pilote de gravières 180 L sur sédiments brut et traité (apport des sédiments à J0)

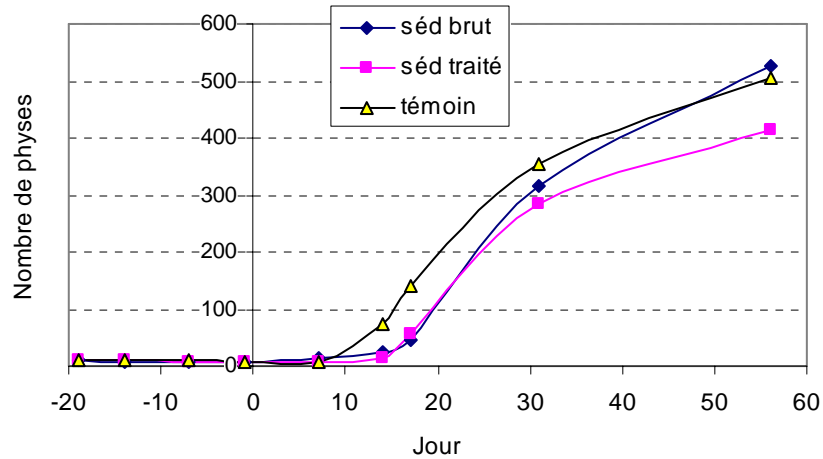


Figure 51. Croissance de la population de *Physa acuta* lors de l'essai en pilote de gravières 180 L sur sédiments brut et traité (apport des sédiments à J0)

2.4.3.5. Taille et géométrie des systèmes

Le choix de la taille du système est essentiel car il conditionne de nombreux autres paramètres. La petite taille des microcosmes implique que tous les processus biologiques et physiques présents dans les écosystèmes naturels ne sont pas représentés. L'échelle réduite du système présente des inconvénients majeurs :

- la faible profondeur a une influence sur le cycle de la matière et la taux de croissance du phytoplancton, ne permet pas la migration du zooplancton, et conduit à l'absence de stratification thermique et biochimique,
- la difficulté d'inclure des niveaux trophiques supérieurs (poissons notamment),
- des effets de bords et de fond (Dudzic et *al.*, 1979).

Les volumes choisis pour les divers essais en microcosmes présentés dans ce travail (2, 100 et 200 L) n'ont pas permis de s'affranchir de ces contraintes propres à l'approche expérimentale. Un volume de 2 L a été choisi dans un premier temps en se basant sur les systèmes de laboratoire multi-spécifiques de plus petite taille existant dans la littérature (Taub, 1969 ; Taub *et al.*, 1981 ; Taub, 1989a,b ; Taub *et al.*, 1986, 1991 ; Stay *et al.*, 1989 ; Larsen *et al.*, 1986 ; Ray et Mallick, 1993 ; Landis *et al.*, 1993) ou déjà expérimentés à l'Université de Savoie (Merlin et Blake, 1991 ; Merlin *et al.*, 1992 ; Thiébaud *et al.*, 1994). Ce volume de 2 L a permis de reconstituer un système pluri-spécifique contenant des producteurs primaires, des invertébrés pélagiques et des invertébrés benthiques capables de se développer sur un mois. C'est également un volume qui permet de travailler à un certain niveau de réplication puisqu'un essai en microcosmes de 2 L peut couramment être mené avec une quarantaine de

systèmes, ce qui a permis de disposer dans tous les cas d'au moins 3 réplicats pour tous les paramètres suivis au cours du temps, et jusqu'à 12 réplicats pour certains paramètres en début d'essai (pH, teneur en O₂ dissous, conductivité de la colonne d'eau, survie des daphnies, ...). Le choix d'un volume plus petit de 1 L n'a pas été retenu car il ne permet pas d'augmenter le niveau de réplication à moyens humains identiques (le temps de manipulation augmente considérablement lorsqu'on multiplie les systèmes expérimentaux) et conduit à des volumes d'échantillons trop faibles.

Le passage à 100 L a permis, comme expliqué plus haut (*cf Introduction*), d'augmenter la complexité des microcosmes par la possibilité d'ajouter de nouvelles espèces (plantes enracinées, mollusques) et d'allonger la durée des essais (de 30 jours à 3 mois). Ce volume plus grand a pour corollaire une difficulté d'échantillonnage accrue et la nécessité de recourir à des systèmes de cages et de compartiments. Nous reviendrons sur ce point dans la partie consacrée aux travaux réalisés en microcosmes de 100 L, et montrerons les limites de cette approche. Enfin, la taille des systèmes ne permet pas, faute de place et de moyens humains, de disposer d'un grand nombre de réplicats. Nous n'avons pu mettre en place que 6 microcosmes de 100 L, soit au maximum 6 réplicats jusqu'à la contamination, puis 2 à 3 réplicats par traitement.

Le passage à un volume de 180 L n'apporte pas de changements sensibles par rapport à 100 L, si ce n'est qu'on dispose de place accrue pour les manipulations et l'introduction de pièges, cages et compartiments. En pratique, le choix de ce volume n'a pas été guidé par de telles considérations, mais, s'agissant d'une étude ponctuelle très récente, a résulté plutôt du choix de la taille du système expérimental destiné à simuler le fonctionnement d'une gravière. Ainsi, il fallait disposer d'un massif de tout-venant suffisant autour d'un bassin représentant la gravière proprement dite, ce qui nous a conduit à adopter un volume global de 1.15 m³ permettant de ménager un bassin en eau de 180 L environ. Une des conséquences de ces choix expérimentaux est, dans un espace de travail toujours fini, la réduction du nombre de réplicats, passant de 3 en phase de pré-contamination (avant introduction des sédiments à étudier) à 1 en phase de post-contamination (après ajout des matériaux).

2.5. Application de l'outil « microcosme » à l'évaluation des risques écotoxicologiques

2.5.1. Etude de la biodisponibilité d'hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAPs)

2.5.1.1. Problématique et travaux réalisés

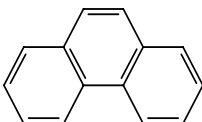
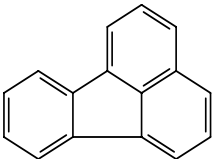
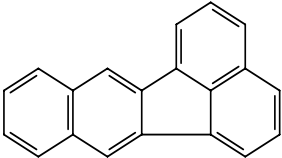
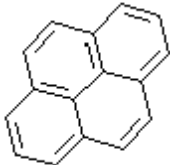
La biodisponibilité d'un polluant est définie comme sa capacité de transfert du milieu environnant (eaux et sédiments) aux organismes. Elle est un des facteurs-clés contrôlant sa bioaccumulation et sa toxicité. La connaissance de la fraction biodisponible d'un composé est donc fondamentale pour l'évaluation des risques environnementaux et notamment pour l'étude des effets sur les organismes vivants. Nous avons initié ces travaux sur ce thème au laboratoire TEPE par l'étude de la toxicité d'un mélange de trois HAPs (phénanthrène, fluoranthène et benzo(k)fluoranthène) dans le cadre d'un programme PNETOX 1998-2001 (Verrhiest, 2001 ; Verrhiest *et al.* 2000, 2001, 2002a, 2002b). Le but de ce programme, qui réunissait plusieurs laboratoires de recherche (TEPE de l'Université de Savoie, CEMAGREF de Lyon, INERIS, IFREMER), était de contribuer au développement d'une démarche d'évaluation des dangers de sédiments d'eau douce contaminés par des HAPs *via* des approfondissements méthodologiques et une meilleure connaissance du devenir et des effets des HAPs dans les écosystèmes aquatiques. Le choix des HAPs était motivé par le fait que ce sont :

- des contaminants organiques omniprésents dans l'Environnement (**tableau A6 en annexe 6**), issus de la combustion incomplète (origine pyrolytique) ou de la lente maturation de la matière organique (hydrocarbures pétroliers), et émis majoritairement par l'activité anthropique (industries, transports),
- des composés toxiques (**tableaux A7-1 et A7-2 en annexe 7**), ou/et mutagènes et cancérigènes,
- des composés hydrophobes (**tableau 34**) qui, après leur introduction dans la colonne d'eau, deviennent rapidement associés aux matières colloïdales et aux matières en suspension, et rejoignent ainsi le sédiment, où leur effets vont dépendre de leur biodisponibilité et de leur devenir, en liaison avec les propriétés physico-chimiques et microbiologiques du sédiment et de l'eau interstitielle.

Des essais en microcosmes 2 L (28 jours) ont été menés sur différents types de sédiments (artificiel et naturels) dopés avec un mélange d'HAPs (fluoranthène, phénanthrène, benzo(k)fluoranthène). Les effets ont été évalués sur les organismes supérieurs mais aussi sur le compartiment bactérien du sédiment, sur lequel des mesures d'activités exo-enzymatiques

impliquées dans les cycles de l'azote (leucine-aminopeptidase) et du carbone (β -glucosidase), et de densité bactérienne (comptage direct des bactéries par épifluorescence ou des Unités Formant Colonie après étalement sur gélose) ont été réalisées. Le devenir et les effets des HAPs ont été analysés en fonction des caractéristiques des sédiments, notamment teneur en carbone organique et type de sédiment (sédiment artificiel conditionné ou non, sédiment naturel).

Tableau 34. Propriétés physico-chimiques phénanthrène, du fluoranthène, du benzo(k)fluoranthène, et du pyrène (d'après Verrhiest *et al.* (2001) complété par les données sur le pyrène)

HAP	Structure	Hydrosolubilité ($\mu\text{g/L}$) à 25°C	log Kow	Photosensibilité
Phénanthrène $\text{C}_{14}\text{H}_{10}$		1000 (May, 1980)	4.29 (May, 1980)	Non absorbant (Newsted et Giesy, 1987) UV_C (Huovinen <i>et al.</i> , 2001)
Fluoranthène $\text{C}_{16}\text{H}_{10}$		206 (May, 1980)	5 (May, 1980)	UV_A , UV_B (Newsted et Giesy, 1987)
Benzo(k)fluoranthène $\text{C}_{20}\text{H}_{12}$		1.5 (Swartz <i>et al.</i> , 1995)	6.72 (Pelletier <i>et al.</i> , 1997)	UV_A , UV_B et visible (Pelletier <i>et al.</i> , 1997)
Pyrène $\text{C}_{16}\text{H}_{10}$		160	5.18	UV_A et surtout UV_B (Huovinen <i>et al.</i> , 2001)

L'étude de la biodisponibilité des HAPs a trouvé un prolongement au travers d'un programme relatif à l'impact du pyrène sur les organismes d'un écosystème aquatique (Godde, 2001 ; Cauzzi, 2002 ; Clément *et al.*, 2005b). Cette étude, effectuée dans le cadre du Programme Environnement Vie et Sociétés (Ecosystèmes et Environnement) du CNRS, a été réalisée en 2001-2002 (Jouanneau *et al.*, 2003). Elle a réuni quatre laboratoires : le laboratoire Biochimie et Biophysique des Systèmes Intégrés, Département de Biologie Moléculaire et Structurale,

UMR 5092, CEA-Grenoble (Yves Jouanneau), le laboratoire TEPE, ESIGEC - Université de Savoie (Gérard Blake), le laboratoire LCME, ESIGEC, Université de Savoie (Emmanuel Naffrechoux), et le L.S.E. (Bernard Clément). Dans une première phase (année 2001), la toxicité du pyrène a été évaluée au L.S.E. au moyen de tests monospécifiques (daphnies, algues, lentilles d'eau, chironomes, amphipodes), un protocole de mesure de bioaccumulation chez *D. magna* et *H. azteca* a été esquissé. Au cours de la deuxième année, des essais en microcosmes de 2 litres ont été menés en présence des deux sédiments lacustres. Comme dans le cas de l'étude du mélange d'HAPs par Verrhiest (2001) nous avons complété le suivi des organismes supérieurs du microcosme par des mesures d'activités enzymatiques et de densités bactériennes sur le compartiment bactérien des sédiments (Cauzzi, 2002).

2.5.1.2. Résultats et principaux enseignements

2.5.1.2.1. Difficultés propres aux expériences sur HAPs

Les propriétés des HAPs en font des substances difficiles à manipuler. En effet, leur grande affinité pour les phases particulaires et leur faible hydrosolubilité compliquent les essais lorsqu'il s'agit de doper des sédiments et d'étudier le devenir de ces substances dans des systèmes expérimentaux. Le dopage d'un sédiment doit être réalisé de telle sorte que les HAPs introduits se répartissent de façon homogène au sein de la matrice. Or, leur faible solubilité ne permet pas de réaliser le dopage par ajout d'une solution aqueuse. Il est donc nécessaire de passer par un solvant apolaire permettant de concentrer les HAPs mais pouvant s'avérer toxique pour les organismes. Dans tous les essais menés nous avons appliqué la méthode du "wall-coating" (Ditsworth *et al.*, 1990), qui consiste à répartir les HAPs sur la paroi d'un flacon en verre après ajout d'une solution acétonique et évaporation du solvant par rotation horizontale du flacon, puis ajout du sédiment humide qui s'enrichit en HAPs au contact du flacon en rotation. Au cours des essais menés sur le fluoranthène, le phénanthrène, le benzo(k)fluoranthène et leurs mélanges, nous avons toujours obtenu des rendements de dopage élevés (>80%) (Verrhiest *et al.*, 2000, 2001, 2002a). En revanche, les essais sur le pyrène ont fourni des rendements variables et nettement moins élevés, en moyenne (**tableau 35**). Cela peut être dû aux caractéristiques différentes des sédiments utilisés dans ces essais, le succès du dopage dépendant de la façon dont le contact sédiment/paroi du flacon se réalise. Chevron (2004) propose une autre méthode plus classique consistant à dissoudre le pyrène dans du DMSO (diméthylsulfoxyde) à la concentration voulue puis à mélanger ce solvant à la matrice organique. La faible toxicité de ce solvant vis-à-vis des microorganismes permet de

l'utiliser comme elle l'a fait dans des études de biodégradation. Il reste cependant à vérifier que le DMSO est sans effet sur les organismes supérieurs au contact du sédiment.

L'affinité des HAPs pour les surfaces solides peut également biaiser les résultats lorsqu'il s'agit d'étudier leurs effets en phase aqueuse. En effet, les HAPs dissous dans l'eau ont tendance à s'adsorber sur les parois des flacons, même en verre, nous avons pu en faire l'expérience (Clément *et al.*, 2005b), confirmant en cela les résultats d'autres expériences (McCarthy, 1983 ; Gauthier *et al.*, 1986 ; Pelletier *et al.*, 1997 ; Miller, 1999). Ainsi, une solution de 10 µg/L de pyrène ne contient plus que 4 µg/L de pyrène au bout de 30 jours et en l'absence d'éclairement pour écarter toute photodégradation. Le même problème se pose enfin pour la conservation des échantillons aqueux avant analyses. N'ayant pu, pour les premiers essais sur le pyrène, réaliser celles-ci par nous-mêmes, nous avons été contraints de les sous-traiter à un prestataire qui, du fait des délais observés, nous a rendu des résultats sous-estimant largement les valeurs réelles, comme nous avons pu le vérifier sur des solutions dopées de concentration connue. Nous recommandons vivement de maîtriser la partie analytique (extraction et analyses) lorsqu'on travaille sur des HAPs, sous peine de se trouver confronté aux mêmes problèmes.

Tableau 35. Concentrations nominales et mesurées de sédiments d'Aiguebelette dopés avec du pyrène, et rendements de dopage (p.f. : poids frais ; ss : test amphipode ; sp : essai de dopage ; m1 : 1er essai microcosmes ; m2 : 2ème essai microcosmes ; m3 : essai microcosmes sans organismes ; carbonate sédiment : sédiment "craie" ; peat sediment : sédiment "tourbe") (source : Clément *et al.* , 2005b)

µg/g p.f. nominal	Test	Sédiment "craie"		Sédiment "tourbe"	
		µg/g p.f. mesuré	taux de dopage, %	µg/g p.f. mesuré	taux de dopage, %
2	ss	4.9 ^a	243	1.5 ^a	73.5
20	ss	15.1 ^a	75.7	11.5 ^a	57.7
50	sp	31.6 ^b ± 7.9	63.2 ± 15.8	23.6 ^b ± 7.6	47.3 ± 15.2
50	m1	24.1 ^a	48.2	1.4 ^a	2.7
50	m2	33.6 ^a	67.2	3.9 ^a	7.8
50	m3	29.1 ^b	58.2	7.2 ^b	14.4
200	ss	175.3 ^a	87.7	194.6 ^a	97.3

^a concentrations mesurées à J0, après 7 jours sous l'eau

^b concentrations mesurées sur 3 échantillons immédiatement après dopage du sédiment

2.5.1.2.2. Toxicité en phase aqueuse vis-à-vis des organismes du microcosme exposés lors de tests monospécifiques et facteurs modulateurs

Les résultats des tests monospécifiques en phase aqueuse menés sur *Daphnia magna* et *Hyaella azteca* (**tableau 36**) confirment la toxicité aiguë des HAPs étudiés vis-à-vis de ces crustacés, sauf pour le benzo(k)fluoranthène, dont l'hydrosolubilité est très faible (1.5 µg/L).

Tableau 36. Toxicité en phase aqueuse des HAPs étudiés vis-à-vis de *Daphnia magna* et *Hyaella azteca* (d'après Verrhiest *et al.* (2001), Clément *et al.* (2000), et Clément *et al.* (2005b) ; lux : exposition à 1500 ou 2500 lux 16h/jour ; noir : obscurité ; lux+UV^a : post-exposition 2 h aux UV-A (365 nm, 247 µW/cm²) ; lux+UV^b : post-exposition 2 h aux UV-C (365 nm, 247 µW/cm²))

	24 h lux	48 h lux	48 h lux + UV	24 h noir	48 h noir	48 h noir + UV
<i>Daphnia magna</i>						
Phénanthrène	2500 lux : 678	2500 lux : 604	2500 lux : 273 ^a	854	731	725 ^a
Fluoranthène	1500 lux : 56	1500 lux : 36	1500 lux : 29 ^b	>200	201	80 ^b
	2500 lux : 63	2500 lux : 34	2500 lux : <18 ^a	>180	>180	20 ^a
Benzo(k)fluoranthène	<i>non toxique</i>					
	1500 lux : 139	1500 lux : 74				
Pyrène	2500 lux : 105	2500 lux : 48	/	167	68	/
	6000 lux : 161	6000 lux : 45				
<i>Hyaella azteca</i>						
	1500 lux : 80	1500 lux : 41				
Pyrène	2500 lux : 134	2500 lux : 41	/	82	63	/
	6000 lux : 77	6000 lux : 26				

L'absence de toxicité aiguë du benzo(k)fluoranthène est conforme aux résultats de Vindimian *et al.* (2000), qui montrent par ailleurs une absence de toxicité chronique (**tableau A7-2 en annexe 2**). Lorsque les organismes sont exposés dans l'obscurité, la toxicité à 24 et 48 h est observée à des teneurs proches de la solubilité. En revanche, en présence d'une lumière fluorescente classiquement utilisée au laboratoire, en particulier dans tous les essais en microcosmes, la toxicité est plus élevée, mais l'induction de toxicité est plus nette pour le fluoranthène que pour le phénanthrène, généralement reconnu comme non phototoxique (Newsted et Giesy, 1987 ; U.S. EPA, 1993a ; Swartz *et al.*, 1997 ; Boese *et al.*, 1998), et le pyrène. En fait, ce type de lumière (*coolwhite fluorescent*) contient une fraction d'UV

(Clément *et al.*, 2000) qui explique probablement l'augmentation de toxicité. Les mécanismes de phototoxicité sont rappelés sur la **figure 52**. C'est la photosensibilisation qui explique l'essentiel de la phototoxicité (Arfsten *et al.*, 1996). Par ailleurs, la phototoxicité du phénanthrène et du fluoranthène est confirmée par post-exposition 2 heures des organismes à un rayonnement UV pur (A ou C) (d'après la méthode de Wernersson et Dave, 1997), post-exposition qui n'a pu être réalisée avec le pyrène. Nos résultats renforcent l'hypothèse que, si de nombreux HAPs ne présentent pas une toxicité aiguë vis-à-vis des organismes aquatiques aux concentrations correspondant à leur gamme de solubilité (NRCC, 1983), la présence de lumière naturelle, comportant des rayonnements UV, constitue un facteur augmentant sensiblement le risque de toxicité (Lyons *et al.*, 2002), notamment pour les invertébrés pélagiques comme *Daphnia magna*, qui présente un phototactisme positif et se trouve donc davantage exposée en présence de lumière et d'HAPs dans la colonne d'eau (Wernersson *et al.*, 1999). L'absence de phototoxicité du benzo(k)fluoranthène vis-à-vis de *D. magna* (Verrhiest *et al.*, 2001) est probablement due au fait que la faible hydrosolubilité de cet HAP (1.5 µg/L) ne permet pas une bioaccumulation suffisante pour entraîner des effets, comme le suggèrent Boese *et al.* (1998) pour le benzo(b)fluoranthène (hydrosolubilité : 6 µg/L). Si le fluoranthène s'est avéré stable en phase aqueuse, sur 48 h en présence de lumière ou à l'obscurité (Clément *et al.*, 2000), le pyrène, dans les mêmes conditions, est beaucoup plus sensible à la lumière (30 à 44% de dégradation sur 24 h).

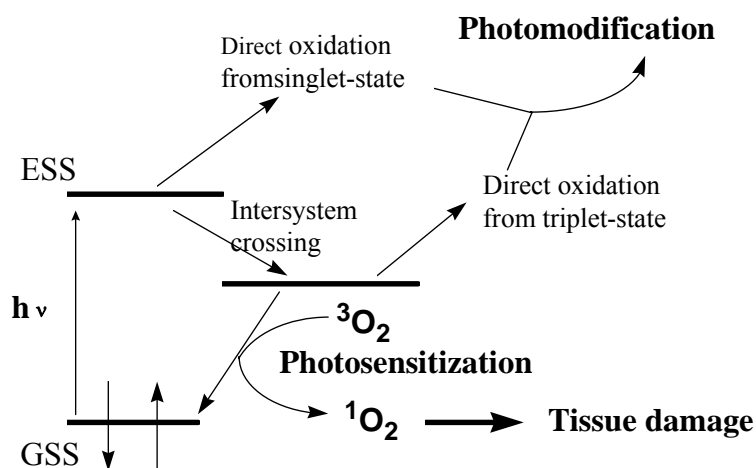


Figure 52. Mécanismes de la phototoxicité (d'après Krylov *et al.*, 1997)

Lorsque des algues sont ajoutées dans les béchers où sont exposées les daphnies, on observe une adsorption significative du fluoranthène sur les algues, sur 48 h, et une diminution importante de toxicité en présence de lumière. Ce phénomène d'atténuation de toxicité en présence d'algues n'est pas attribué à l'adsorption, qui reste limitée, nous pensons à un possible effet protecteur par la présence de pigments algaux de type β -carotène (Bennett *et al.*, 1986), ou plus simplement à une absorption d'une partie de la lumière par les algues, absorption qui n'a pas pu être quantifiée.

Les algues sont très sensibles au pyrène (Clément *et al.*, 2005b), avec une CE-72 h < 10 $\mu\text{g/L}$, elles sont également, selon Vindimian *et al.* (2000), plus sensibles au fluoranthène et au phénanthrène que *Daphnia magna*. Les conditions d'exposition à une lumière de forte intensité (6000 lux) pour assurer une croissance algale suffisante peuvent induire une phototoxicité significative expliquant cette sensibilité plus élevée. Pourtant, Warshawsky *et al.* (1995) n'ont obtenu qu'une faible inhibition de la croissance de *Selenastrum capricornutum*, l'espèce que nous avons également utilisée, exposée 4 jours à 400 μg pyrène/L sous une lumière fluorescente comparable à la nôtre. Selon Lei *et al.* (2001), *Selenastrum capricornutum* serait résistante au pyrène. Le pyrène stimule par ailleurs son activité glutathione-S-transférase (GST) lors d'expositions de plusieurs jours à une gamme de concentrations allant de 0.1 à 1 mg/L (Lei *et al.*, 2003). Cette activité enzymatique fait intervenir une enzyme, la GST, qui catalyse la réaction de conjugaison entre une bio-molécule endogène et le toxique, permettant ainsi de détoxifier le contaminant. Les auteurs rapprochent la stimulation de l'activité GST et la dégradation observée du pyrène pour suggérer que cette activité GST est responsable de la métabolisation du pyrène. Il est possible que les différences de conditions de culture ou/et d'essai entre les expériences de Lei *et al.* (2001, 2003) et les nôtres aient pu aboutir à des expressions de l'activité GST très différentes. Les mêmes auteurs ont trouvé sur une autre espèce de Chlorophycée, *Scenedesmus quadricauda*, une inhibition de la croissance et de la GST par le pyrène (Lei *et al.*, 2003). Le type de lumière, comportant plus ou moins d'UV, pourrait avoir une influence sur la cytotoxicité des HAPs vis-à-vis des algues, du fait de son importance dans les processus de biotransformation, mise en évidence avec le benzo(a)pyrène et *Selenastrum capricornutum* (Warshawsky *et al.*, 1995).

Contrairement aux algues, les lentilles d'eau ne sont pas ou sont peu sensibles aux HAPs. Nous l'avons constaté avec le pyrène, qui s'est avéré non toxique pour une exposition en test monospécifique 6 jours à 180 $\mu\text{g/L}$ (3500 lux 16 h/jour), une valeur proche de la limite de solubilité. Une absence de sensibilité a également été observée chez une autre espèce de lentilles d'eau, *Lemna gibba*, par divers auteurs (Huang *et al.*, 1995 ; Ren *et al.*, 1994). Peut-

être cette résistance a-t-elle également à voir avec une forte activité de métabolisation liée à l'activité GST.

2.5.1.2.3. Toxicité sur les organismes pélagiques en microcosmes

En microcosmes contenant des sédiments contaminés par des HAPs, les organismes de la colonne d'eau sont exposés aux HAPs présents dans celle-ci, sous forme dissoute, colloïdale et particulaire, mais aussi pour certains aux HAPs du sédiment avec lesquels ils peuvent être en contact durablement (algues ayant sédimenté) ou occasionnellement (daphnies venant consommer des particules en surface du sédiment). Les résultats obtenus sur des daphnies exposées en béchers contenant des sédiments dopés avec du fluoranthène ou du phénanthrène (Verrhiest *et al.*, 2001) montrent une toxicité accrue par rapport à des essais en phase aqueuse, en tenant compte dans les deux cas des teneurs mesurées dans l'eau surnageante. Cette augmentation de toxicité peut être mise sur le compte de voies d'exposition différentes, les daphnies au-dessus du sédiment pouvant être amenées au contact de celui-ci ou ingérer de fines particules remises en suspension. D'autres résultats vont dans le même sens. Lors d'essais en microcosmes sur un mélange de fluoranthène, phénanthrène et benzo(k)fluoranthène (Verrhiest, 2001) nous avons observé, pour un sédiment naturel (Neyrieux) dopé à 300 mg/kg, une forte toxicité après une semaine d'exposition de *Daphnia magna*, alors même que les teneurs mesurées dans l'eau surnageante après filtration à 0.8 µm ne dépassaient pas 1 µg/L. En revanche, dans des essais en microcosmes sur le pyrène (sédiments d'Aiguebelette « craie » et « tourbe » dopés à 50 mg/kg), la réponse de *Daphnia magna* était vraisemblablement liée aux teneurs mesurées dans les eaux surnageantes : effet significatif sur la survie au-dessus de la « craie » dans une eau contenant 30 ± 9 µg pyrène/L, absence d'effet au-dessus de la tourbe dans une eau contenant 5 ± 1 µg pyrène/L (Clément *et al.*, 2005b). Les mêmes correspondances ont été observées lors d'essais monospécifiques en petits béchers (Jouanneau *et al.*, 2003), où la survie des daphnies au-dessus du sédiment contaminé a été réduite d'environ 50% à des teneurs proches de la CE50.

Nous n'avons jamais pu évaluer les effets des HAPs en microcosmes sur les algues, pour diverses raisons : difficulté de prendre en compte l'ensemble des algues (en suspension ou sédimentées), influence du broutage ou/et croissance trop faible, et surtout variabilité élevée.

Les lentilles, nous l'avons vu ci-dessus, ne sont pas sensibles aux HAPs. De fait, nous n'avons en général pas observé d'effets en microcosmes, en présence de sédiments artificiels ou naturels dopés à des teneurs allant de 4 à 300 mg/kg. Ceci peut s'expliquer facilement par le fait que les teneurs en HAPs dans les eaux surnageantes ne pouvaient dépasser les limites

de solubilité de ces contaminants, valeurs pour lesquelles aucun effet sur *Lemna minor* n'a été observé dans nos travaux (tests monospécifiques) et dans la littérature. Cependant, une exception doit être relevée. Lors d'un essai en microcosmes sur un sédiment naturel (Neyrieux) dopé par un mélange d'HAPs à 300 mg/kg (phénanthrène, fluoranthène, et benzo(k)fluoranthène), une inhibition significative a été démontrée à partir de 19 jours (Verrhiest, 2001). Or, la somme des teneurs en HAPs des eaux surnageantes ne dépassant pas 1 µg/L au cours de l'essai, il est possible que l'inhibition de croissance observée soit due à un métabolite de dégradation des HAPs ou bien la manifestation d'un effet indirect. Verrhiest *et al.* (2002a) ont mis en évidence des effets sur le compartiment bactérien d'un sédiment naturel dopé à 300 mg/kg. Une telle perturbation a pu concerner le sédiment de Verrhiest (2001), avec pour conséquence possible des modifications des teneurs ou/et flux en substances nutritives indispensables à *Lemna minor*. Cette hypothèse n'a pu être étayée par des mesures précises.

2.5.1.2.4. Toxicité sur les organismes benthiques en tests monospécifiques et en microcosmes

Nous avons eu l'occasion de mesurer la sensibilité des espèces *Hyaella azteca* (amphipode crustacé) et *Chironomus riparius* (diptère) sur plusieurs HAPs (fluoranthène, phénanthrène, benzo(k)fluoranthène, pyrène) seuls ou en mélange (pour les trois premiers), dans différentes conditions expérimentales : tests monospécifiques, essais en microcosmes, sédiments artificiels et sédiments naturels. De l'ensemble des résultats nous dégagons un premier constat : sur des expositions ne dépassant pas un mois, les sédiments contaminés par des HAPs présentent une toxicité aiguë relativement faible puisque les premiers effets sur les organismes benthiques (mortalité et inhibition de croissance) sont observés pour des teneurs de plusieurs mg/kg (ou µg/g), supérieures à 30 mg/kg pour le mélange « phénanthrène + fluoranthène + benzo(k)fluoranthène », à partir de 20 mg/kg pour le pyrène. De telles teneurs sont celles de sédiments fortement contaminés (**tableau A-6 en annexe 6**). Ces résultats concordent avec les valeurs seuils fournies par McDonald *et al.* (2000) et Kalf *et al.* (1997), du moins si l'on considère les PEL (probable effect level) ou les MPC (maximum permissible concentration), seuils à partir desquels un effet est très probable (**tableau 37**). Il convient d'ailleurs de remarquer que ces seuils résultent d'un rapprochement de données de contamination et de données d'essais biologiques sur des organismes benthiques, les effets étant généralement imputables à l'ensemble des contaminants présents, en particulier la somme des HAPs, qui ont généralement des effets additifs (Munoz et Tarazona, 1993 ; Swartz

et al., 1995). Or on voit que c'est à partir de 23 mg/kg en HAPs totaux que des effets sont probables, valeur comparable aux valeurs pour lesquelles nous avons pu montrer, dans certains cas, des effets. Les résultats obtenus en microcosmes n'ont pas été différents de ceux obtenus en tests monospécifiques, malgré une exposition près de deux fois plus longue. D'autres critères d'effets sublétaux plus sensibles devraient être pris en compte avec ces substances connues pour être cancérogènes ou mutagènes, pour certaines.

Tableau 37. Seuils de toxicité en sédiment pour HAPs (TEC et PEC tirés de MacDonald *et al.*, 2000 ; MPC tirés de Kalf *et al.*, 1997)

Substance	TEC (µg/g ps)	PEC (µg/g ps)	MPC (µg/g ps)
anthracène	0.0572	0.845	0.12
fluorène	0.0774	0.536	/
naphtalène	0.176	0.561	0.14
phénanthrène	0.204	1.170	0.51
benzo(a)anthracène	0.108	1.050	0.36
benzo(a)pyrène	0.150	1.450	2.70
chrysène	0.166	1.290	10.7
dibenzo(a,h)anthracène	0.033	/	/
fluoranthène	0.423	2.230	2.60
benzo(k)fluoranthène	/	/	2.40
benzo(ghi)pérylène	/	/	7.50
indéno(1,2,3-cd)pyrène	/	/	5.90
pyrène	0.195	1.520	/
<i>HAP totaux</i>	<i>1.610</i>	<i>22.800</i>	<i>/</i>

La toxicité des mélanges d'HAPs est rarement étudiée, alors que les sédiments naturels sont tous multi-contaminés. Nous avons abordé ce volet avec l'étude de la toxicité du mélange de trois HAPs (phénanthrène + fluoranthène + benzo(k)fluoranthène, Verrhiest *et al.*, 2001), et pu montrer, pour ce cas particulier, des effets synergiques, ce qui contraste avec l'hypothèse d'additivité des effets généralement adoptée.

Nous avons également montré (Verrhiest, 2001 ; Verrhiest *et al.*, 2001) que les effets sont plus marqués en sédiments artificiels qu'en sédiments naturels, résultat que nous imputons à une partition entre phase particulaire et phase aqueuse (eau interstitielle) plus favorable, en sédiment artificiel, à la phase aqueuse, principale voie d'exposition des organismes étudiés (Di Toro *et al.*, 1991). Ces différences de partition ne sont pas uniquement dues à la quantité de matière organique des sédiments (teneur en COT, pour lequel les HAPs ont une grande affinité), mais font vraisemblablement intervenir également la qualité de la M.O. (Grathwohl, 1990; DePaolis et Kukkonen, 1997; Haitzer *et al.*, 1999). Plus largement, le type de sédiment (granulométrie, proportion d'argiles, de sables, de limons, ...) influence la toxicité des HAPs

(Landrum et Faust, 1994; Borglin *et al.*, 1996; Landrum *et al.*, 1997; Haitzer *et al.*, 1998). Dans les essais sur les deux sédiments naturels prélevés au Lac d'Aiguebelette (« craie » et « tourbe »), différant à la fois par la granulométrie, la composition, et surtout la quantité de matière organique, nous avons montré une moindre toxicité pour le sédiment « tourbe » mais des coefficients de partage entre fraction dissoute et fraction adsorbée sur le carbone organique (Koc) proches, ce qui nous a amenés à conclure que la quantité de matière organique était le facteur explicatif principal (Clément *et al.*, 2005b). La réponse de l'amphipode *Hyalloa azteca* au pyrène dans les deux types de sédiment peut s'expliquer essentiellement par les teneurs mesurées dans les eaux interstitielles.

La toxicité vis-à-vis des organismes benthiques est également influencée par le devenir des HAPs dans le sédiment. Après dopage d'un sédiment, un équilibre de partition des HAPs entre phases solide et liquide se met en place. Une étude menée sur ce point a montré qu'une équilibration de sédiments artificiels pendant 8 jours entraînait une moindre toxicité des HAPs (Verrhiest, 2001). Au-delà de cette durée, d'autres phénomènes peuvent contribuer à modifier la biodisponibilité des HAPs. En sédiments naturels dopés par un mélange d'HAPs (Verrhiest *et al.*, 2002a), nous avons mis en évidence sur 30 jours une dégradation des HAPs à l'exception du benzo(k)fluoranthène, HAP plus lourd et probablement plus récalcitrant. Nous attribuons cette dégradation aux bactéries endogènes des sédiments, dont l'activité β -glucosidase mesurée en parallèle a été stimulée. Dans les études sur le pyrène, nous avons pu également observer une diminution significative des teneurs sur 30 jours, diminution qui est cette fois supposée due à une extractabilité décroissante, bien que la biodégradation puisse intervenir en partie (Clément *et al.*, 2005b). Cette diminution d'extractabilité, appelée également vieillissement du sédiment (« ageing » en anglais, Guthrie *et al.*, 1999 ; Leppänen et Kukkonen, 2000 ; Alexander, 2000 ; Conrad *et al.*, 2002) serait due à la migration des HAPs à l'intérieur des pores des particules, migration qui rendrait leur extraction plus difficile et par la même occasion diminuerait leur biodisponibilité vis-à-vis des microorganismes (biodégradation) et des organismes supérieurs (toxicité). Ainsi, dans le cas d'essais sur sédiments dopés, se pose la question du conditionnement des sédiments pour tenir compte à la fois de l'atteinte d'un équilibre de partage entre les différentes phases, en faisant l'hypothèse qu'un tel équilibre existe, mais aussi de l'influence des phénomènes de biodégradation et de vieillissement sur la biodisponibilité des HAPs, de sorte à reproduire les conditions qui prévalent pour les sédiments naturels contaminés.

2.5.1.2.5. Bioaccumulation des HAPs au cours des essais

En parallèle au suivi des effets sur *Daphnia magna*, nous avons pu mesurer la bioaccumulation par cet organisme du fluoranthène (Clément *et al.*, 2000) et du pyrène (Jouanneau *et al.*, 2003), en tests monospécifiques (fluoranthène et pyrène) et en microcosmes (pyrène). Dans le cas des études sur le pyrène, des mesures ont également été réalisées sur d'autres organismes benthiques. La méthode employée a consisté en une étape d'extraction à l'acétone suivie d'une analyse spectrofluorimétrique permettant d'identifier le spectre de l'HAP et de quantifier la dose accumulée. Le fait de travailler à chaque fois sur un seul HAP a permis d'utiliser cette méthode simple, sans passer par une étape de séparation des composés par chromatographie.

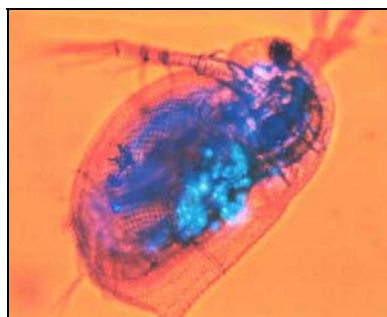


Figure 53. Bioaccumulation du fluoranthène par *Daphnia magna*, visualisée au microscope à épifluorescence (photo B. Clément)

En essais monospécifiques nous montrons une bioaccumulation significative du fluoranthène et du pyrène, directement corrélée à la teneur en HAP de l'eau. Nous trouvons des facteurs de bioconcentration de 1000 L/kg (poids frais) pour le fluoranthène et de 1986 ± 445 L/kg (poids frais) pour le pyrène, cette dernière valeur étant proche des valeurs trouvées dans la littérature (1900 à 2000 L/kg pour Nikkilä et Kukkonen (2001) sur *D. magna*, 1700 à 3500 L/kg pour Akkanen *et al.* (2001) sur *D. magna* dans des eaux de rivière de COD variant de 0 à 18 mg C/L et dopées à 1 µg pyrène/L, 2702 L/kg pour Southworth *et al.* (1978) sur *Daphnia pulex*, valeurs exprimées dans tous les cas sur la base du poids frais). La confrontation des données de bioaccumulation et d'effet montre une bonne corrélation entre les deux (**figure 54**). Ceci permet de soutenir l'hypothèse d'effets narcotiques qui se manifestent à partir d'une certaine accumulation dans les tissus, la narcose résultant de modifications et de transformations physiques de la membrane phospholipidique par adsorption d'un composé hydrophobe. Des perturbations des fonctions membranaires apparaissent lorsque la quantité de composé

adsorbée est suffisante (Driscoll *et al.*, 1997). La narcose aiguë est donc fonction de la quantité d'HAP bioaccumulée par l'organisme. Selon Landrum *et al.* (1994) et Driscoll *et al.* (1997), on obtient 50% d'effet, pour divers organismes (amphipode *Diporeia* par exemple) exposés à des sédiments dopés en HAP pour des doses internes voisines de 6 $\mu\text{mol/g}$ (poids frais d'organisme). Dans les essais sur le fluoranthène mais aussi sur le pyrène nous avons obtenu 50% d'effet autour de 0.66 - 0.7 $\mu\text{mol/g}$ (poids frais), ce qui est cohérent avec cette théorie, bien que nous trouvions une dose 10 fois inférieure, mais sur des micro-crustacés. En revanche, lors d'essais en sédiment "craie" (Aiguebelette) dopé au pyrène sur l'amphipode *Hyaella azteca* (Jouanneau *et al.*, 2003), nous constatons que les doses entraînant des effets sont du même ordre de grandeur que la dose interne nécessaire pour entraîner 50% de mortalité chez *Diporeia* spp., soit 6 $\mu\text{mol/g}$ poids frais d'organisme. Dans le sédiment "tourbe" d'Aiguebelette, on a également un effet sur la croissance de *Hyaella azteca* pour une dose interne d'environ 13 $\mu\text{mol/g}$.

Lors des essais en microcosmes sur sédiments dopés au pyrène, nous avons pu suivre le pyrène accumulé par les daphnies introduites en début d'essai et par leur descendance. Les daphnies mères récupérées après 12 et 21 jours d'exposition en microcosmes contenaient vraisemblablement un composé dérivé du pyrène, comme le suggèrent les différences constatées entre les spectres d'émission de fluorescence (**figure 55**). Il est intéressant de souligner que les mesures sur les jeunes nés dans les microcosmes et exposés au maximum 3 jours dans les systèmes ont mis en évidence le même type de spectre, alors que des jeunes issus de nos élevages et introduits dans les systèmes puis exposés au maximum 3 jours présentaient une accumulation de pyrène non modifié. Ces observations suggèrent que le pyrène modifié accumulé par les mères est transmis aux embryons et se retrouve dans les jeunes libérés lors de la ponte. Comme pour les daphnies des microcosmes, les mesures de bioaccumulation sur amphipodes et larves de chironomes ont révélé des spectres modifiés du pyrène et voisins de ceux observés pour les daphnies. Pour tous ces organismes il n'a donc pas été possible de quantifier les doses de pyrène accumulées. Les modifications du spectre du pyrène suggèrent des processus de biotransformation, qui seraient ainsi possibles chez tous les organismes du microcosme, daphnies, chironomes et amphipodes. *C. riparius* est effectivement connu pour développer une importante activité de biotransformation du pyrène (Guerrero *et al.*, 2002), et les résultats de Gourlay *et al.* (2002) montrent que *Daphnia magna*, si elle a peu d'effet sur le fluoranthène, serait capable de biotransformer le pyrène et le benzo(a)pyrène. Ces auteurs ont montré, comme dans notre étude, un spectre différent du pyrène bioaccumulé (avec un décalage des pics et une augmentation du ratio entre pics), non

dû à un effet de matrice. Ils ont également mis en évidence, comme dans le cas du benzo(a)pyrène, une forte fluorescence de la phase récupérée dans l'eau et une moindre fluorescence de la phase dichlorométhane, ce qui tend à prouver que le produit dérivé du pyrène est plus polaire, donc bien le résultat d'une transformation biologique. Cette biotransformation du pyrène par *D. magna* est attestée par Akkanen et Kukkonen (2003), qui montrent l'implication de monooxygénases à cytochrome P450 dans cette voie d'élimination.

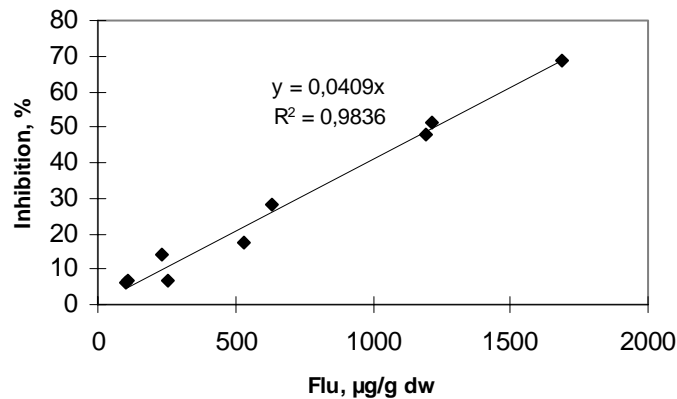


Figure 54. Relation entre la dose moyenne de *Daphnia magna* et l'inhibition moyenne de mobilité après 48 h d'exposition à l'obscurité (Clément *et al.*, 2000)

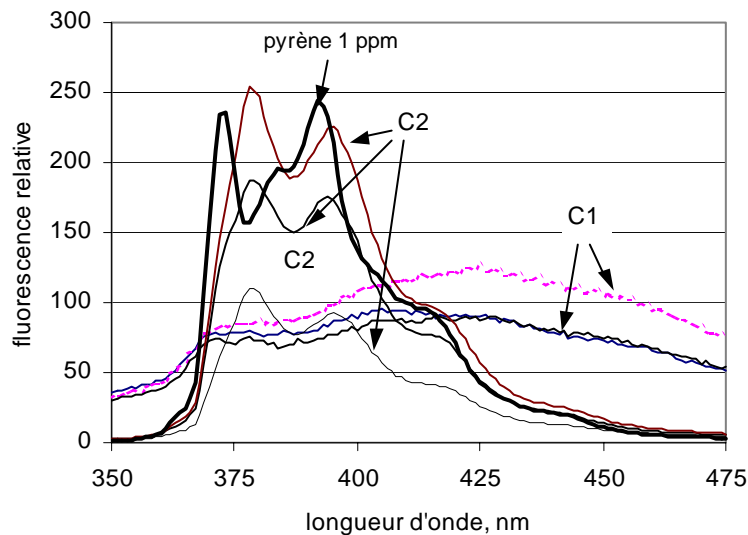


Figure 55. Spectres d'émission de fluorescence des extraits méthanoliques de daphnies mères exposées 12 jours au cours de l'essai en microcosmes n°2 (sédiments craie contaminés à 50 mg/kg) versus spectre du pyrène pur à 1 ppm dans du méthanol

2.5.1.2.6. Réponses du compartiment bactérien aux HAPs

Les microorganismes jouent un rôle fondamental dans la dynamique de l'environnement puisqu'ils interviennent dans les cycles biogéochimiques. Par eux transitent les flux de matière et d'énergie. Au sein des microcosmes, comme de tout écosystème, la perturbation des communautés microbiennes peut avoir un impact sur l'ensemble de la chaîne trophique et sur l'équilibre du milieu. Aussi nous est-il apparu important de prendre en compte le compartiment microbien des sédiments dans les essais en microcosmes. Au travers de paramètres écologiquement pertinents (densité bactérienne et activités exoenzymatiques), une partie de notre travail a consisté à évaluer les réponses des microorganismes indigènes des sédiments face à une contamination sédimentaire par des HAPs. Par ailleurs, la capacité des bactéries à biodégrader la matière organique ainsi que certains composés organiques, tels que les HAPs, influent sur la biodisponibilité des contaminants hydrophobes. C'est pourquoi nous avons choisi, outre le suivi de la densité bactérienne, de nous intéresser à certaines activités enzymatiques impliquées dans les processus de transformations de la matière organique, la β -glucosidase (cycle du carbone) et la leucine-aminopeptidase (cycle de l'azote). Nous avons également utilisé, dans des travaux préliminaires sur un sédiment artificiel dopé au fluoranthène (Verrhiest *et al.*, 2000), l'activité INT-réductase en nous basant sur le protocole de Merlin *et al.* (1995). Le fluoranthène n'a eu d'effet, même à 1000 mg/kg, sur aucun des paramètres suivis (densité bactérienne du sédiment et de l'eau surnageante, activités INT-réductase et β -glucosidase du sédiment et de l'eau surnageante). L'étude sur le mélange de trois HAPs (phénanthrène + fluoranthène + benzo(k)fluoranthène) a montré des effets à des teneurs élevées (300 mg/kg) sur les populations bactériennes d'un sédiment naturel (Ain) : diminution de la densité bactérienne des sédiments, inhibition partielle de l'activité leucine-aminopeptidase, mais stimulation de l'activité β -glucosidase, qu'il est tentant de mettre en parallèle à la forte dégradation du fluoranthène et du phénanthrène observée au cours du même essai (Verrhiest *et al.*, 2002a). Des essais ont également été menés avec le pyrène (Cauzzi, 2002 ; Jouanneau *et al.*, 2003), tout d'abord en conditions simples (sédiment dopé + eau ; densité bactérienne, activités β -glucosidase et leucine-aminopeptidase) puis en microcosmes (densité bactérienne et β -glucosidase). Sur la gamme 1, 10, 50, 100 et 200 mg/kg aucun effet significatif n'a été obtenu en test simple et en microcosmes.

En conclusion, les HAPs semblent n'exercer des effets sur le compartiment bactérien, du moins abordé au travers des quelques paramètres suivis dans ces travaux, que pour des concentrations très élevées rarement rencontrées dans l'environnement. En revanche, des

possibilités de dégradation du phénanthrène, du fluoranthène et du pyrène (Jouanneau *et al.*, 2003) ont été mises en évidence.

2.5.1.3. Discussion générale et synthèse sur l'étude en microcosmes de la toxicité des HAPs

Les essais en microcosmes menés sur des sédiments contaminés par des HAPs avaient pour objectif d'évaluer les risques pour les écosystèmes aquatiques lentiques liés à la présence de ces contaminants organiques ubiquistes dans ce compartiment sédiment. Par la possibilité de prendre en compte différents compartiments de ces écosystèmes ainsi que les relations existant entre les différentes populations représentées mais aussi entre ces populations et leur milieu, nous avons pu obtenir des résultats avec un certain niveau de réalisme.

Nous avons d'abord confirmé la possibilité de doper en HAPs des sédiments artificiels ou naturels non ou très peu contaminés initialement, mais attiré l'attention sur la nécessité de s'assurer du rendement de dopage et de la bonne répartition des HAPs au sein du sédiment, qui peuvent dépendre des propriétés physico-chimiques de celui-ci. Une fois le sédiment dopé, il est indispensable d'observer une période d'équilibration, que nous avons évaluée à au moins une semaine (Verrhiest, 2001), qui peut généralement aboutir à une moindre toxicité du fait de l'adsorption plus forte des HAPs sur la phase solide et qui correspond mieux aux situations les plus courantes dans l'environnement (sédiment déposé, non perturbé). Nous nous sommes également interrogés sur la possibilité de prolonger cette période d'équilibration pour tenir compte des phénomènes de vieillissement (migration des HAPs au sein des particules les rendant moins biodisponibles) et de biodégradation, dont nous avons montré qu'elle pouvait être significative pour certains HAPs en quelques semaines (Verrhiest *et al.*, 2002a ; Clément *et al.*, 2005b). A cet effet, nous pensons que l'utilisation de sédiments naturels, présentant une microflore plus apte à dégrader les HAPs et des caractéristiques physico-chimiques et minéralogiques mieux susceptibles de simuler le vieillissement, est très probablement préférable à l'utilisation de sédiments artificiels, qui présentent par ailleurs d'autres inconvénients. Ceux-ci sont en particulier liés à l'impossibilité de simuler de façon pertinente les propriétés physico-chimiques qui influent sur la partition des HAPs entre phases dissoute et particulaire (minérale et organique). L'étude comparative du devenir et des effets d'HAPs dans des sédiments artificiels et naturels a permis de montrer à diverses reprises des écarts notables entre ces deux types de sédiments, qui traduisent en général une surestimation des risques d'exposition et d'effets en sédiment artificiel (Verrhiest, 2001 ; Verrhiest *et al.*, 2001), non seulement pour les organismes benthiques mais également pour les organismes

pélagiques en contact direct avec le sédiment ou/et *via* la colonne d'eau. Cette surestimation est liée à la difficulté de représenter tous les sites d'adsorption potentiels, en particulier liés à une matière organique naturelle généralement complexe. Si nous préconisons d'abandonner le sédiment artificiel dans ce type de recherche, la question du choix du sédiment naturel modèle demeure entière, étant donnée l'extrême diversité des sédiments. Là encore, la distribution *a priori* large des propriétés physico-chimiques des sédiments peut conduire à des comportements très variables selon le sédiment choisi. Le choix devra donc être orienté en fonction d'un site ou d'une propriété particulière à privilégier.

D'autres modalités du protocole d'essai en microcosmes ont une influence significative sur le devenir et les effets des HAPs. Nous avons montré que l'éclairage choisi dans nos essais (lumière fluorescente classique de laboratoire) est de nature à favoriser la phototoxicité de certains HAPs (Clément *et al.*, 2000, 2005b). L'absorption d'UV par les HAPs gouverne les phénomènes de photosensibilisation et de phototransformation et varie selon le type de rayonnement (UVA et UVB), le choix d'un éclairage plus ou moins représentatif du spectre de la lumière solaire aura donc des conséquences sur les résultats observés (Wilcoxon *et al.*, 2003). Certains auteurs ont également montré au laboratoire que la pénétration des UV jusqu'au sédiment pouvait générer de la phototoxicité pour les organismes benthiques (Ankley *et al.*, 1994, 1995).

McDonald et Chapman (2002) s'interrogent cependant sur la pertinence écologique de la phototoxicité, largement étudiée au laboratoire mais selon eux rarement exprimée *in situ*. En effet, de nombreux paramètres doivent être pris en compte pour estimer la probabilité pour qu'un organisme ayant bioaccumulé des HAPs soit soumis à des rayonnements solaires actifs, puisque c'est la photosensibilisation qui explique l'essentiel de la phototoxicité. McDonald et Chapman (2002) montrent que de nombreux processus, *in situ*, permettent aux organismes d'éviter cette exposition (atténuation de la biodisponibilité par les matières organiques et particulaires, mécanismes de protection contre les UV chez certains organismes, enfouissement des organismes benthiques en profondeur, ombrage apporté par les plantes aquatiques, etc.), alors que certains paramètres expérimentaux conduisent à surestimer l'exposition (flacons en verre facilitant la pénétration de la lumière dans plusieurs directions, colonne d'eau de faible hauteur facilitant la pénétration des UV jusqu'au sédiment, sédiment de faible épaisseur, rayonnements utilisés d'intensité constante non représentatifs des variations observées dans la journée, eau saturée en oxygène favorisant la photosensibilisation, etc.). Dans des essais réalisés en présence de daphnies et d'algues, nous

avons pu montrer le rôle atténuateur de celles-ci sur la phototoxicité des HAPs vis-à-vis des daphnies.

L'utilisation de récipients en verre ne permet pas d'éviter l'adsorption des HAPs sur les parois, comme nous l'avons montré, phénomène qui, pour des teneurs en HAPs généralement faibles rencontrées dans la colonne d'eau, peut conduire à une sous-estimation des teneurs attendues (Clément *et al.*, 2005b). A l'inverse, l'utilisation de milieux synthétiques généralement exempts de matières organiques dissoutes conduit à surestimer l'exposition. Sur ce point, l'incorporation d'un sédiment permet de réduire ce biais par l'enrichissement de la colonne d'eau en MOD. Le sédiment apporte également des matières particulaires et colloïdales, celles-ci contribuant à augmenter l'exposition des organismes de la colonne d'eau par les HAPs qui y sont adsorbés (Baumard, 1997). Dans le même ordre d'idée, la présence de micro-algues modifie également l'exposition des daphnies et d'autres organismes consommateurs (amphipodes), mais nous n'avons pas eu l'occasion de préciser dans quel sens puisque les algues, si elles captent une partie des HAPs et réduisent ainsi la fraction dissoute, introduisent une voie d'exposition supplémentaire pour les organismes qui les consomment.

Si nous avons dans la plupart des cas étudié des situations de mono-contamination, nous avons pu également évaluer les effets de mélanges d'HAPs, situation plus proche de la réalité. Bien que l'hypothèse d'additivité des effets soit généralement admise, nous avons montré que des effets synergiques sont possibles (Verrhiest *et al.*, 2001). Il faudrait cependant aller plus loin en travaillant sur un mélange d'un plus grand nombre d'HAPs (par exemple les 16 HAPs prioritaires de l'USEPA), voire en intégrant d'autres types de polluants, comme les métaux par exemple.

Les essais en microcosmes permettent de diversifier les voies d'exposition des organismes, par exemple les daphnies présentes dans la colonne d'eau mais pouvant se trouver en contact avec des particules de sédiment. Deux études différentes n'ont pas fourni des résultats convergents : alors que les effets sur les daphnies étaient accrus par la présence de sédiment contaminé par des HAPs dans l'une (Verrhiest *et al.*, 2001), l'autre montrait des effets essentiellement reliés aux teneurs en pyrène dans la colonne d'eau. La nature différente des sédiments entre ces deux études et probablement d'autres paramètres peuvent expliquer cette absence de convergence. Des essais spécifiques devraient être mis en œuvre pour étudier ce point.

Les critères de toxicité étudiés ne révèlent pas une forte toxicité des HAPs vis-à-vis des organismes benthiques, même sur des expositions de l'ordre du mois. Ceci est généralement dû à une forte adsorption des HAPs sur les matières organiques particulaires et dissoutes des

sédiments, qui réduit significativement la biodisponibilité de ces substances et qui va en augmentant avec le temps (vieillessement). C'est en première approche rassurant de constater que les chironomes sont capables de se développer et d'émerger dans des sédiments pourtant fortement contaminés, et cela est corroboré par les résultats obtenus sur certains sédiments naturels également fortement contaminés en HAPs et en métaux lourds (*cf chapitre 2.5.4*). Nous n'avons pas de données sur les effets des HAPs sur la reproduction des amphipodes, du fait de la durée insuffisante des essais, déjà soulignée dans ce rapport (*cf 2.4.3.4.2.1*). Il serait intéressant de prendre en compte ce critère biologique par une exposition plus longue ou par l'exposition d'individus plus âgés en début d'essai. De même, une étude sur plusieurs générations de chironomes exposés aux HAPs permettrait d'évaluer les effets à long terme, en prenant en compte le nombre de larves écloses et leur capacité à effectuer leur cycle de vie. Les quelques mesures de bioaccumulation que nous avons réalisées dans les essais sur le pyrène et les résultats de la littérature incitent à persévérer dans cette voie, car la moindre toxicité des HAPs pourrait s'expliquer aussi par la capacité des organismes pélagiques (daphnies, algues) et benthiques (chironomes et amphipodes) à biotransformer les HAPs. Au vu des mesures réalisées sur le compartiment microbien, il semble que la présence d'HAPs à forte teneur ne perturbe pas significativement ce compartiment. C'est un résultat important puisque le fonctionnement de l'écosystème dépend en partie des activités biologiques du sédiment qui contribuent à recycler la matière organique et à renouveler les éléments minéraux nécessaires aux producteurs primaires.

Si nous avons pu étudier globalement le devenir des HAPs en microcosmes, nous n'avons pas eu l'occasion de préciser le rôle des organismes dans ce devenir et dans les effets qui en découlent, ce qui pourrait constituer une voie de recherche supplémentaire. L'activité de bioturbation des organismes benthiques peut contribuer à modifier la répartition des contaminants dans un sédiment et stimuler leur biodégradation par une meilleure oxygénation par exemple des couches superficielles. Etudiant le devenir du fluoranthène en présence du ver marin *Capitella*, Madsen *et al.* (1997) constatent que l'activité de bioturbation contribue à enfouir le fluoranthène, mais la perte totale de fluoranthène dans le sédiment est plus élevée en présence des vers, dont l'activité augmenterait le transfert du fluoranthène vers l'eau surnageante ou/et stimulerait la biodégradation de cet HAP. Quel est le rôle, sur ce plan, des chironomes et des amphipodes utilisés dans nos essais ? Contribuent-ils à une plus grande exposition des organismes pélagiques ou au contraire à réduire les risques pour ceux-ci ? De telles recherches sont évidemment assez lourdes puisqu'elles nécessitent la multiplication

d'essais en microcosmes dans lesquels seulement certaines populations sont présentes simultanément pour mettre en évidence les interactions décrites plus haut.

2.5.2. Etude de la toxicité de la 6PPD, une substance industrielle

2.5.2.1. Problématique et travaux réalisés

La 6PPD, une phénylène diamine (N-(1,3-diméthylbutyl)-N'phényl-p-phénylène diamine) utilisée comme anti-oxydant dans l'industrie du pneu, s'est retrouvée dans les sédiments d'un cours d'eau à des teneurs allant jusqu'à 330 mg/kg plusieurs mois après un rejet accidentel d'eaux d'extinction d'un incendie d'usine. Les essais menés en microcosmes devaient permettre d'étudier le devenir et les effets de cette substance instable et photodégradable sur laquelle on disposait de peu de données écotoxicologiques. Il s'agissait aussi et surtout d'apporter à l'industriel et aux gestionnaires des milieux aquatiques des éléments pour juger *a posteriori* de la dangerosité et du degré de rémanence de cette substance en vue d'expliquer les effets (ou l'absence d'effets) observé(e)s en relation avec les teneurs observées *in situ*. L'étude a été financée par l'industriel, les résultats ont fait l'objet d'un rapport confidentiel et n'ont pas été publiés.

Deux essais ont été réalisés, sur un sédiment artificiel puis sur un sédiment naturel dopés avec la substance à étudier. Compte tenu de la nature sableuse des sédiments des cours d'eau concernés, le sédiment artificiel était à dominante sableuse (90 % de sable + 5 % de kaolin + 5 % de matière organique). Le sédiment naturel a été prélevé dans le cours d'eau pollué, en amont du point de rejet (*cf* 24.3.3. *Sédiment* pour plus de détails sur la granulométrie).

2.5.2.2. Principaux résultats

Les résultats font apparaître des incertitudes sur le protocole de dopage, du fait des teneurs mesurées inférieures aux teneurs nominales (**tableau 38**). Ces teneurs ayant été mesurées au plus tôt après une semaine sous eau, il est également possible que les écarts constatés soient dus à l'instabilité de la substance ou/et aux incertitudes sur le protocole d'analyses, cette substance n'étant pas couramment analysée dans l'eau et les sédiments car non susceptible, en principe, de se retrouver dans le milieu aquatique. La présence de 6PPD dans la colonne d'eau, attestée par les dosages réalisés et l'absorbance à 270 nm due au composé organique, montre que la substance diffuse de façon continue à partir des sédiments, notamment à 300 mg/kg. L'étude du comportement de la 6PPD à la lumière du laboratoire (tubes fluorescents de type lumière du jour) montre une évolution du spectre et confirme la photodégradabilité du produit. La diffusion de la 6PPD à partir du sédiment naturel est moins importante qu'à partir

du sédiment artificiel, et les teneurs dans la colonne d'eau (**tableau 38**) diminuent de manière plus significative avec le sédiment naturel, celui-ci ayant vraisemblablement une plus grande capacité de piégeage de la 6PPD que le sédiment artificiel.

Les essais ont permis d'observer (**tableau 38**) des effets significatifs sur les organismes benthiques à des teneurs mesurées de quelques $\mu\text{g/g}$ en sédiment artificiel (survie et croissance de *Hyaella azteca*, croissance de *Chironomus riparius*), et à des teneurs mesurées supérieures à 100 $\mu\text{g/g}$ en sédiment naturel (survie et croissance de *Hyaella azteca*). Les cladocères (*Daphnia magna* et *Simocephalus vetulus*) sont quant à eux sensibles à une exposition de 4 jours à quelques $\mu\text{g/L}$ de 6PPD dans la colonne d'eau. Un essai de survie daphnies 48 h réalisé sur les eaux prélevées à J28 montre que leur toxicité aiguë est due à la phase particulaire puisqu'une filtration supprime les effets (teneur en 6PPD dissoute $< 1 \mu\text{g/L}$). Les algues ne sont pas sensibles à la 6PPD aux teneurs mesurées dans l'eau surnageante (40 $\mu\text{g/L}$ maximum), ce qui est corroboré par la CE50-96 h de 600 $\mu\text{g/L}$ pour *Pseudokirchneriella subcapitata* qui nous a été fournie par l'industriel (source : Bayer). Les lentilles d'eau ne montrent également aucune sensibilité (pas de données de la littérature). N'ayant pu analyser les éventuels produits de dégradation (les dosages de carbazole, produit connu de photodégradation, n'ont rien donné), il reste difficile de connaître l'exposition exacte à la 6PPD des organismes du microcosme. De nombreux organismes (daphnies, poissons, chironomes) sont, d'après les données connues, sensibles à des expositions n'excédant pas 96 h à des teneurs inférieures au mg/L . Nos résultats, montrant des effets pour des expositions de plusieurs jours à des teneurs dans l'eau surnageante de quelques $\mu\text{g/L}$ au maximum et à des teneurs dans l'eau interstitielle de quelques $\mu\text{g/L}$ à quelques dizaines de $\mu\text{g/L}$, confirment la toxicité élevée de cette substance. Compte tenu de l'approche microcosmes utilisée, nous avons adopté un facteur de sécurité de 10, ce qui nous a amené à proposer un seuil d'effet de quelques dizaines de $\mu\text{g/g}$ en sédiment naturel et de quelques centaines de ng/g dans l'eau.

Il serait intéressant d'approfondir ces premiers résultats par une étude plus détaillée de la toxicité de la 6PPD et de ses photo-produits en conditions naturelles, la question, à laquelle nous n'avons que partiellement répondu par le biais des essais réalisés dans l'urgence, étant celle du devenir de la 6PPD suite à un relargage accidentel dans un milieu aquatique.

Tableau 38. Synthèse du devenir et des effets de la 6PDD en microcosmes 2 L avec sédiment artificiel (essai n°1) ou sédiment naturel (essai n°2) (nm : non mesuré ; ^(a) : artefact dû à une récupération difficile des amphipodes à J7 ; ^(b) : pas de larves, émergences complètes ; nm : non mesuré ; séd : sédiment ; ES : eau surnageante ; EI : eau interstitielle ; Dm : *Daphnia magna* ; Sv : *Simocephalus vetulus* ; Ha : *Hyalella azteca* ; Cr : *Chironomus riparius* ; Ps : *Pseudokirchneriella subcapitata* ; Lm : *Lemna minor* ; valeurs en gras : effet significatif)

Jour	0	7	14	21	28
[6PPD]séd nominale (µg/g sec)	n°1 et n°2 : 0-25-300				
[6PPD]séd (µg/g sec)	n°1 : 0-3.6-102 n°2 : 0-7-103	n°1 : 0-4.7-134 n°2 : 0-10-91	n°1 : 0-1.6-115 n°2 : 0-6-82	n°1 : 0-2.1-76 n°2 : 0-9-157	n°1 : 0-3.6-95 n°2 : 0-4.5-40
[6PPD]ES (µg/L)	n°1 : 0-7.3-40 n°2 : 0-0.8-4.8	n°1 : 0-0.6-6 n°2 : 0-0.3-2.2	n°1 : 0-3.5-2 n°2 : 0-0.05-0.5	n°1 : 0-1.6-7 n°2 : 0-<0.05-0.11	n°1 : 0-2.7-28 n°2 : 0-<0.05-0.08
[6PPD]EI (µg/L)	n°1 : 0-2.1-4.5 n°2 : 0-<0.05-3.7	n°1 : 0-2.1-52 n°2 : 0-0.54-9.8	n°1 : 0-3.9-39 n°2 : 0-<0.05-0.62	n°1 : 0-4.3-17 n°2 : 0-<0.05-2.51	n°1 : 0-1.2-293 n°2 : 0-<0.05-0.56
pH ES	Pas d'effet				
O ₂ ES					
Conductivité ES					
COT ES					
Survie Dm (%)	n°1 : médiocre partout et variable ; pas d'effet détectable				
	/	n°2 : 85-90-70	n°2 : 95-87- 22	n°2 : 54-92- 10	n°2 : 72-38- 0
Reproduction Dm (jeunes/mère (cumul))	n°1 : limitée partout et variable ; pas d'effet détectable				
	/	n°2 : 5-5- 0	n°2 : 80-70- 52	n°2 : 135-125- 52	n°2 : 145-130- 52
Survie Sv (%)	/	n°2 : 86-85- 10	n°2 : 80-75- 3	n°2 : 74-75- 32	/
Survie Ha (%)	/	n°1 : 90-72- 0 n°2 : 82-50 ^(a) - 0	n°1 : 93-82-67 n°2 : 87-87- 21	n°1 : 95-27-92 n°2 : 80-82- 50	n°1 : 95- 20-30 n°2 : 82-80- 40
Croissance Ha (mg sec/individu)	n°1 : nm n°2 : 0.05	n°1 : 0.19-0.12-nm n°2 : 0.08-0.07- 0.03	n°1 : 0.40- 0.16-0.15 n°2 : 0.20-0.15- 0.03	n°1 : 0.70- 0.35-0.25 n°2 : 0.47-0.37- 0.06	n°1 : 0.92- 0.40-0.25 n°2 : 0.87-0.73- 0.12
Survie Cr (%)	/	n°1 : 73-52-60	n°1 : 83-82-70	n°1 : 85-79-85	n°1 : 86-78-84
	/	/	n°2 : 36-52-16	n°2 : 50-36-37	n°2 : 65-70-50
Croissance Cr (mg sec /larve)	/	n°1 : 0.16-0.17-0.15	n°1 : 1.00- 0.66-0.65	n°1 : ^(b) - 0.58-0.40	n°1 : ^(b) - 0.60-0.40
	/	n°2 : nm	n°2 : 040-0.50-0.40	n°2 : 0.67-0.70-0.63	n°2 : 0.72-0.58-0.60
Emergences Cr (%)	/	n°1 : 0-0-0	n°1 : 8-8-8	n°1 : 84-56-80	n°1 : 92-64-84
	/	/	/	/	n°2 : 50-45-47
Croissance Ps (µg Chla/L)	/	n°1 : 11-8-9	n°1 : 53-31-36	n°1 : 10-7- 37	n°1 : 5-14- 41
	/	n°2 : 4-7-7	n°2 : 9-21- 137	n°2 : 5-6- 108	n°2 : 9-10- 24
Croissance Lm (nombre de frondes)	n°1 : 6-6-6 n°2 : 6-6-6	n°1 : 16-16-16 n°2 : 15-15-15	n°1 : 36-31-36 n°2 : 50-50-50	n°1 : 36-44-50 n°2 : 132-174-77	/ n°2 : 258-320-185

2.5.3. Evaluation de l'écocompatibilité de MIOM valorisés en technique routière

2.5.3.1. Problématique et travaux réalisés

Les mâchefers d'incinération des ordures ménagères (MIOM) sont les résidus ultimes du processus d'incinération des ordures ménagères. Ils représentent près de 3 millions de tonnes de MIOM par an en France (ADEME, 2002). Leur composition élémentaire est présentée au **tableau 39**. Outre des métaux lourds, dont les teneurs peuvent atteindre plusieurs milliers de ppm, les MIOM contiennent des imbrûlés représentant une teneur en carbone organique (2 à 4% en masse) constituée en majeure partie de cellulose et de lignine mais également de polluants organiques tels que HAPs (45 à 850 ng/g), PCB (<10 ng/g), phtalates (6 µg/g), dioxines et furanes (4 à 20.6 ng I-TEQ/Kg, Brazillet et Badreddine, 2002).

Les MIOM étaient jusqu'en 1992 principalement éliminés en centre d'enfouissement technique. Le changement de politique de gestion, impulsé par la loi du 13 juillet 1992 (MATE, 1992) qui introduit la notion de déchet ultime et impose de valoriser les déchets, a conduit à la mise en place de dispositions favorisant la valorisation des MIOM, notamment, en technique routière, dans un cadre réglementaire précis défini par la circulaire ministérielle du 9 mai 1994 (MATE, 1994).

Ces dispositions ont mis fin à l'utilisation non contrôlée des MIOM en technique routière et sont conformes aux recommandations de la Directive Européenne du 4 décembre 2000 relative à l'incinération des déchets, transposée en droit français par l'arrêté ministériel du 20 septembre 2002.

La circulaire ministérielle du 9 mai (MATE, 1994) précise les conditions de stockage et de valorisation des mâchefers d'incinération d'ordures ménagères, en France. La classification de ces résidus est établie par détermination de leur potentiel polluant. La procédure de lixiviation NF X 31-210 (AFNOR, 1992) est appliquée à un échantillon représentatif de MIOM. Sont analysés sur les lixiviats obtenus : le taux d'imbrûlés, le pourcentage de la fraction soluble, la fraction de carbone organique total, les teneurs en arsenic, cadmium, chrome hexavalent, mercure, plomb et sulfates. Le **tableau 40** présente les valeurs seuils de ces différents paramètres physico-chimiques choisis pour classer les résidus.

Cette classification des MIOM est cependant établie sans tenir compte de la sensibilité des milieux récepteurs potentiels. Le comportement des résidus en interaction avec ces milieux et les impacts sur ceux-ci ne sont pas évalués.

Tableau 39. Composition élémentaire des MIOM en Europe (source : Triffault-Bouchet, 2004)

	Teneur en mg/Kg MS (Wiles, 1996)	Teneur en mg/Kg MS (Hjelmar, 1996)	Teneur en mg/Kg MS (Société Française de Santé Publique, 1999)
Éléments majeurs			
O	400 000 - 500 000	<i>NF</i> ^a	<i>NF</i>
Si	91 000 - 310 000	210 000 - 290 000	30 - 61 (% sur sec SiO ₂)
Fe	4 100 - 150 000	27 000 - 150 000	3.9 - 18 (% sur sec)
Ca	37 000 - 120 000	65 000 - 97 000	7.4 - 15 (% sur sec)
Al	22 000 - 73 000	47 000 - 72 000	1.6 - 18 (% sur sec)
Na	2 900 - 42 000	22 000 - 41 000	0.9 - 8.0 (% sur sec)
K	750 - 16 000	9 200 - 22 000	0.2 - 1.6 (% sur sec)
C	10 000 - 60 000	<i>NF</i>	<i>NF</i>
Éléments mineurs			
Mg	400 - 26 000	7 700 - 19 000	0.7 - 3.5 (% sur sec)
Ti	2 600 - 9 500	3 200 - 7 200	0.1 - 2.3 (% sur sec)
Cl	800 - 4 200	1 200 - 3 200	0.01 - 0.58 (% sur sec)
Mn	83 - 2 400	700 - 1 700	630 à 2 127
Ba	400 - 3 000	900 - 2 700	<i>NF</i>
Zn	610 - 7 800	1 800 - 6 200	1 250 à 3 570
Cu	190 - 8 200	900 - 4 800	810 à 3 000
Pb	98 - 14 000	1 300 - 5 400	431 à 3 763
Cr	23 - 3 200	230 - 600	165 à 800
Éléments traces			
Sn	2 - 380	100 - 1 300	<i>NF</i>
Sb	10 - 430	<i>NF</i>	<i>NF</i>
V	20 - 120	36 - 90	<i>NF</i>
Mo	2.5 - 280	2.5 - 40	<i>NF</i>
As	0.12 - 190	19 - 80	< 5 - 22
Se	0.12 - 190	0.6 - 8	<i>NF</i>
Sr	85 - 1 000	170 - 350	<i>NF</i>
Ni	7 - 4 300	60 - 190	65 - 250
Co	6 - 350	10 - 40	<i>NF</i>
Ag	0.29 - 37	4.1 - 14	<i>NF</i>
Hg	0.02 - 7.8	0.01 - 3	< 0.05 - 111
B	38 - 310	<i>NF</i>	<i>NF</i>

^a données non fournies par les auteurs**Tableau 40.** Seuils réglementaires définissant les classes de MIOM (MATE, 1994) (source : Triffault-Bouchet, 2004)

Paramètres	MIOM V	MIOM M	MIOM S
Taux d'imbrûlés (%)	< 5	< 5	< 5
Fraction soluble (%)	< 5	< 10	> 10
Mercure, Hg (mg/kg)	0.2	0.4	0.4
Plomb, Pb (mg/kg)	10	50	50
Cadmium, Cd (mg/kg)	1	2	2
Arsenic, As (mg/kg)	2	4	4
Chrome, Cr ⁶⁺ (mg/kg)	1.5	3	3
Sulfates, SO ₄ ²⁻ (mg/kg)	10 000	15 000	15 000
COT (mg/kg)	1 500	2 000	2 000

C'est dans ce contexte que le Ministère de l'Aménagement du Territoire et de l'Environnement (MATE) et l'ADEME ont initié conjointement un programme d'études relatif à l'orientation des Résidus de Procédés Thermiques (RPT) vers différents scénarios de stockage et d'utilisation. Plusieurs études ont été soutenues par l'ADEME en vue d'évaluer l'écocompatibilité de ces déchets avec leur environnement : caractérisation de cette matrice proprement dite, voies de transfert de pollution possibles, impact des flux de pollution émis par ces MIOM sur les systèmes aquatiques lotiques (systèmes d'eau courante) (Ferrari *et al.*, 1999 ; Gros, 2002 ; Perrodin *et al.*, 2002 ; Canivet et Fruget, 2002). L'écocompatibilité est définie comme « *une situation où les flux de pollution émis par les déchets, placés dans un certain contexte physique, hydrogéologique, physico-chimique et biologique, sont compatibles avec les flux de polluants acceptables par le milieu récepteur du site de stockage ou de valorisation concerné* » (Perrodin *et al.*, 2002). Dans le prolongement des travaux réalisés dans ce programme, nous avons étudié l'impact des flux de pollution émis par les MIOM sur les écosystèmes lenticques (systèmes d'eau stagnante) représentés par les microcosmes 2 et 100 L déjà décrits dans ce rapport, en nous appuyant également sur des essais monospécifiques (Elbouazzaoui, 2002 ; Lottmann, 2003 ; Carbonel, 2003 ; Triffault-Bouchet, 2004 ; Triffault-Bouchet *et al.*, 2004, 2005 ; Clément *et al.*, 2005a).

Le scénario d'étude des mâchefers d'incinération des ordures ménagères porte sur l'utilisation de ces déchets en remblai d'une route située en contrebas d'un site à la topographie accidentée (**figure 56**). Les eaux pluviales s'infiltrent dans les déchets. Les effluents ayant percolé à travers les mâchefers se déversent dans la zone littorale d'un écosystème lenticque (Triffault-Bouchet, 2004).

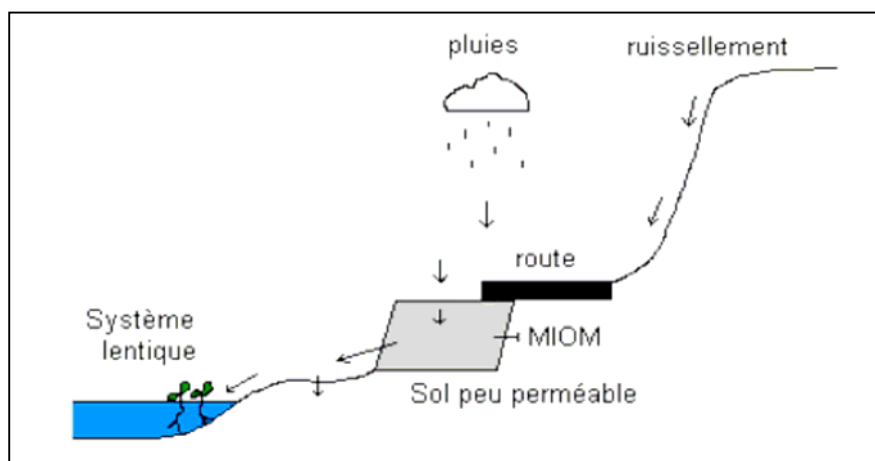


Figure 56. Scénario d'étude de l'écocompatibilité des flux de polluants émis par les MIOM valorisés en technique routière vis-à-vis d'un écosystème lenticque, en particulier la zone littorale d'un étang ou d'un lac (source : Triffault-Bouchet, 2004)

Les MIOM, de type « valorisable », ont été récupérés dans une usine d'incinération d'ordures ménagères des Alpes à deux reprises (MIOM1 et MIOM2). Des percolats ont été produits à partir de ces MIOM à l'aide d'un lysimètre de laboratoire arrosé quotidiennement avec de l'eau déminéralisée. Ces systèmes permettent de simuler un contact dynamique eau/déchet discontinu et en conditions non saturantes en eau. Les percolats ont été récoltés par fraction. Ces fractions sont nommées P1, P2 et P3 pour les MIOM1 et correspondent à des quantités cumulées de percolats définies selon les rapports « liquide/masse de déchet » de 0.5, 1.0 et 1.5. Huit fractions A à H ont également été produites à partir du deuxième prélèvement (MIOM2), correspondant à un L : S variant entre 0.1 et 0.8, et des essais ont été réalisés sur ces fractions et sur un percolat composite reconstitué à partir des mêmes fractions (équimélange des fractions A, B, C, F, G, H).

Des essais en microcosmes 2 L (28 jours) ont été réalisés en parallèle à des tests monospécifiques et à un suivi analytique sur les fractions de percolats MIOM1 (essais en 2001-2002). En 2003 des essais en microcosmes de 100 litres ont été menés sur certaines des fractions A à H de MIOM2 apportées successivement et sur le percolat composite.

2.5.3.2. Principaux résultats

2.5.3.2.1. Composition physico-chimique des percolats de MIOM

Les résultats principaux sont présentés au **tableau 41**.

Les percolats produits présentent un pH élevé (de 9.9 à 10.7) dû à la présence d'hydroxydes de calcium qui se forment au cours du refroidissement des mâchefers. La fraction organique, bien représentée avec un COD variant entre 37 et 204 mg C/L, ne présente aucune teneur détectable de polluants organiques tels que HAPs, phtalates et PCB (analyses réalisées sur P1). La conductivité élevée est essentiellement due aux ions calcium, chlorures, potassium, sodium et sulfates qui sont facilement mobilisés au cours de la percolation. Les métaux lourds sont présents en faibles concentrations excepté pour le cuivre (1 à 10 mg/L). La mobilité du plomb et du chrome est faible à pH élevé, et il est possible que l'élution du cuivre ait été favorisée par la présence de matières organiques dissoutes pour lesquelles il présente une grande affinité (Meima et Comans, 1999). Ces résultats sont représentatifs des percolats de MIOM. Ferrari (2000) et Freyssinet *et al.* (2002), qui ont travaillé dans des conditions proches des nôtres, ont également mis en évidence une forte contamination des percolats par les ions chlorures, calcium, potassium et sodium, et par le cuivre. Ils montrent comme nous une diminution des charges polluantes lorsque le rapport L : S augmente.

Tableau 41. Caractéristiques physico-chimiques des percolats issus des MIOM 1 (P1 à P3) et MIOM2 (A à H), produits à l'aide d'un lysimètre de laboratoire (COD : carbone organique dissous ; MS: matière sèche ; LD : limite de détection de la méthode analytique ; composite : mélange équivolume des percolats A, B, C, F, G et H) (données tirées de Triffault-Bouchet, 2004 et Clément *et al.*, 2005a)

		P1	P2	P3	A	B	C	D	E	F	G	H	Composite
pH	unités pH	10.7	10.6	10.5	10.3	10.4	10.2	10.3	10.1	9.9	9.9	9.9	9.9
Conductivité	µS/cm	19800	19400	11300	6500	6950	5430	4120	2590	2340	2040	1980	3960
COT	mg C/L	204	78	37	200	200	142	89	48	38	33	38	98
Cu	µg/L	10000	4280	1340	7500	7340	5020	3513	1947	1687	1053	1021	3575
Cr	µg/L	210	<LD	<LD	382	106	43	21	21	14	14	13	74
Ni	µg/L	52	26	95	104	78	61	36	25	18	18	14	44
Pb	µg/L	116	<LD	<LD	10	8	6	4	3	4	10	5	6
Cd	µg/L	<LD	<LD	<LD	0.5	1.0	0.3	0.3	0.2	0.4	2.3	0.3	0.7
Cl ⁻	mg/L	5239	3315	1639	1946	1803	1403	846	470	438	357	315	947
SO ₄ ²⁻	mg/L	1401	771	374	805	725	504	376	217	185	160	149	390
Na ⁺	mg/L	5962	3511	2228	1410	1310	987	730	402	333	271	263	713
K ⁺	mg/L	1705	1057	647	393	386	331	262	165	156	136	122	244
Ca ²⁺	mg/L	<16	<39	33	180	200	192	106	107	115	95	95	136

2.5.3.2.2. Toxicité des percolats de MIOM en tests monospécifiques

Les essais monospécifiques réalisés sur les percolats produits avaient pour objectifs :

- de cerner le niveau de toxicité de ces effluents en vue de faciliter le choix des concentrations testées en microcosmes,
- de constituer des données de référence à comparer aux effets observés sur les mêmes organismes en microcosmes, en vue de discuter de l'intérêt de l'approche microcosmes.

La question de l'ajustement du pH, pour des effluents à pH élevé, s'est posée. En effet, dans les protocoles d'essais monospécifiques normalisés le pH doit être ajusté jusqu'à des valeurs acceptables pour les organismes testés, de façon à éliminer les effets propres au pH. Nous avons donc dans la plupart des essais choisi d'ajuster le pH du percolat à 8.0 ± 0.5 . Dans certains cas, notamment pour les percolats de MIOM2, nous avons également testé les percolats sans ajustement du pH. Lorsque la comparaison est possible (**tableau 42**), il est clair que l'ajustement conduit à réduire la toxicité du percolat. Il convient de préciser d'emblée que le percolat au pH non ajusté n'était pas plus toxique du fait du pH : en effet, aux concentrations testées (maximum 16%, Clément *et al.*, 2005a), le pH a varié entre 7.6 et 8.5, valeurs sans effet sur les organismes. En revanche, l'ajustement du pH du percolat conduit à des phénomènes de précipitations qui modifient sensiblement la spéciation de la plupart des polluants présents, notamment métalliques (Chandler *et al.*, 1997), et réduisent généralement la toxicité, comme le montrent les résultats sur percolats avec ajustement de pH et filtration

ou non. Les travaux antérieurs de Ferrari (2000) confirment la moindre toxicité des percolats de MIOM après ajustement du pH (**tableau 43**).

La question de la filtration de ces effluents non exempts de M.E.S et de colloïdes s'est également posée. Les travaux menés dans le cadre d'un stage de DEA (Elbouazzaoui, 2002) montrent que les percolats bruts sont plus toxiques vis-à-vis des daphnies que les mêmes percolats après filtration ou centrifugation. On peut penser que les M.E.S., ingérées par ces organismes filtreurs passifs, constituent une source de toxicité, soit par les toxiques adsorbés sur les M.E.S., soit par action physique, ou les deux à la fois. Ces résultats montrent l'importance de considérer l'effluent dans son intégrité, sans faire l'hypothèse simplificatrice que la toxicité est liée uniquement à la fraction soluble.

Tableau 42. Résultats (en % d'effluent) des essais monospécifiques mis en œuvre sur percolats de MIOM1 et MIOM2 (d'après données de Triffault-Bouchet (2004) et Clément *et al.* (2005a))

	Filtration	Ajustement pH	MIOM1		MIOM2		P composite
			P1	P2	P3	Fractions a à g	
<i>P. subcapitata</i> CI50-72 h	oui	oui	< 1.56	5.5	34.6	< 1.56 - 53.8	/
<i>D. magna</i> CE50-48 h	oui	oui	NT	NT	NT	33 - NT	/
	non	oui	NT	NT	NT	3.5 - NT	/
<i>D. magna</i> CE50-24 h	non	oui	/	/	/	/	> 16
	non	non	/	/	/	/	1.5
<i>L. minor</i> CI10-96 h	oui	oui	24	44	< 1.56	5.6 - NT	/
	non	oui	13.8	50.6	< 1.56	< 1.56 - NT	/
<i>V. fischeri</i> CI50-30 mn	oui	oui	14	15	20	/	/
<i>H. azteca</i> CL50-24 h	non	oui	/	/	/	/	>> 16
	non	non	/	/	/	/	3
<i>H. azteca</i> CL50-5 j	non	oui	/	/	/	/	> 16
	non	non	/	/	/	/	1

/ : non testé ; NT : non toxique

Tableau 43. Résultats (CE50 en % d'effluent) des tests écotoxicologiques réalisés sur des fractions de percolats de MIOM dans le cadre du programme Ecocompatibilité (travaux de Ferrari (2000) ; nd : non déterminé)

Bioessai	Percolat P1		Percolat P2		Percolat P3	
	pH non ajusté	pH ajusté	pH non ajusté	pH ajusté	pH non ajusté	pH ajusté
Algues 72 h	1.03	1.32	1.18	1.43	2.63	5.65
Microtox 60 mn	3.30	5.21	nd	50.00	< 9.01	>100
Daphnies 48 h	6.29	47.62	nd	nd	< 3.50	>100

La toxicité des percolats est variable selon les organismes considérés. Les algues sont en général les plus sensibles. Triffault-Bouchet (2004) propose de considérer l'ensemble des résultats de la batterie de tests sous la forme d'un indice global de toxicité, le BEEP (Barème d'Effets Ecotoxiques Potentiels) précédemment appliqué par Lambolez *et al.* (1994) à l'étude de lixiviats de déchets et Ferrari (2000) à l'étude du potentiel toxique intrinsèque des MIOM :

$$\text{BEEP} = \log_{10} \left[1 + n \times \left(\frac{\sum_{i=1}^N T_i}{N} \right) \right]$$

avec N le nombre total de tests réalisés, n le nombre de tests produisant une réponse toxique ($T_i > 0$) et T_i la toxicité ou la génotoxicité exprimée en Unités Toxiques de chacun des tests (le nombre d'unités toxiques est défini par le taux de dilution nécessaire pour obtenir un effet de 50 %).

La **figure 57** permet d'illustrer la diminution de toxicité globale des percolats de MIOM lorsque le rapport L : S augmente, diminution liée à celle de la charge polluante.

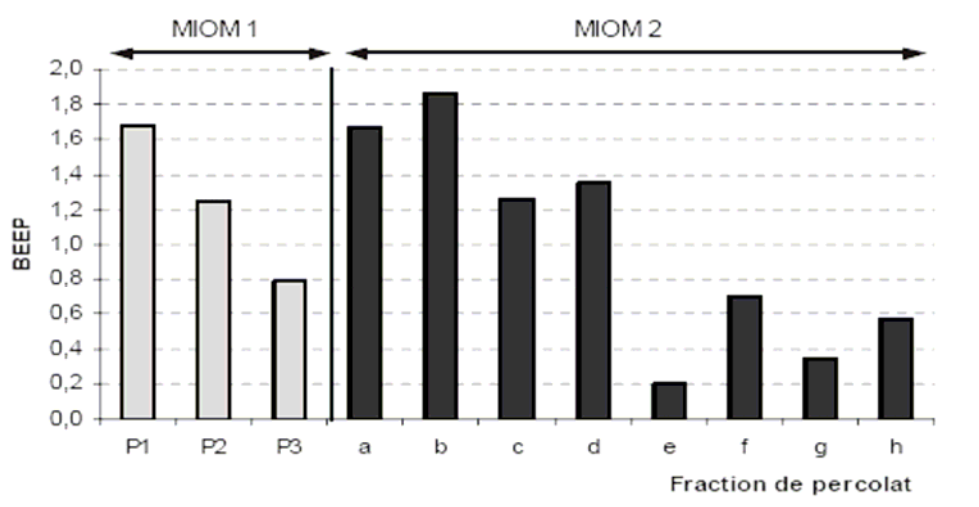


Figure 57. Représentation graphique des indices globaux de toxicité BEEP des percolats issus des MIOM 1 et 2, produits en lysimètre de laboratoire (Triffault-Bouchet, 2004)

2.5.3.2.3. Toxicité des percolats de MIOM en microcosmes 2 L

Des essais en microcosmes 2 L ont été menés sur les fractions P1, P2 et P3 des MIOM1 (concentrations : 1.56 - 4.00 - 8.00 %). Les percolats ont été introduits sans ajustement du pH et sans filtration, pour mieux simuler un rejet *in situ*. Même à 8% de percolat, le pH initial (9 unités pH pour P1) est ramené en près de 3 jours aux valeurs de pH des témoins (autour de 8), du fait de la capacité tampon du milieu, liée notamment à la présence de sédiment. Les

caractéristiques physico-chimiques de la colonne d'eau sont en rapport direct avec la concentration en percolat, en particulier les teneurs en sels dissous et la teneur en cuivre (sur eaux filtrées à 1.2 µm). La contamination des microcosmes n'a pas eu d'effets sur le pH du sédiment, mais les eaux interstitielles ont vu leurs teneurs en sels (K⁺, Na⁺, Cl⁻) et en cuivre augmenter de façon significative.

Le **tableau 44** résume les effets observés en microcosmes. Les percolats ont eu des effets sur les organismes, le plus souvent à partir de la concentration 4%, qu'il s'agisse de la survie et de la reproduction des daphnies, de la croissance des algues et des lentilles d'eau. Pour l'amphipode *H. azteca*, les effets sur la survie et la croissance ne se font sentir qu'à la concentration 8%, alors que *C. riparius* est sensible (survie et émergence) à certains percolats dès 4%. Comme dans les essais monospécifiques, la toxicité décroît généralement pour un rapport L : S croissant.

Tableau 44. Synthèse des effets observés en microcosmes 2 L contaminés par des fractions de percolats (concentrations testées : 0-1.56-4.00-8.00 %) (Triffault-Bouchet *et al.*, 2005).

Species	Endpoint	P1	P2	P3
<i>P. subcapitata</i>	Growth J(10)	No effect at 1.56%		
<i>D. magna</i>	Survival J(3)	Effect proportional to the concentrations 4.0 and 8.0%		
	Survival J(10)	Effect proportional to the concentration		
	Reproduction	Effect proportional to the concentration	No effect at 1.56 and 4.0%	
<i>L. minor</i>	Growth J(30)	No effect	80% at 4.0 et 8.0%	40% at 4.0%
		Inhibition at 4.0 and 8.0%	Inhibition at 4.0 and 8.0%	> 90% at 8.0%
<i>H. azteca</i>	Survival J(30)	No effect	50% at 8.0%	50% at 8.0%
<i>C. riparius</i>	Survival J(30)	100% at 8.0%	72% at 8.0%	54% at 8.0%
	Emergence J(30)		No effect	

2.5.3.2.4. Toxicité des percolats de MIOM en microcosmes 100 L

Lors des essais en microcosmes de 100 L (Triffault-Bouchet, 2004 ; Clément *et al.*, 2005a), les percolats ont été apportés à plusieurs reprises pour simuler une succession d'événements pluvieux plus ou moins rapprochés (1 à 2 semaines). La concentration maximale cumulée n'a pas dépassé 6% dans le 1^{er} essai et 3% dans le second. La contamination s'est traduite par une augmentation des teneurs en sels (chlorures, sulfates, sodium et potassium) et en métaux (cuivre essentiellement) dans la colonne d'eau. Parmi les trois espèces de Cladocères présentes, *Daphnia magna* s'est montrée sensible aux percolats alors que les populations de *Ceriodaphnia dubia* et *Simocephalus vetulus* se sont bien développées. Les amphipodes ont

été plus ou moins sensibles en fonction de l'essai et probablement en fonction du mode d'exposition, alors que les chironomes ont émergé de la même façon dans les systèmes témoins et les systèmes contaminés. Les deux espèces de gastéropodes ont réagi différemment : alors que *Lymnaea stagnalis* a vu sa survie et son activité alimentaire réduites au cours du second essai (données non utilisables pour le premier), aucun effet n'a été enregistré sur *Physa acuta* sur les deux essais. Les producteurs primaires présents (lentilles d'eau, plantes enracinées et algues microscopiques) n'ont pas été sensibles aux percolats, à l'exception des lentilles d'eau lors du premier essai.

2.5.3.2.5. Comparaison des résultats aux différentes échelles d'essai

La comparaison des effets observés entre les essais réalisés à différentes échelles de complexité (essais monospécifiques et essais en microcosmes 2 et 100 L) devrait fournir un éclairage intéressant sur les gains en termes d'information et de prédictibilité apportés par les différentes approches, mais est difficile à effectuer pour plusieurs raisons.

En premier lieu, seules quatre espèces sur la douzaine d'espèces du microcosme 100 L ont été testées en tests monospécifiques et en microcosmes 2 et 100 L (*Daphnia magna*, *Pseudokirchneriella subcapitata*, *Lemna minor*, *Hyaella azteca* en phase aqueuse). On doit y ajouter deux espèces benthiques, *Hyaella azteca* et *Chironomus riparius*, pour la comparaison entre microcosmes 2 et 100 L.

Par ailleurs, les essais n'ont pas systématiquement porté sur les mêmes percolats, essentiellement pour des raisons d'évolution des effluents au cours de leur conservation. Elbouzzaoui (2002) a en effet montré une augmentation de toxicité lors de la conservation à 4 °C et à -18 °C des percolats, qui évoluent également sur le plan physico-chimique. C'est la raison pour laquelle nous avons dû procéder à la production de nouveaux percolats à partir de nouveaux mâchefers (MIOM2) dans la seconde phase du programme. Si les percolats A à H produits dans cette seconde phase présentent des caractéristiques assez proches de celles des percolats P1, P2 et P3, il s'agit d'effluents différents pouvant donc générer des effets différents. Une autre différence fondamentale est liée aux pré-traitements de filtration et d'ajustement du pH apportés dans les tests monospécifiques, pré-traitements qui ont significativement modifié la toxicité des percolats, comme souligné précédemment.

Enfin, les différences sont évidemment liées aux conditions d'exposition adoptées dans les différents types d'essai (durée, type de milieu, renouvellement de la colonne d'eau, interactions avec autres organismes, etc.). Par exemple, la présence de sédiment dans les essais en microcosmes conditionne le devenir des polluants comme le cuivre dont les

concentrations dans la colonne d'eau ont diminué au long des essais alors que les teneurs dans les eaux interstitielles ont significativement augmenté. Elbouazzaoui (2002) a comparé les effets du percolat P2 (MIOM1) sur daphnies et amphipodes avec et sans sédiment, après ajustement ou non du pH, et dans tous les cas sans filtration (**tableau 45**). Les résultats montrent clairement que la présence de sédiment atténue la toxicité du percolat, avec ou sans ajustement du pH, et que si la toxicité du percolat en phase aqueuse est en partie réduite après ajustement du pH, ce n'est pas le cas en présence de sédiment.

Tableau 45. Effets du percolat P2 (MIOM1) sur la survie de *Daphnia magna* (Dm) et *Hyaella azteca* (Ha) dans différentes conditions (pH 8 obtenu par ajustement du pH initial de 11 ; exposition 4 jours avec sédiment, 48 h sans sédiment) (d'après Elbouazzaoui, 2002)

	Avec sédiment				Sans sédiment	
	pH 8		pH 11		pH 8	pH 11
	Dm	Ha	Dm	Ha	Dm	Dm
0%	2%	0%	5%	0%	0%	0%
1.56%	2%	7%	5%	3%	60%	100%
4%	28%	13%	8%	17%	93%	100%

Ces réserves étant faites, on peut tenter de rapprocher les résultats des différentes échelles d'essais pour comparer les informations apportées par les réponses des organismes testés dans au moins deux types d'essais (**tableaux A8-1 et A8-2 en annexe 8**).

L'algue verte *P. subcapitata* s'est montrée très sensible aux premiers percolats dans les tests monospécifiques. Cette sensibilité s'est retrouvée dans les essais en microcosmes 2 L, mais une reprise de la croissance a été observée après 10 jours, probablement du fait d'une prise en charge par le milieu des toxiques qui s'expriment dans les conditions plus simples des essais monospécifiques. Cette absence d'effet sur la croissance algale est confirmée en microcosmes 100 L, malgré les apports répétés de percolats. Le développement du périphyton, non affecté par la contamination, apporte une confirmation supplémentaire.

La lentille d'eau *Lemna minor* a montré une sensibilité variable aussi bien en tests monospécifiques que dans les essais en microcosmes 100 L. Les différences de milieux utilisés en essais monospécifiques et en microcosmes, notamment au niveau de leur pH, qui agit sur la spéciation des métaux donc sur leur toxicité, doivent nous inciter à la plus grande prudence. Des précipités ont été observés lors des tests monospécifiques, résultant du mélange de l'effluent au pH alcalin à un milieu au pH acide. Nous retiendrons que des effets sont possibles à partir de 2% dans les conditions des microcosmes.

Les cladocères *Daphnia magna*, *Ceriodaphnia dubia* et *Simocephalus vetulus* ont montré des sensibilités variables aux percolats de MIOM. *D. magna*, testée aux trois échelles d'approche, n'a pas été sensible en tests monospécifiques sur fractions P1 à P3 et A à H, très probablement du fait de l'ajustement du pH. Cette espèce répond en revanche en test monospécifique sans ajustement de pH au percolat composite (CE50-24 h de 1.5%) et en microcosmes 2 et 100 L pour des concentrations de quelques %, l'effet aux faibles concentrations testées n'étant pas lié au pH très alcalin des effluents. Comme pour les algues, des possibilités de récupération ont été mises en évidence. Les deux autres espèces se sont montrées insensibles aux apports de percolats, malgré des sensibilités aux substances pures généralement voisines.

Les réponses de l'amphipode *Hyaella azteca* permettent de souligner l'importance de l'exposition chez cette espèce épibenthique qui se trouve au contact de la colonne d'eau et du sédiment. Il semble que *H. azteca* puisse être sensible aux apports de percolats à des teneurs assez faibles (1 et 2%) lorsque son exposition se fait principalement *via* la colonne d'eau. Lorsqu'elle a la possibilité de trouver refuge dans le sédiment ou lorsqu'elle s'y trouve contrainte par les conditions d'essai (*cf* 2.4.3.4. *Biocénoses*), elle est naturellement moins exposée et donc moins sensible. Sur ce point, les essais monospécifiques en phase aqueuse (percolat composite) et en microcosmes 100 L (fractions A à H et percolat composite) concordent.

Malgré son statut d'espèce benthique, *Chironomus riparius* a été affectée par les percolats dans les essais en microcosmes 2 L, à partir de 4%. Ces effets n'ont pas été observés en microcosmes 100 L, où l'on a observé des eaux interstitielles moins contaminées qu'en microcosmes 2 L.

2.5.3.2.6. *Le cuivre, un dénominateur commun aux effets observés ?*

Les apports de percolats se traduisent par une augmentation de salinité et des teneurs en cuivre à des valeurs potentiellement écotoxiques pour les organismes des microcosmes. S'agissant des sels apportés, chlorures, sulfates, sodium, potassium et calcium, nous avons essayé d'évaluer leur contribution à la toxicité observée en reconstituant des percolats synthétiques exempts de composés organiques et de métaux, et de composition minérale proche de celles des percolats P1 à P3 (Elbouazzaoui, 2002). Il s'avère que ces percolats synthétiques ont des effets assez prononcés sur les algues (CI50-72h entre 5 et 12%), alors que les daphnies et les lentilles d'eau sont peu sensibles (CE50 > 50%). Il n'est donc pas exclu que la forte salinité des percolats de MIOM puisse expliquer une partie des effets

observés sur les algues. Le cuivre apparaît cependant pouvoir expliquer de façon plus importante les effets observés en microcosmes 2 et 100 L pour la plupart des organismes, et en tests monospécifiques pour les algues. Les seuils de toxicité pour ce métal sont assez bas : NOEC de 10 à 15 µg/L pour la reproduction de *D. magna*, CE50-72h de 47 µg/L pour l'algue *P. subcapitata* (Radix *et al.*, 2000), LOEC-20 jours de 83 µg/L en mésocosmes (Girling *et al.*, 2000), NOEC-14 jours de 60 µg/L pour *Lemna minor* (Jenner et Janssen-Mommen, 1993), CL50-10 j de 43 µg/L pour *H. azteca* (Kubitz *et al.*, 1996). Pour tester cette hypothèse avec *Daphnia magna*, on peut comparer les effets observés aux teneurs présentes dans les microcosmes (**tableau 46**). On observe une assez bonne relation dose-effet en rassemblant les couples teneur/effet pour les percolats P1, P2 et P3, et les concentrations mesurées dans les microcosmes 100 L sont de nature à générer des effets. En outre, le suivi des teneurs en cuivre dans les systèmes montre, comme cela a déjà été souligné et comme l'illustre le **tableau 46**, que la forme dissoute de ce métal n'est pas stable. La prise en charge par le milieu (adsorption sur les particules et colloïdes, bioaccumulation, piégeage par le sédiment, etc.) aurait eu pour effet de réduire la pression de toxicité pour les organismes présents, ce qui pourrait expliquer les observations réalisées en microcosmes sur l'atténuation dans le temps des effets des percolats. C'est peut-être cette atténuation dans le temps de la biodisponibilité du cuivre qui peut expliquer le développement des populations de *Ceriodaphnia dubia* et *Simocephalus vetulus* dans les essais 100 L, deux espèces qui montrent pourtant dans la littérature des sensibilités au cuivre comme à la plupart des toxiques comparables à celle de *D. magna* (Versteeg *et al.*, 1997). Il n'est d'ailleurs pas exclu que *C. dubia* et *S. vetulus* aient à un moment été affectées par les apports de percolats, sans que cela ait pu avoir des effets visibles au niveau des populations. Les modalités d'exposition des trois espèces de Cladocères n'ont pas nécessairement été identiques, et la faible densité algale toujours observée a pu constituer un handicap pour *D. magna*, plus grande donc aux besoins plus importants que les deux autres espèces, qui se serait trouvée ainsi plus vulnérable aux effets du cuivre.

2.5.3.2.7. Conclusion

Dans l'hypothèse où le cuivre pourrait constituer un dénominateur commun aux effets observés aux différentes échelles d'essais, il serait théoriquement plus facile d'expliquer les analogies relevées entre certaines échelles. Cependant, comme déjà souligné, de nombreux facteurs de différenciation entre ces approches rendent cette analyse complexe. Les conditions abiotiques et biotiques, qui influencent de façon importante le devenir du cuivre, la durée des expositions, la composition physico-chimique de l'eau, la présence de sédiment, etc., sont

autant de facteurs qui modulent la biodisponibilité du cuivre et permettent ou non d'exprimer sa toxicité. Des recherches approfondies centrées sur l'étude du devenir et des effets du cuivre au sein d'un percolat de MIOM introduit dans des microcosmes permettraient sans doute de préciser les effets observés à différentes échelles dans notre étude. Il n'en reste pas moins que nos résultats de tests monospécifiques et d'essais en microcosmes 2 et 100 L suggèrent que des problèmes pour les milieux aquatiques récepteurs peuvent survenir, pour les premières fractions de percolats de composition physico-chimique proche de ceux que nous avons étudiés, aux alentours de 1 à 2%. C'est ce qui nous a conduits à proposer une PNEC de l'ordre de 0.1-0.2%, par application d'un facteur de sécurité de 10 (Triffault-Bouchet *et al.*, 2005).

Tableau 46. Teneurs en cuivre dans la colonne d'eau et effets observés chez *Daphnia magna* au cours des essais en microcosmes 2 et 100 L

	Teneur en cuivre ($\mu\text{g/L}$)				Effet sur <i>D.magna</i>
	théorique	mesurée 1 jour	mesurée 10 jours	mesurée 30 jours	
1.56% P3	21	nd	12	9	30%
1.56% P2	67	nd	25	18	25%
4% P2	171	nd	52	26	50%
1.56% P1	156	nd	33	25	70%
8% P3	107	nd	50	19	68%
4% P1	400	nd	74	45	90%
8.0% P1	800	nd	138	105	99%
8.0% P2	342	nd	126	47	100%
Essai 100 L n°1	148 à 200	130	129	110	effet avéré
Essai 100 L n°2	36	25	/	/	pas d'effet
	107	76	55	< 21	effet avéré

2.5.4. Evaluation de l'impact de l'immersion de sédiments de dragage

2.5.4.1. Problématique de la gestion des sédiments de dragage

Les sédiments sont un mélange de matériaux fins déposés au fond des cours d'eau ou des canaux découlant des processus d'érosion et du charriage des apports latéraux. Ils sont composés de particules minérales et organiques (racines, faune, micro-organismes), d'eau, de gaz, et représentent un compartiment majeur des écosystèmes aquatiques, à l'interface entre le milieu aquatique et le milieu phréatique. Ils assurent donc des fonctions prépondérantes dans les cycles biologiques et géochimiques de ces milieux aquatiques. Les activités humaines, qu'elles soient industrielles, de transport ou de loisirs, nécessitent d'effectuer des opérations de dragage des milieux aquatiques destinées à maintenir la capacité d'évacuation des crues, l'activité de transport fluvial et l'activité portuaire et maritime en général.

Les enjeux liés aux impacts de ces opérations sur l'environnement sont considérables au vu des volumes de dragage mis en œuvre annuellement en France : entre 20 et 30 millions de tonnes pour les ports et estuaires, et entre 2.5 et 3.5 millions de tonnes pour les fleuves, rivières et canaux (Marot, 1997 ; Alzieu, 2001 ; Boguzs, 2001 ; Doutriaux, 2001). L'article 114 du Code Rural précise par ailleurs que le curage, conformément aux dispositions de la Loi sur l'Eau, est destiné à maintenir l'écoulement naturel des eaux, à assurer la bonne tenue des berges, et à préserver la faune et la flore dans le respect du bon fonctionnement des écosystèmes aquatiques dans le cas de sédiments très contaminés. Du fait des rejets dans les milieux aquatiques dus aux activités humaines du bassin-versant mais aussi de la navigation elle-même, les sédiments concentrent de nombreux polluants à des teneurs parfois très élevées pour les contaminants non ou peu biodégradables et persistants. On trouve ainsi des métaux lourds, des HAPs, des PCBs. Le **tableau 48** présente l'étendue des teneurs rencontrées pour les sédiments que nous avons eus l'occasion d'étudier, allant des sédiments modérément contaminés jusqu'à des sédiments très contaminés.

Les sédiments de dragage n'entrent nominativement dans aucun champ juridique précis. Par contre les rubriques 17.05.05 (boues de curage contenant des substances dangereuses) et 17.05.06 (autres boues de curage) de la liste européenne des déchets dangereux et non dangereux, applicable au 1^{er} janvier 2022, les renvoient indirectement à la réglementation des déchets lorsqu'ils sont extraits du milieu aquatique à l'occasion d'opérations de dragage (procédure d'autorisation au titre des ICPE, c'est à dire extraction de matériaux d'un volume supérieur à 2000 t, et/ou procédure de la « loi sur l'eau » en cas de rejets dans le milieu). Les résidus de dragages que sont les sédiments extraits sont alors juridiquement assimilables à des boues et peuvent être soumis aux mêmes contraintes (Arrêtés du 8 janvier et 17 août 1998).

Il existe aujourd'hui plusieurs filières de devenir des matériaux de dragage (Agostini *et al.*, 1997) :

- la valorisation par l'épandage agricole, la création de nouveaux espaces et terrains, la réhabilitation de sols de qualité insuffisante, la réutilisation en construction (remblais, digues, défenses de berges, etc.),
- le régalage (épandage sur une bande de terre de 5 à 10 m contiguë au cours d'eau) et la mise en dépôt sur des terrains appropriés (anciennes carrières par exemple),
- l'immersion dans des gravières proches de la voie d'eau concernée par le dragage,
- les traitements : pré-traitements en vue de réduire le volume des boues (déshydratation, criblage, lessivage, etc.), traitements biologiques (phytoremédiation, dégradation bactérienne), chimiques (au moyen d'acides ou de solvants organiques), thermiques (désorption, incinération, etc.), physiques (tri granulométrique, flottation, etc.),
- le confinement ou mise en décharge, solution qui vise à isoler les polluants et limiter les transferts vers l'environnement, de façon temporaire (avant traitement) ou définitive.

En France, il semble que les choix des méthodes de curage et des destinations des boues extraites soient fortement liés au contexte local (proximité de la mer, ou de gravières inexploitées par exemple) (**tableau 47**).

Le dépôt de sédiments en gravière peut présenter plusieurs avantages. Les gravières sont généralement proches des cours d'eau concernés par le dragage, d'où la possibilité de limiter le transport, coûteux, de tels matériaux. Elles représentent par ailleurs des volumes de stockage potentiels dans un environnement souvent limité par le foncier. Le dépôt en gravière est donc une alternative à l'épandage sur terres agricoles, solution rarement intéressante du fait des caractéristiques agronomiques des matériaux de dragage (Chui et Tay, 1997) et des risques de colmatage des sols, et au stockage terrestre, qui n'est pas sans impacts sur le milieu et sur le paysage et qui peut nécessiter des mesures de confinement ou d'étanchéification coûteuses et consommatrices d'espace. Enfin, le dépôt en gravière peut être partiel, permettant ainsi de conserver certaines activités liées à ce milieu aquatique et de limiter l'impact sur le paysage. Les inconvénients sont cependant évidents en raison des risques de pollution des nappes avec lesquelles les gravières sont en contact et de remise en cause des activités aquatiques de la gravière (pêche, baignade, ...). De fait, le remblaiement de carrières est une filière qui se heurte actuellement à des contraintes réglementaires de plus en plus lourdes (Eedems, 2004). En application de l'article 10 de la Loi sur l'eau n° 92-3 du 3 janvier 1992, ce type d'opération est soumis à autorisation ou à déclaration. Selon l'arrêté du 22 septembre

1994, le remblaiement ne doit pas nuire à la qualité et au bon écoulement des eaux. Il doit être réalisé exclusivement au moyen de matériaux minéraux inertes et - pour les carrières en nappe alluviale - ne doit pas perturber l'hydrodynamique de la nappe. La difficulté est liée à l'absence de critères de détermination du caractère « inerte » des matériaux. Les boues de dragage, sous réserve qu'elles soient non polluées et non fermentescibles, sont potentiellement autorisées comme matériaux de remblaiement d'excavations.

Tableau 47. Pratiques locales des opérations de curage (Capilla, 2005)

Bassin	Volume (m ³ .an ⁻¹)	Mode de curage	Analyse	Pollution	Destinations principales des sédiments
Seine-Normandie	800 000	Mécanique	Physico-chimique et lixiviation	20 % (selon l'entreprise « Curages, Dragages et systèmes »)	Immersion en carrières ou gravières
Loire-Bretagne	40 000	Mécanique, hydraulique et pneumatique	Test biologique	N et P	Epandage agricole
Adour-Garonne	90 000		Chimique	Organique et métallique	Remise en suspension et régallage
Artois	400 000	Mécanique et hydraulique	Granulométrique, métaux lourds et hydrocarbures	Organique et métallique (As, Cd, Cr, Hg, Ni, Pb, Zn)	Mise en dépôt terrestre
Rhin-Meuse	20 000	Mécanique	Physico-chimique, agronomique, écotoxicologique	Organique et métallique (As, Cd, Cr, Hg, Ni, Pb, Zn)	Mise en dépôt terrestre
Rhône-Méditerranée-Corse	1 500 000	Clapage par drague aspiratrice	Chimique	Métallique (As, Hg, Pb)	Remise en suspension

2.5.4.2. Etude de l'immersion de sédiments de dragage non traités en gravières

Il n'existe à l'heure actuelle ni recommandation, ni réglementation orientant le choix de telle ou telle filière d'élimination ou de valorisation pour les sédiments de dragage selon leur niveau de pollution. Aucune norme réglementaire n'est de plus applicable spécifiquement à ces matériaux pour caractériser leur niveau de contamination et leur éventuel potentiel toxique. Il n'existe pas de réglementation précisant les valeurs de référence concernant la qualité des produits de dragage. Voies Navigables de France (VNF) a développé un système de valeurs de référence et de valeurs guides, c'est-à-dire de deux valeurs seuils, soit trois catégories de sédiment (Briche *et al.*, 1998).

Tableau 48. Composition physico-chimique des sédiments étudiés dans le cadre du programme Cetmef/VNF (2001 à 2003) (unité : µg/g poids sec ; / : inférieur à la limite de détection)

Code sédiment	B2	B13	B22	12570	12730	12800	13990	17000
HAPs								
Acénaphène	/	/	/	/	/	/	/	/
Acénaphthylène	/	/	/	/	/	/	/	/
Anthracène	0.118	0.440	0.230	0.19	0.41	1.19	0.17	0.03
Benzo (a) anthracène	0.440	0.660	0.660	1.47	2.84	2.15	1.20	2.05
Benzo (3.4) pyrène	0.470	0.950	1.050	1.55	2.9	2.92	0.93	0.42
Benzo (3.4) fluoranthène	0.550	1.030	1.020	1.05	2.11	1.68	1.85	0.39
Benzo (11.12) fluoranthène	0.255	0.480	0.460	2.04	4.43	3.71	0.89	0.15
Benzo (11.12) pérylène	0.380	0.550	1.370	/	2.11	2.07	0.60	0.55
Chrysène	0.950	0.950	0.880	2.31	1.36	3.48	1.10	1.53
Di benzo (a,h) anthracène	0.080	0.120	0.300	0.78	1.18	0.18	0.03	0.04
Fluoranthène	0.870	1.600	1.450	1.64	7.36	4.67	0.68	2.53
Fluorène	/	/	0.060	0.07	0.14	0.27	0.07	0.30
Indéno (1,2,3-cd) pyrène	0.290	/	0.600	1.13	2.73	1.35	0.20	0.16
Naphtalène	/	/	/	/	/	/	/	/
Phénanthrène	0.510	1.300	0.840	1.23	2.29	2.52	0.53	3.96
Pyrène	0.950	1.500	1.330	3.31	6.34	5.59	1.84	7.00
PCB polychlorobiphenyl								
Equivalent Aroclor 1232	/	/	/	/	/	/	/	/
Equivalent Aroclor 1242	/	/	/	/	/	/	/	/
Equivalent Aroclor 1248	/	/	/	/	/	/	/	/
Equivalent Aroclor 1254	/	/	0.130	/	/	/	/	/
Equivalent Aroclor 1260	/	/	/	0.247	0.706	0.47	/	3.42
PCB 28	/	/	/	/	/	0.16	/	/
PCB 44	/	/	/	/	/	/	/	/
PCB 52	/	/	/	/	/	0.032	/	/
PCB 101	/	0.054	/	0.01	0.037	0.015	/	/
PCB 105	/	/	/	/	/	/	/	/
PCB 118	/	0.042	/	/	0.013	0.011	/	0.15
PCB 138	/	0.140	0.016	0.017	0.048	0.041	/	0.28
PCB 153	/	0.170	0.029	0.018	0.074	0.051	/	0.52
PCB 170	/	0.046	0.009	0.006	0.02	0.01	/	0.059
PCB 180	/	0.074	0.130	0.012	0.048	0.036	/	0.32
PCB 194	/	0.010	/	0.027	/	0.01	/	0.029
PCB 209	/	/	/	/	/	/	/	/
Métaux								
Arsenic	22.90	31.90	21.20	8.2	11.5	7.9	12	13.8
Cadmium	0.50	7.80	4.80	1.01	3.75	3.01	5.16	14.21
Chrome	18.50	1.90	22.20	84.64	43.86	74.61	45.6	272.14
Cuivre	24.70	739.90	49.40	45.34	97.85	82.61	17.9	188.49
Mercure	0.10	0.36	0.58	0.3	1.0	0.8	0.4	0.86
Nickel	/	/	/	53.73	62.32	68.77	16.54	178.33
Plomb	24.00	99.30	53.90	54.89	316.38	236.77	112.02	328.75
Zinc	145.00	1220.00	250	283.33	963.33	766.66	567.56	2704.53

Ces valeurs restent encore liées à des approches physico-chimiques et/ou à quelques valeurs seuils comme ceux de la norme NFU 44.041 de juillet 1985 adaptée aux boues des ouvrages de traitement des eaux usées urbaines. C'est pourquoi un programme à caractère méthodologique a été lancé par le Centre d'Etudes Techniques Maritimes et Fluviales (CETMEF) et Voies Navigables de France (VNF). Ce programme visait à proposer un premier cadre pour la mise au point d'une démarche d'évaluation des risques vis-à-vis des écosystèmes concernés par la gestion des sédiments extraits au cours des opérations de curage des cours d'eau navigables. Le travail a été mené conjointement par le Cemagref de Lyon et le L.S.E. (Babut et Perrodin, 2001 ; Garric *et al.*, 2001 ; Bray *et al.*, 2001 ; Babut *et al.*, 2002 ; Bray *et al.*, 2003 ; Babut *et al.*, 2003 ; Perrodin *et al.*, 2004). Deux scénarios de dépôt de sédiments ont été étudiés : le dépôt sur sol terrestre et le dépôt en gravière. Nous présenterons ici les méthodes mises en œuvre et les résultats pour le second scénario, pour lequel l'outil microcosme s'est naturellement avéré adapté. A ce stade, il s'agissait d'évaluer les impacts du remblaiement sur l'écosystème aquatique lentique de la gravière modélisé par les microcosmes 2 L reconstitués à partir du sédiment contaminé et d'une colonne d'eau synthétique. Il s'agissait également de montrer l'apport des essais en microcosmes 2 L dans une démarche d'évaluation des risques constituée de plusieurs étapes (**figure 58**) :

- une étape 1 d'évaluation sommaire des risques basée sur :

* une caractérisation physico-chimique du sédiment permettant de calculer un quotient de risque représenté par la moyenne des rapports, pour les principaux polluants du sédiment, entre la concentration totale de chaque polluant et un « seuil d'effet probable » (PEC), tiré de la littérature (MacDonald *et al.* 2000) :

$$Q_{PECM} = \frac{\sum_{i=1}^n \frac{C_i}{PEC_i}}{n} \quad (1)$$

Avec : C_i , concentration mesurée pour le paramètre i ; PEC_i , concentration seuil d'effet probable ; n , nombre de paramètres mesurés.

* la mise en œuvre de bioessais sur organismes benthiques dans le cas où ce quotient est compris entre une valeur basse (0.1) et une valeur haute (0.5) et permettant de confirmer ou non le potentiel toxique du sédiment,

- une étape 2 d'évaluation détaillée des risques mise en œuvre lorsque les bioessais donnent une réponse positive ou directement si le quotient de risque est > 0.5 . C'est à cette étape

qu'interviennent les essais en microcosmes, qui doivent permettre de préciser les risques dans un scénario où plusieurs paramètres peuvent être pris en compte, tels que le taux de remplissage de la gravière et le taux de renouvellement de la colonne d'eau alimentée par la nappe. Le microcosme permet en outre de travailler sur une durée d'exposition plus longue et différents organismes exposés dans les deux principaux compartiments de la gravière (colonne d'eau et sédiment).

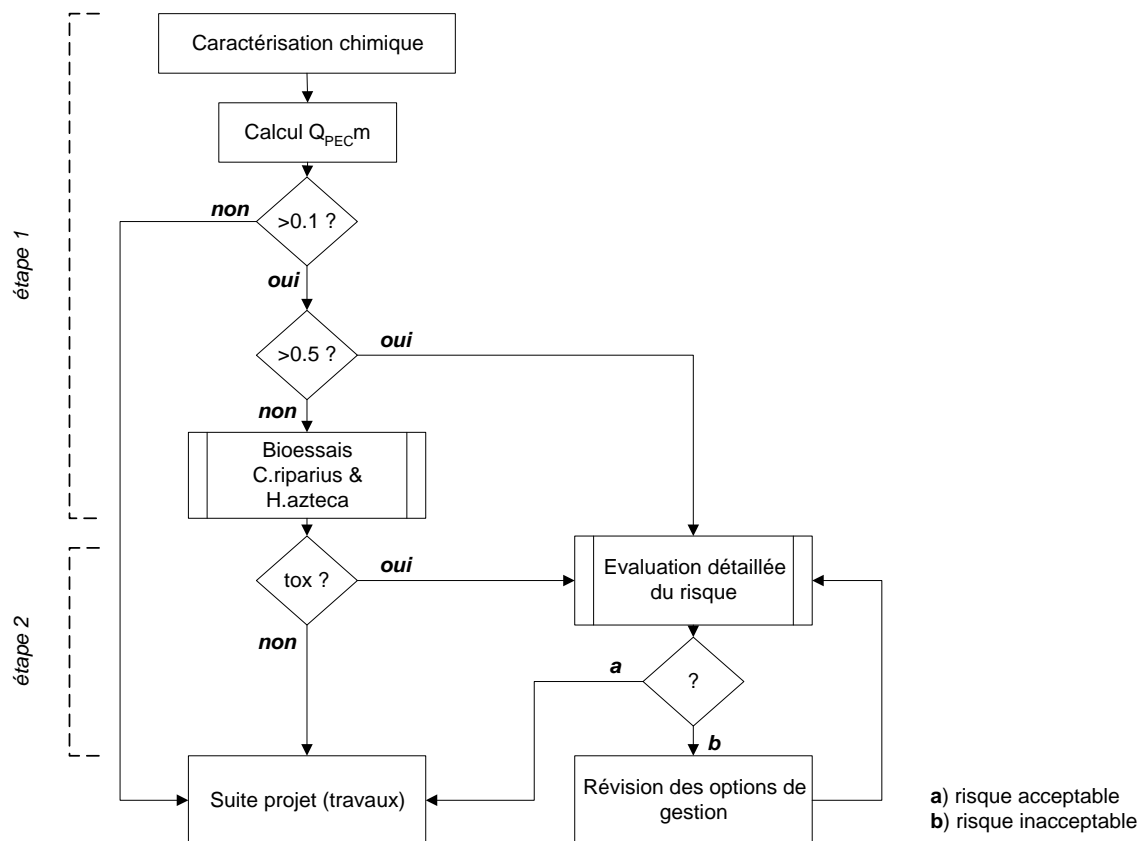


Figure 58. Logigramme de la démarche d'évaluation en deux étapes (Babut *et al.*, 2002)

Dans un tel scénario, les risques sanitaires liés aux usages de l'eau de la gravière et de la nappe doivent évidemment être pris en compte, mais cette évaluation repose sur d'autres approches que nous ne décrivons pas ici.

Les résultats de la démarche sont présentés de façon synthétique au **tableau 49** pour les 8 sédiments étudiés dans le cadre du programme. Trois sédiments prélevés dans le Canal de l'Est Branche Sud (CEBS), dans la région d'Epinal (Golbey, Vosges) ont d'abord été étudiés en première phase, puis 5 sédiments prélevés dans des canaux du Nord (région de Lille-Valenciennes), plus contaminés que les premiers (contexte industriel). On trouvera dans

Babut *et al.* (2001, 2003) et Triffault-Bouchet (2004) des commentaires détaillés. Trois couleurs ont été attribuées aux résultats pour souligner la plus ou moins forte toxicité potentielle (quotients de risque) ou observée (résultats des bioessais).

Différents quotients de risque ont été calculés à partir des métaux seuls, des 4 HAPs majoritaires dans les sédiments (chrysène, fluoranthène, phénanthrène et pyrène), des métaux + HAPs totaux + PCB (QPEC global1), des métaux + les 4 HAPs + PCB (QPEC global2) (voir détail des formules dans Babut *et al.*, 2003).

Les différents quotients fournissent des informations non nécessairement convergentes, mais permettent de conclure que :

- les sédiments B2 et 13990 sont potentiellement les moins dangereux,
- à l'opposé, le sédiment 17000 est potentiellement le plus dangereux,
- les sédiments 12730 et 12800 sont proches et juste en-dessous de 17000,
- le seuil de 0.5 est dépassé au moins une fois pour tous les sédiments, ce qui justifie la mise en œuvre de bioessais.

Le classement est le suivant :

$$B2 < 13990 < B22 < B13 < 12570 < 12730 = 12800 < 17000.$$

Les bioessais monospécifiques confirment dans l'ensemble les soupçons de toxicité pour les 8 sédiments et leur classement par ordre de toxicité croissante :

$$13990 < B2 = B22 < B13 < 12570 < 12730 = 12800 < 17000$$

Les essais sur *Chironomus riparius* font cependant apparaître en général une toxicité modérée, même pour 17000, alors que *Hyaella azteca* est beaucoup plus sensible. A l'issue de cette étape d'évaluation simplifiée des risques, une évaluation détaillée des risques s'avère nécessaire dans la mesure où les sédiments ont montré une toxicité significative pour au moins un des organismes testés.

Les résultats en microcosmes pour les organismes benthiques corroborent assez bien ceux des tests monospécifiques pourtant réalisés dans un autre laboratoire (Cemagref de Lyon), comme le montre la corrélation entre ces données (**figure 59**). Cette corrélation est meilleure ($R^2=0.894$) si l'on restreint l'analyse aux 5 sédiments du Nord. S'agissant des organismes pélagiques (*Daphnia magna* et *Lemna minor*), les essais en microcosmes révèlent, sauf pour le sédiment 13990 et les trois sédiments du CEBS, une forte toxicité vis-à-vis des daphnies sur une durée d'exposition d'au moins 20 jours, alors que la croissance des lentilles d'eau est

stimulée sur la base du nombre de frondes (multiplication végétative) mais significativement inhibée en termes de biomasse (taille des frondes). Les résultats concernant la croissance algale en microcosmes ne sont pas pris en compte du fait des interactions algues-daphnies (broutage) qui ne permettent pas d'interpréter de façon simple les données de chlorophylle.

Tableau 49. Synthèse des résultats de caractérisation physico-chimique et écotoxicologique de 8 sédiments étudiés dans le cadre du programme de recherche CETMEF/VNF (données extraites de Babut *et al.* (2001) et Triffault-Bouchet (2004) ; les données de toxicité sont des unités toxiques (UT) ou des % d'effet ; f = frondes ; b = biomasse)

Code VNF sédiment	B2	B13	B22	12570	12730	12800	13990	17000
Q _{PEC} métaux	0.25	1.62	0.52	0.49	1.12	0.97	0.59	2.49
Q _{PEC} HAPs	0.55	0.89	0.73	1.44	2.62	2.66	0.70	2.56
Q _{PEC} global1	0.21	0.59	0.76	0.46	1.04	0.91	0.34	1.78
Q _{PEC} global2	0.31	0.74	0.86	0.69	1.37	1.32	0.43	2.35
Essais monospécifiques								
<i>B. calyciflorus</i> reprod 48 h, UT	1.5	1.3	1.5	2.7	2.6	5.5	< 1	10.0
<i>H. azteca</i> mortalité 14 j	31.4	58.6	31.4	88.6	87.1	95.7	7.1	100
<i>C. riparius</i> mortalité 10 j	10	11.4	4.3	11.4	14.3	17.1	11.1	1.4
<i>C. riparius</i> inhib croiss 10 j	22.7	63.6	36.4	-15.2	-12.4	-23.8	-6.7	28.6
Essais en microcosmes								
<i>H. azteca</i> mortalité 30 j	10	26.7	33.3	86.7	86.7	76.7	20	100
<i>H. azteca</i> inhib croiss. 30 j	pas d'effet		pas d'effet					
<i>C. riparius</i> mortalité 30 j	pas d'effet		50	9.3	9.3	15.1	28	30.7
<i>C. riparius</i> inhib croiss 10 j	pas d'effet		-17.3	17.3	-4.9	-13.8	27.6	
<i>D. magna</i> mortalité 10 j	<10%		10	14.4	11.1	16.7	58.9	
<i>D. magna</i> mortalité 20 j	<20%		90	76.7	96.7	3.3	100	
<i>D. magna</i> reprod 30 j	pas d'effet		44.0	55.2	67.2	25.0	57.4	
<i>L. minor</i> inhib croiss 30 j (f)	pas d'effet		-731	-752	-696	-286	0	
<i>L. minor</i> inhib croiss 30 j (b)	-24.9	-7.6	-46.3	53.6	53.6	53.6	58.3	83.3
<i>L. stagnalis</i> dommages ADN	2.1	3.2	1.5	2.5	4.0	1.5	2.0	5.0
Score d'effet total	2	4	4	8	12	11	7	15
	<div style="display: flex; justify-content: space-between; align-items: center;"> <div style="width: 20px; height: 15px; background-color: #00FF00; border: 1px solid black;"></div> absence de toxicité, ou stimulation ; Q_{PEC} < 0.50 </div> <div style="display: flex; justify-content: space-between; align-items: center; margin-top: 5px;"> <div style="width: 20px; height: 15px; background-color: #FFD700; border: 1px solid black;"></div> toxicité modérée ; 0.50 < Q_{PEC} < 1.50 </div> <div style="display: flex; justify-content: space-between; align-items: center; margin-top: 5px;"> <div style="width: 20px; height: 15px; background-color: #FF0000; border: 1px solid black;"></div> toxicité élevée ; Q_{PEC} > 1.50 </div>							

C'est en partie également vrai pour les résultats sur daphnies, qui dépendent réciproquement des effets éventuels (inhibition ou stimulation) sur la croissance algale, mais on peut, au travers des données de survie des mères et des données de reproduction, porter un jugement

pas trop biaisé sur la réponse des daphnies à la présence des sédiments, d'autant que ceux-ci n'ont pas entraîné une toxicité aiguë vis-à-vis des algues. Dans les essais en microcosmes, nous avons également pris en compte les dommages à l'ADN évalués au moyen de l'essai comètes (Devaux *et al.*, 1997) sur le gastéropode pulmoné *Lymnaea stagnalis* (Clément *et al.*, 2004) testé dans les mêmes conditions mais séparément compte tenu des perturbations engendrées par ces organismes (excréta) et de la nécessité de les nourrir en propre (laitue). Pour pouvoir apprécier globalement les réponses des microcosmes, nous avons utilisé une classification basée sur des scores d'effet proposés par Den Besten *et al.* (1995). Les résultats pour les 5 sédiments du Nord sont détaillés dans Triffault-Bouchet (2004). Ces résultats montrent que les sédiments 17000 et 13990 se distinguent nettement des autres sédiments du Nord par une plus grande toxicité pour le premier et par une toxicité plus faible pour le second, alors que 12570, 12730 et 12800 présentent des scores proches dénotant une toxicité moyenne. Les 3 sédiments du CEBS sont les moins toxiques, avec des scores de 2 à 4 (**tableau 49**).

Les trois étapes d'évaluation des risques fournissent des informations globalement concordantes sur les huit sédiments, notamment pour ce qui concerne leur classement. L'étape basée sur les quotients de risque permet de suspecter une toxicité potentielle. Les essais monospécifiques confirment la toxicité vis-à-vis de certains organismes benthiques (amphipodes) mais également ubiquistes (rotifères exposés aux eaux interstitielles diluées).

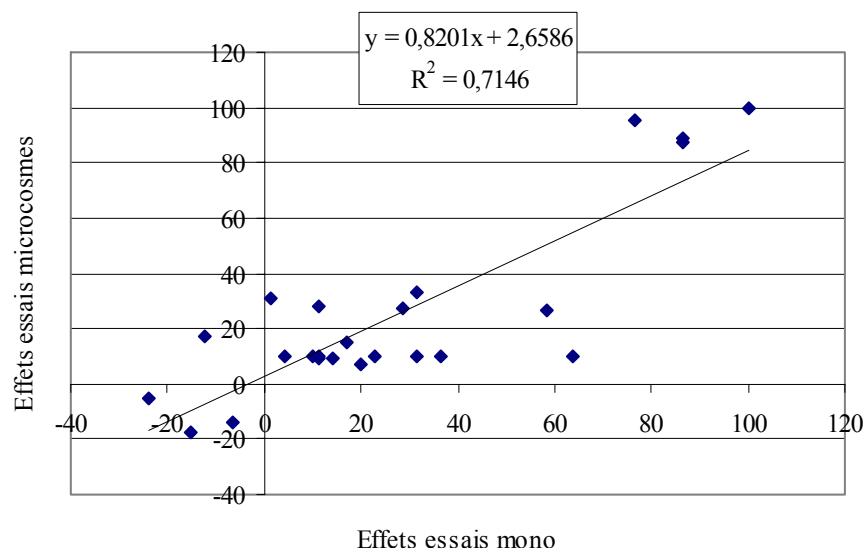


Figure 59. Corrélation entre essais monospécifiques et essais en microcosmes sur les données relatives aux réponses des organismes benthiques (*C. riparius* et *H. azteca*) en présence de 8 sédiments

Les essais en microcosmes permettent de tester les sédiments dans des conditions qui se rapprochent de celles d'un scénario d'immersion en gravière, et de confirmer la toxicité des sédiments vis-à-vis des amphipodes. Les organismes pélagiques (daphnies, lentilles d'eau, limnées) exposés dans la colonne d'eau au-dessus des sédiments montrent vis-à-vis des 5 sédiments du Nord une sensibilité assez élevée sans qu'on puisse relier les effets observés aux contaminants de l'eau (Triffault-Bouchet, 2004). En revanche, si l'on prend en compte le fait que daphnies et limnées sont également exposées aux polluants particuliers du sédiment par leur activité de broutage en surface, phénomène que nous avons déjà mis en évidence pour les daphnies dans les essais sur HAPs (*cf* 2.5.1), ou/et à la fraction particulaire ou colloïdale de l'eau non prise en compte dans les analyses réalisées sur échantillons filtrés, il est plus facile de comprendre les effets observés. On note ici l'intérêt des essais en microcosmes qui permettent une évaluation large de la toxicité des sédiments contaminés vis-à-vis de l'ensemble d'un écosystème aquatique.

Dans la démarche d'évaluation des risques écologiques liés à l'immersion de sédiments en gravière, les paramètres d'évaluation suivants ont été retenus (Babut *et al.*, 2002) :

- le dépôt de sédiment en gravière ne devra pas perturber la structure et les effectifs des peuplements d'invertébrés benthiques ;
- il ne devra pas non plus entraîner d'effets à long terme sur les espèces vivant dans la colonne d'eau.

La difficulté est de déterminer les critères de conservation de l'intégrité d'un écosystème, sachant que ceci ne devrait pas signifier absence de toute perturbation, et le lien entre les premiers et les critères retenus pour les bioessais mis en oeuvre. La capacité d'homéostasie des écosystèmes peut leur permettre de récupérer après une perturbation, qu'elle soit physique (crue dans le cas d'un cours d'eau par exemple) ou toxique (rejet accidentel par exemple). On peut certes choisir des critères sévères, par exemple absence d'effet significatif sur la survie, la croissance ou la reproduction, mais cela peut avoir pour conséquence de surestimer le risque réel lorsque les résultats ne permettent pas de prendre en compte des phénomènes compensateurs fonction des conditions du milieu (par exemple biodégradation, divers processus de réduction de la biodisponibilité tels que la complexation des toxiques avec les matières organiques dissoutes, l'adsorption particulaire, la transformation d'une espèce chimique toxique en une espèce moins toxique, biotransformation des toxiques, mécanismes de réparation des dommages à l'ADN tels que ceux mis en évidence sur les limnées, etc.), ou encore lorsque la survie d'une population et/ou de l'écosystème n'est pas menacée.

Surestimer les risques conduit à rejeter un scénario de gestion (stockage sans confinement, valorisation) pour un nombre excessif de sédiments, pour lesquels l'alternative est dans ce cas un scénario plus coûteux de type traitement ou confinement, ce qui peut conduire à un blocage. Il est donc indispensable de justifier au mieux les choix des critères biologiques pris en compte pour caractériser le fonctionnement de l'écosystème (ici un écosystème lentique), et de choisir des systèmes expérimentaux aptes à représenter le plus fidèlement possible les conditions du scénario étudié. Les essais en microcosmes 2 L constituent à ce titre un progrès par rapport aux essais monospécifiques, mais il est possible d'aller plus loin, comme nous le verrons dans la seconde partie de ce chapitre.

Avant de passer à des systèmes expérimentaux plus complexes, il est possible d'affiner l'évaluation des risques à partir d'essais en microcosmes 2 L en faisant varier quelques paramètres clés du scénario étudié. C'est que nous avons fait à titre exploratoire sur le sédiment 12570 (Triffault-Bouchet, 2004), en prenant en compte le taux de remplissage de la gravière qui accueillerait ce sédiment (L : S de 2.5, 6.7 et 13.3, aucun renouvellement), ainsi que le taux de renouvellement de l'eau lié à l'écoulement de la nappe qui alimente la gravière (colonne d'eau renouvelée à 25% ou 50% une fois par semaine, pour le ratio L : S de 2.5).

Nous avons fait l'hypothèse que les effets attendus étaient logiquement fonction d'une part de la quantité de sédiment immergée, et d'autre part du taux de renouvellement de l'eau qui permet d'exporter plus ou moins rapidement les polluants.

Les résultats montrent que la colonne d'eau s'enrichit d'autant plus que le ratio eau : sédiment diminue, mais seulement pour une partie des paramètres suivis : quelques ions majeurs (Cl^- , SO_4^{2-} , Ca^{2+}), COD, quelques métaux (Cu, Ni et Pb en début d'essai). De nombreux paramètres ne sont donc pas sensibles à la proportion de sédiment. Si les algues et les lentilles d'eau montrent une croissance similaire pour les trois ratios L : S, la survie et la reproduction des daphnies sont en revanche nettement diminuées pour le plus faible ratio. Les amphipodes sont également sensibles à une diminution du ratio, ce qui n'est pas le cas des chironomes dont la survie et l'émergence sont identiques dans tous les traitements. Le renouvellement de la colonne d'eau permet de limiter son enrichissement en ions, métaux et MOD. La survie des daphnies et amphipodes est améliorée mais reste faible. La croissance des lentilles d'eau est légèrement moins élevée qu'en l'absence de renouvellement.

Ces résultats montrent qu'un ratio L : S élevé, c'est-à-dire un taux de remplissage faible (par exemple L : S de 10, correspondant à n'introduire « que » 4000 m³ de sédiment dans une petite gravière de 100 m par 200 m et 1.50 m de profondeur), est de nature à réduire les risques pour l'écosystème, comme on pouvait s'y attendre, sans toutefois les ramener, pour le

sédiment 12570 étudié, à un niveau acceptable. L'impact du renouvellement de l'eau, phénomène observé dans les gravières non colmatées alimentées par la nappe, s'est avéré limité pour le même sédiment. Si le taux de renouvellement correspondant (renouvellement complet de la colonne d'eau en 4 ou 2 semaines) est faible au regard de ce qui est souvent mis en œuvre dans les tests sur sédiments (Bonnet, 2000), il faut s'attendre à des taux de renouvellement du même ordre de grandeur voire plus faibles *in situ*, compte tenu des vitesses de nappe (de l'ordre de 2 km/an, Eedems (2004)) et des volumes des gravières : pour notre exemple de petite gravière (cf ci-dessus), le renouvellement complet des eaux est réalisé en 20 à 40 jours selon que la longueur perpendiculaire au flux d'eau est 100 ou 200 m.

2.5.4.3. Etude de l'immersion en gravière de sédiments de dragage traités

2.5.4.3.1. Approche expérimentale proposée

Le dépôt de sédiments contaminés en gravière peut présenter des risques pour l'écosystème aquatique « gravière » et la nappe alluviale qui le traverse, si les sédiments relarguent des flux polluants non compatibles avec les usages concernés (loisirs, écologie, alimentation en eau potable), comme cela a été démontré dans le programme de recherche avec VNF et le CETMEF (cf 3.4.2).

C'est pourquoi un traitement préalable des sédiments pourrait permettre d'aboutir à des matériaux éocompatibles avec le scénario de dépôt en gravière. Un tel traitement est proposé par la société SOLVAY, qui a demandé au L.S.E. (Bernard Clément, Nicolas Cauzzi) en partenariat avec EEDEMS (Robert Moretto) et POLDEN-INSAVALOR (Emmanuel Vernus et Mohammed Abdelghafour) d'en évaluer les impacts dans le cas d'une immersion en gravière. Les résultats obtenus devraient être généralisables à d'autres scénarios d'utilisation sous eau, par exemple création de digues. Le traitement, appelé Novosol®, consiste à piéger les métaux par ajout d'acide orthophosphorique (phosphatation), puis à sécher le sédiment phosphaté avant de le calciner afin d'éliminer les composés organiques (**figure 60**).

L'évaluation proposée par le groupement d'étude a reposé sur une approche graduée :

- en 1^{ère} phase (2003), 3 sédiments déjà étudiés dans le programme CETMEF/VNF (12570, 13990 et 17000) ont été prélevés, auxquels a été appliqué le traitement Novosol® ; les sédiments bruts et traités ont été caractérisés sur les plans physico-chimique et granulométrique, puis testés en microcosmes de 2 L,
- en 2^{ème} phase (2004), l'un des 3 sédiments de la phase précédente a été retenu (17000), traité et caractérisé de la même façon qu'en phase 1, testé en microcosmes de 100 L de

sorte à mesurer les effets sur une plus grande diversité d'organismes sur une plus longue période (3 à 4 mois) et étudier la phase d'immersion proprement dite (**figures 61 et 62**); deux essais successifs ont été mis en œuvre au cours de la même année,

- en 3^{ème} phase (2005), le même sédiment a été traité, caractérisé de la même façon, et testé en pilote de gravière, système de laboratoire permettant de simuler le fonctionnement hydrodynamique d'une gravière (matériau de type gravier et écoulement au travers de ce matériau et du sédiment étudié) et dans lequel des organismes ont été introduits afin d'évaluer les effets sur plusieurs mois.



Figure 60. Le sédiment 17000 avant (photo de gauche) et après traitement par le procédé Novosol® (photos B. Clément)

De la 1^{ère} à la 3^{ème} phase, l'approche adoptée a augmenté en réalisme et en complexité (**tableau 50**) :

- renouvellement de l'eau, absent en microcosmes 2 L, intermittent en microcosmes 100 L, et continu en gravière pilote,
- mode d'introduction du sédiment, qui simule, pour les microcosmes 100 L et les gravières pilotes, le déversement et permet d'observer les effets propres à l'immersion (turbidité, apport d'eau interstitielle pour le sédiment brut, relargages de M.O. et de contaminants) puis les effets en phase de post-dépôt,
- diversité spécifique croissante (5 espèces en microcosmes 2 L, 12 espèces pour les autres systèmes),
- durée d'exposition croissante (30 jours en microcosmes 2 L, 70 à 87 jours pour les autres essais).



Figure 61. Les microcosmes 100 L après immersion des sédiments 17000 brut et traité (programme Novosol® phase 2)

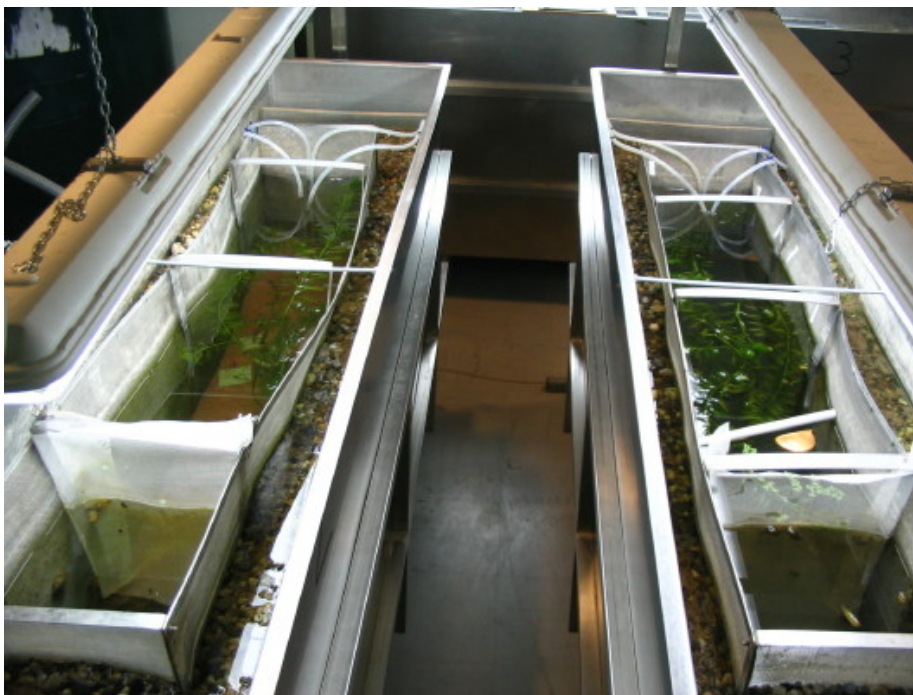


Figure 62. Gravières pilotes après immersion des sédiments 17000 brut (à droite) et traité (à gauche) (programme Novosol® phase 3)

2.5.4.3.2. Résultats

Les résultats des trois phases du programme font l'objet d'un rapport final en cours de rédaction et du rapport de thèse de Nicolas Cauzzi également en cours de rédaction, nous n'en donnerons ici qu'un aperçu destiné à montrer les principaux résultats qui peuvent être dégagés de cette approche à plusieurs niveaux, et en nous appuyant uniquement sur le sédiment 17000 qui a été étudié au cours des trois phases.

Le déroulement du programme sur 3 ans a nécessité plusieurs prélèvements du même sédiment 17000, dont les compositions physico-chimiques sont présentées au **tableau 51**. L'échantillon prélevé antérieurement dans le cadre du programme CETMEF/VNF est également représenté dans ce tableau. La granulométrie change assez peu sur l'ensemble des 4 prélèvements. Par ailleurs, les deux prélèvements Novosol® réalisés en 2003 sont proches en termes de contamination organique et minérale, malgré quelques écarts ponctuels (pour le plomb par exemple). Le dernier prélèvement (juillet 2004) est plus proche du prélèvement de 2001 réalisé dans le cadre du programme CETMEF/VNF, avec des teneurs en HAPs bien inférieures à celles des deux autres prélèvements. Ces prélèvements de 2001 et 2004 sont également plus proches pour les teneurs en métaux. Ces écarts peuvent être liés à l'échantillonnage, au facteur temps, au mode de prélèvement utilisé (dragage ou « seringue »). Les résultats des quatre essais sont synthétisés au **tableau 52** et présentés paramètre par paramètre pour faciliter les comparaisons.

En général, l'immersion du sédiment 17000 brut n'a pas ou peu d'incidence sur le pH de la colonne d'eau, alors que celle du même sédiment traité se traduit par une augmentation significative ou pas d'effet du tout. Les différences de milieu utilisés dans les quatre essais peuvent expliquer ces écarts. L'absence d'effet sur le pH est observée dans l'essai 2 L et dans le deuxième essai 100 L, où le même milieu synthétique a été utilisé, alors que l'augmentation de pH est observée en eau de nappe (essai 100 L n°1) ou en eau de réseau (essai gravière).

Dans tous les essais où les sédiments sont immergés par gravité, l'immersion se traduit par une turbidité (M.E.S.) qui ne dure pas plus d'une semaine et est plus importante pour le sédiment brut. Si sédiments brut et traité présentent des granulométries très proches, le traitement aboutit à agréger des particules fines et les agrégats ainsi formés améliorent la décantabilité.

Tous les essais montrent que l'immersion du sédiment traité n'a pas d'effet sur la teneur en oxygène dissous de la colonne d'eau, alors que celle du sédiment brut conduit à une diminution logiquement expliquée par l'apport de M.O.. Dans l'essai gravière, nous avons

observé un phénomène particulier de production d'oxygène qui s'est manifesté par un écart positif aval-amont et que nous supposons lié à la réduction du chrome VI en chrome III.

La conductivité de l'eau surnageante n'est sensible qu'à l'immersion du sédiment traité, avec une augmentation de 400 à 1100 $\mu\text{S}/\text{cm}$ selon l'essai. En essais statiques (pas de renouvellement, essai 2 L) ou semi-statiques (renouvellement intermittent, essais 100 L) la conductivité augmente continuellement ou n'aboutit à un plateau que du fait des renouvellements.

Tableau 50. Caractéristiques des essais sur sédiments bruts et traités mis en œuvre dans les différentes phases du programme Novosol® ^(a) ratio de départ, augmente par la suite du fait du renouvellement en continu ; ^(b) 1^{er} essai ; ^(c) 2^{ème} essai ; prod I : producteurs primaires ; inv. Pél. : invertébrés pélagiques ; inv. Benth. : invertébrés benthiques ; Lm : *Lemna minor* ; Ps : *Pseudokirchneriella subcapitata* ; Sp : *Spirodela polyrhiza* ; Fa : *Fontinalis antipyretica* ; Ec : *Elodea canadensis* ; Ms : *Myriophyllum spicatum* ; Dm : *Daphnia magna* ; Cd : *Ceriodaphnia dubia* ; Sv : *Simocephalus vetulus* ; Pa : *Physa acuta* ; Ls : *Lymnaea stagnalis* ; Ha : *Hyaella azetca* ; Cr : *Chironomus riparius*)

	Microcosmes 2 L	Microcosmes 100 L	Gravières pilotes
Sédiments étudiés	13990, 12570, 17000 bruts et traités	17000 brut et traité	17000 brut et traité
Phase	1	2	3
Nombre d'essais	1	2	1
Volume système	2 L	100 L	1000 L
Volume en eau	2 L	100 L	180 L
Sédiment propre	non	séd. Aiguebelette 5 kg frais	séd. Aiguebelette 9 kg frais
Sédiment brut	100 g sec (173 à 250 g frais)	10 ^(b) ou 5 ^(c) kg frais (4 ^(b) ou 2 ^(c) kg secs)	18 kg frais (7 kg secs)
Sédiment traité	100 g sec	10 ^(b) ou 5 ^(c) kg secs	18 kg secs
Ratio L : S (S en poids sec)	20	séd brut : 25 ^(b) ou 50 ^(c) séd traité : 10 ^(b) ou 20 ^(c)	séd brut : 20 ^(a) séd traité : 10 ^(a)
Eau	milieu synthétique	eau de nappe ^(b) ou milieu synthétique ^(c)	eau du réseau enrichie
Renouvellement eau	non	10 L/semaine intermittent	5 L/heure en continu
Réplicats témoins	3 à 9	6 puis 2	3 puis 1
Réplicats contaminés	3 à 9	2	1
Organismes	prod I : Lm, Ps inv. pél.: Dm inv. benth. : Ha, Cr	prod I : Lm, Sp, Ps, Fa, Ec inv. pél.: Dm, Cd, Sv, Pa, Ls inv. benth. : Ha, Cr	prod I : Lm, Sp, Ps, Ec, Ms inv. pél.: Dm, Cd, Sv, Pa, Ls inv. benth. : Ha, Cr
Durée pré-immersion	aucune	114 ^(b) - 84 ^(c) jours	35 jours
Mode introduction sédiment	immersion non perturbatrice	immersion brutale gravitaire	immersion brutale gravitaire
Durée post-immersion	30 jours	30 ^(b) - 87 ^(c) jours	70 jours

En essai dynamique (renouvellement en continu, essai gravière), un maximum est observé dans les premières heures avant un retour à des valeurs normales. Ce type de variations en

essai gravière est observé pour la plupart des paramètres physico-chimiques, le renouvellement en continu de l'eau permettant d'éliminer les polluants émis lors de l'immersion et au cours de la phase de post-dépôt.

Tableau 51. Composition physico-chimique des différents prélèvements du sédiment 17000 étudié au cours des programmes « Cetmef/VNF » et « Novosol® » (I, II et III sont relatifs aux 3 phases du programme Novosol®)

Prélèvement	12/04/2001	29/01/2003	27/11/2003	juil-04
Programme	Cetmef/VNF	Novosol I	Novosol II	Novosol III
Granulométrie				
% sable 200-2000 µm	9.9	14.2	14.7	19.6
% sable fin 200-50 µm	12.8	19.1	18.8	23.1
% limon + argile < 50 µm	77.3	66.7	66.5	57.2
Teneur en eau (%)	70.3	65	59	64.5
COT (%)	8.6	5.4	3.8	5.9
Perte au feu (%)		17.0		
HAPs mg/kg ms				
Acénaphène	< LD	1.46	1.15	0.19
Acénaphylène	< LD	< 1.0	< 1.0	< 0.1
Anthracène	0.03	3.3	5.4	0.63
Benzo (a) anthracène	2.05	4.4	5.1	1.06
Benzo (a) pyrène	0.42	3.7	4.3	0.97
Benzo (b) fluoranthène	0.39	4.8	5.1	2.22
Benzo (k) fluoranthène	0.15	2.2	2.7	0.65
Benzo (ghi) pérylène	0.55	2.8	2.3	0.92
Chrysène	1.53	5.4	6.7	1.48
Di benzo (a,h) anthracène	0.04	7.5	1.6	0.37
Fluoranthène	2.53	15.3	14.3	2.56
Fluorène	0.3	3.2	2.6	0.43
Indéno (1,2,3-cd) pyrène	0.16	4.8	8.5	0.91
Naphtalène	< LD	0.36	< 1.50	0.15
Phénanthrène	3.96	18.6	12.9	2.62
Pyrène	7	9.1	9.6	2.35
Somme 16 HAPs	19.11	86.92	82.25	17.51
Métaux mg/kg ms				
Arsenic	13.8	nd	nd	10.9
Cadmium	14.2	103.4	83.8	6.8
Chrome	272.1	224.6	187.3	231.6
Cuivre	188.49	150.3	145.6	213.2
Mercure	0.86	nd	nd	1.5
Nickel	178.3	118.7	89.7	257.4
Plomb	328.8	541.3	269.0	300.7
Zinc	2704.5	2076.0	2158.0	2147.1

Les variations de conductivité observées dans tous les essais en présence de sédiment traité sont à mettre majoritairement sur le compte des émissions de sulfates (maximum de 175 à 330 mg/L selon l'essai), de phosphates (pic de 3.5 à 5 mg/L si l'on exclut l'essai 100 L n°1 où un

excès de N et P a été apporté au milieu avant immersion), et de calcium (pic de 200 à 370 mg/L en essais 2 et 100 L, mais de seulement 70 mg/L en essai gravière, ces écarts pouvant être expliqués par des conditions d'équilibre calco-carbonique différentes). Les teneurs en autres ions (Cl^- , K^+ , Mg^{2+} , Na^+) augmentent également mais de façon plus modérée et avec moins d'écart entre les deux sédiments.

L'immersion du sédiment brut se traduit dans tous les cas (sauf essai 100 L n°1 où les teneurs sont élevées partout du fait d'un enrichissement excessif) par une augmentation d'ammoniaque dans la colonne d'eau, alors que le sédiment traité n'induit aucune émission pour ce paramètre. L'émission d'ammoniaque est suivie par un pic de nitrates (essai 2 L et essai 100 L n°2) lié à l'oxydation de l'ammoniaque. L'absence d'aération forcée dans l'essai gravières et le niveau moyen d'oxygène dissous (environ 50%) qui en découle expliquent peut-être l'absence de pic de nitrates (teneurs identiques partout).

Si le comportement des métaux peut varier légèrement selon l'essai, du fait de conditions physico-chimiques différentes (composition du milieu, pH, rédox), tous les essais montrent les mêmes tendances :

- aucune mobilisation du cadmium, en teneur toujours inférieure à la limite de détection,
- présence épisodique de cuivre (essai 2 L), le plus souvent non détecté,
- émission variable de zinc selon l'essai, toujours à des teneurs significatives mais non écotoxiques ($< 100 \mu\text{g/L}$) et un peu plus marquées pour le sédiment brut,
- émissions de nickel plutôt liées au sédiment brut, à des teneurs cependant faibles ($30 \mu\text{g/L}$),
- émissions de chrome caractéristiques du sédiment traité, importantes dans tous les essais (130 à $470 \mu\text{g/L}$), et probablement en grande partie sous forme chrome VI à des teneurs écotoxiques comme le montre le suivi réalisé dans l'essai gravière.

S'agissant des effets sur les organismes des microcosmes, les résultats dépendent des organismes et des essais, mais l'on retrouve des tendances observables à toutes les échelles. Ainsi le cladocère *Daphnia magna* est-il relativement indifférent au sédiment brut, que celui-ci soit à l'état déposé (essais 2 L) ou apporté par immersion (autres essais), alors que sa survie et sa reproduction sont affectées par le sédiment traité, très probablement du fait des teneurs en chrome.

Tableau 52. Effets liés à l'immersion du sédiment 17000 brut ou traité dans différents systèmes expérimentaux

	Essai 2 L	Essai 100 L n°1	Essai 100 L n°2	Essai gravière
pH	Pas de diff entre séd brut et traité	Augmentation à pH9 les 1ères heures séd traité puis écart faible traité/brut (0.5)	Pas d'effet du séd traité sur le pH ; pH légèrement plus faible avec séd brut	Elévation de pH séd traité : pH8.8 à 1h vs 7.6 séd brut et témoin
MES	Quasiment pas de MES en l'absence de brassage	+ élevée séd brut décantation rapide (qqes jours)	+ élevée séd brut décantation rapide (qqes jours)	+ élevée séd brut décantation rapide (qqes jours)
O ₂ dissous	<i>A compléter</i>	Pas d'effet en séd traité, baisse en séd brut	Idem essai n°1	Idem essais 100 L
Conductivité	Augmente en séd traité : + 1100 µS/cm en 30 jours	Augmente en séd traité : + 500 µS/cm en 30 jours	Augmente en séd traité : + 600 µS/cm en post-immersion	Augmente en séd traité : + 400 µS/cm à 1h puis décroît
SO ₄ ²⁻	Emission en séd traité : 265 ppm à j30 vs 110 brut	Emission en séd traité : 330 ppm à j30 vs 45 séd brut	Emission en séd traité : 290 ppm à j30 vs 60-90 séd brut	Emission en séd traité : 175 ppm à 1h vs 40 séd brut
PO ₄ ³⁻	Emission en séd traité : 3.45 mg/L à j30 vs 0.05 pour brut	Teneurs très élevées partout (12-13 ppm)	Pic de PO4 (3.5 ppm) à 24h séd traité, à 4 j (4 ppm) séd brut	Pic de PO4 séd traité (5 ppm à 4h vs 0.5 ailleurs)
Cl ⁻	+15 ppm séd brut et traité vs témoin	+5 ppm séd brut et traité vs témoin	Pas de différences	+10 ppm séd traité et +2 séd brut vs témoin
Ca ²⁺	Emission en séd traité : 370 ppm à j30 vs 42 pour brut	Emission en séd traité : 200-250 ppm à j30 vs 100 ailleurs	Emission en séd traité : 162-166 ppm à j30 vs 60 ailleurs	Faible émission en séd traité et brut : 70 ppm à 1h vs 60 témoin
K ⁺ , Mg ²⁺ , Na ⁺	Emission en séd traité (légèrement sup)	Emission en séd traité (légèrement sup)	Pas de mesures pour K et Mg ; pas de diff pour Na ⁺	Emission en séd traité (légèrement sup)
NH ₄ ⁺	Pas d'émission en séd traité, contrairement au séd brut	Pas d'effet mais on est à des valeurs élevées partout (27-53 ppm)	Emission en séd brut (10 ppm à j3), pas d'effet en séd traité	Emission en séd brut (9 ppm à 4h vs <0.5 ailleurs), rien en séd traité
NO ₃ ⁻	Pas d'émission en séd traité, contrairement au séd brut	Pas d'effet mais on est à des valeurs élevées partout (207-220 ppm)	Transformation NH4 en NO3 (25 ppm à j20), pas d'effet séd traité	Teneurs stables et identiques (10-15 ppm) pas de différences
Cd	< LD	< LD	< LD	<LD
Cu	Un peu + séd traité mais < 10 µg/L	<LD sauf à 1 h (11 à 61 µg/L) pas de diff. séd	< LD	<LD
Ni	<LD séd traité 16 à 30 µg/L séd brut	Séd brut et séd traité idem	25 µg/L séd brut <LD séd traité	<LD
Zn	Faible en brut et traité ; un peu + séd brut	30 à 100 µg/L pas diff séd (variabilité)	10-17 et 15-25 µg/L un peu + séd brut	< 100 µg/L pas de différences séd brut et traité
Cr	Emission séd traité : 300 à 350 µg/L (constant sur 30 jours)	Emission séd traité : 150 à 400 µg/L sur 30 jours	Emission séd traité : pic à 130 µg/L à 24 h puis baisse jusqu'à 7 ppb à 91 jours	Emission séd traité : 470 µg/L à 1h puis disparaît en 1 semaine
Cr VI	Non mesuré	Non mesuré	Non mesuré	400 µg/L puis disparaît en 1 semaine

Tableau 52 (suite et fin). Effets liés à l'immersion du sédiment 17000 brut ou traité dans différents systèmes expérimentaux

	Essai 2 L	Essai 100 L n°1	Essai 100 L n°2	Essai gravière
Daphnies <i>Daphnia magna</i>	Séd traité toxique pour survie et repro, séd brut non toxique	Problème général de survie, pas possible de détecter effets	Survie en séd traité mais développement limité, meilleur en séd brut	Retard de dével pop en séd traité, comblé en fin d'essai
Cériodaphnies	/	Idem <i>D. magna</i>	Idem <i>D. magna</i>	Bon dével en séd traité, survie difficile en séd brut
<i>Simocephalus</i>	/	Idem <i>D. magna</i>	Idem <i>D. magna</i>	/
Amphipodes	Mauvaise survie dans les deux séd	Survie nulle partout	Faible développement des populations, pas de diff selon séd	Tox de l'eau juste après immersion ; survie en séd brut affectée, pas en séd traité
Chironomes	Survie meilleure en séd traité	Emergence entre 50 et 70%, variabilité donc pas possible de détecter des effets	Emergence entre 30 et 65% avant contam, variabilité trop élevée	Emergence médiocre partout (<15%)
Lentilles	Légère stimulation en séd brut, pas d'effet en séd traité sauf chlorose	Croiss stimulée en séd brut, pas d'effet en séd traité	Forte stimulation en séd brut, inhibition en séd traité	Croiss inhibée en séd traité, stimulée en séd brut
Micro-algues	Croissance stimulée en séd brut, pas en séd traité	Croissance difficile partout, pas d'effet des sédiments	Croissance limitée, pas d'effets des sédiments	Croissance limitée, pas d'effets des sédiments
Macrophytes enracinées	/	Mauvaise croissance	Bonne croissance des 2 espèces, pas d'effets des séd	Croissance meilleure en séd brut ou en séd traité selon l'espèce ; pas d'inhibition dans tous les cas
Périphyton	/	Pas d'effets	Pas d'effets	Pas de mesures
Limnées	/	Mauvaise survie partout	Bonne survie, pas d'effet des sédiments	Bonne survie, meilleure repro en séd traité qu'en séd brut
Physes	/	Effet plus rapide en séd traité, effet plus tardif en séd brut	Bon développement des populations, pas d'effet des sédiments	Bon développement des populations, léger effet en séd traité
Oligochètes	/	Pas d'observations	Bonne survie en séd traité	

Le renouvellement intermittent (essais 100 L) ou continu (essai gravière) de la colonne d'eau, auquel correspond une diminution des teneurs en chrome et chrome VI, permet à la population de se développer une fois passés les effets aigus. Deux autres cladocères, *Ceriodaphnia dubia* et *Simocephalus vetulus*, montrent des réponses similaires à celle de *D. magna* en microcosmes 100 L mais opposées pour ce qui concerne *C. dubia* en pilote de gravière (*S. vetulus* non introduit dans ce dernier essai).

L'amphipode *Hyaella azteca*, exposé à la fois à la colonne d'eau et au sédiment, est en essais 2 L très affecté par les deux sédiments. En systèmes de plus grande taille, le développement des populations a été médiocre y compris dans les systèmes témoins, ce qui gêne l'interprétation des résultats. Ceux-ci montrent cependant que l'eau juste après immersion des deux sédiments en gravières pilotes réduit la survie des amphipodes et que le sédiment traité présente une meilleure aptitude au développement de ces organismes que le sédiment brut. Ce résultat peut être mis en rapport avec la diminution des teneurs en chrome de l'eau surnageante mais aussi de l'eau interstitielle du sédiment.

Le chironome *Chironomus riparius* semble plus sensible au sédiment brut qu'au sédiment traité (survie et émergences en microcosmes 2 L). En systèmes de plus grande taille le taux d'émergence est faible (essai gravières) ou moyen mais variable (essais 100 L), ce qui, dans tous les cas, ne permet pas de mettre en évidence des effets.

Tous les résultats sur lentilles d'eau (*Lemna minor* et *Spirodela polyrhiza*) montrent une stimulation de croissance au-dessus du sédiment brut (risque d'eutrophisation) et des effets négatifs en présence du sédiment traité, allant de la simple chlorose sans inhibition de croissance (essais 2 L) à l'inhibition de croissance (essai 100 L n°2 et essai gravières). Ce dernier type d'effet semble durable, même après disparition du pic de chrome dans l'essai gravière.

A l'instar de ce qui est observé pour *L. minor*, la croissance algale en essais 2 L est stimulée en présence de sédiment brut mais pas avec le sédiment traité. En systèmes de grande taille les teneurs en chlorophylle de la colonne d'eau sont faibles partout, du fait d'une pression de broutage élevée ou/et d'une croissance intrinsèque limitée, il n'est dans ces conditions pas possible de détecter un quelconque effet des sédiments. Les mesures réalisées sur le périphyton des systèmes 100 L montrent une absence d'effets des deux sédiments sur ce compartiment.

Les macrophytes enracinées (*Elodea canadensis*, *Myriophyllum spicatum*) voient selon le type d'essai leur croissance favorisée ou non affectée par les deux sédiments, par comparaison avec les systèmes témoins.

Les gastéropodes *Lymnaea stagnalis* et *Physa acuta* se sont avérés peu sensibles aux sédiments même dans la phase d'immersion, leur respiration pulmonée leur permettant de rester hors de l'eau durant cette phase critique. *L. stagnalis* se reproduit cependant un peu mieux en présence de sédiment traité que de sédiment brut, alors que c'est l'inverse pour *P. acuta*.

Les observations réalisées sur les Oligochètes autochtones du sédiment témoin au cours du second essai en microcosmes 100 L montrent une bonne survie en sédiment traité, qui se traduit par une activité de bioturbation aboutissant à enfouir ce sédiment sous le sédiment témoin (**figure 63**). Il est probable que cet enfouissement permette d'atténuer l'exposition des organismes du microcosme au sédiment traité et contribue à expliquer les améliorations observées.

2.5.4.3.3. *Discussion et conclusion*

En prenant en compte les résultats relatifs au comportement des polluants (paramètres physico-chimiques) et ceux relatifs aux effets des sédiments sur les organismes des microcosmes, on peut évaluer le degré de concordance (**tableau 53**) entre les différents types d'essais réalisés sur les sédiments 17000 brut et traité, la concordance pour un paramètre étant établie si ce paramètre apporte des informations allant globalement dans le même sens dans les deux essais considérés (par exemple baisse de la teneur en oxygène dissous après immersion des sédiments, survie des daphnies affectée par le sédiment traité, etc.), sans préciser l'intensité des variations.

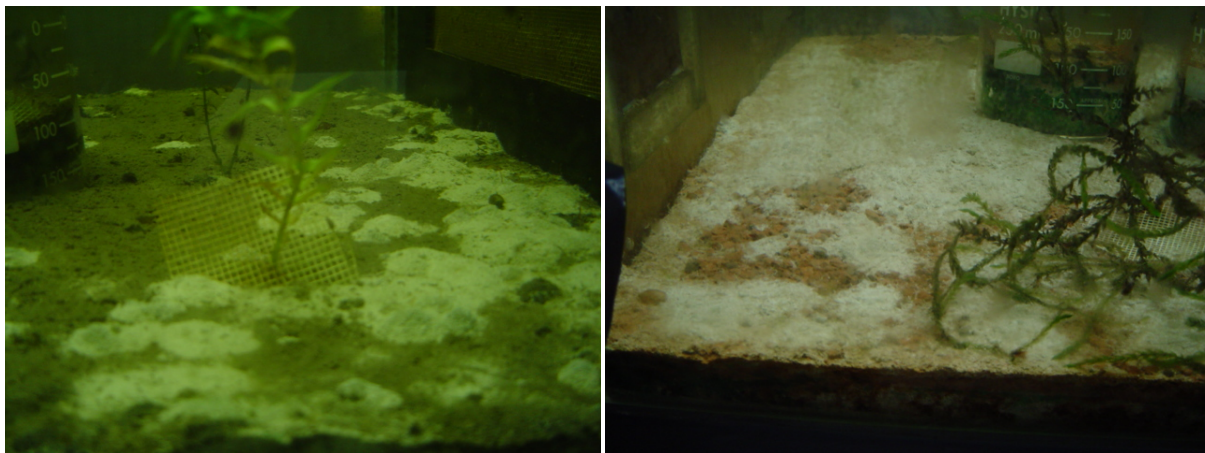


Figure 63. Deux photos montrant l'évolution de la surface du sédiment traité due à l'activité de bioturbation des Oligochètes qui tend à enfouir ce sédiment (de couleur ocre) et à remonter en surface le sédiment propre (de couleur claire) (essai 100 L n°2)

On note globalement une assez bonne concordance (68.8 à 88%) entre les essais complexes (essais 100 L et essai gravière), et une moins bonne concordance (52.6%) entre essais les plus opposés sur l'échelle de complexité (essais en microcosmes 2 L et essai gravière).

Tableau 53. Pourcentages de réponses concordantes entre essais (paramètres physico-chimiques et paramètres biologiques confondus)

	Essai 2 L 2003	Essai 100 L n°1	Essai 100 L n°2	Essai gravière
Essai 2 L 2003	100 %	78.6 %	78.9 %	52.6 %
Essai 100 L n°1		100 %	88 %	68.8 %
Essai 100 L n°2			100 %	72.7 %
Essai gravière				100 %

Cette plus grande distance semble pouvoir être expliquée par des conditions d'essai très différentes, notamment l'exposition des organismes pélagiques mais aussi benthiques, comme l'amphipode *Hyalella azteca* (cf 2.4.3.4.2 Performances et sensibilités des organismes dans les essais en microcosmes), à l'eau surnageante qui dépend étroitement des conditions de renouvellement de cette eau, le type d'eau utilisée (milieu synthétique OCDE en microcosmes 2 L et eau du réseau enrichie en gravières), etc.. A contrario, le fait de travailler dans des conditions d'essai proches n'assure pas pour autant une plus grande concordance des résultats, comme le montre la comparaison des essais en microcosmes 2 L menés sur le même sédiment 17000 en 2001 dans le cadre du programme CETMEF/VNF (thèse Triffault-Bouchet) et en 2003 dans le cadre du programme Novosol® phase I (thèse Cauzzi). Ces deux essais, mis en œuvre selon le même protocole, ne présentent qu'une concordance de 50%, paramètres physico-chimiques et biologiques confondus. Les différences portent sur l'évolution de la conductivité et du pH de la colonne d'eau, les teneurs en ions (NH_4^+ , NO_3^- , K^+ , SO_4^{2-}), la survie des daphnies (nulle à 20 jours ou au contraire peu affectée), la croissance des lentilles d'eau (légèrement stimulée ou au contraire inhibée), alors que les teneurs en métaux (pour les quelques métaux pris en compte) de la colonne d'eau sont comparables. Ces écarts peuvent être imputés aux variations observées sur les prélèvements du sédiment réalisés à deux ans d'intervalle (somme des HAPs, cadmium, arsenic, plomb, cf **tableau 51** des 4 prélèvements), aux conditions de conservation des sédiments avant les essais (notamment durée), qui peuvent induire des comportements différents lors d'une remise sous eau des matériaux, et pour partie à une reproductibilité imparfaite de l'essai en microcosmes 2 L.

Quoiqu'il en soit, si l'évaluation faite dans le cadre du premier prélèvement (programme CETMEF/VNF) est très négative, reposant sur l'observation d'une très faible survie des daphnies et des amphipodes, le sédiment 17000 brut reste problématique au regard des résultats du second essai (programme Novosol®), avec une survie toujours nulle des amphipodes. L'évaluation des essais en microcosmes 100 L et en gravière pilote permet de nuancer cette première approche en fournissant un diagnostic moins pessimiste (développement important des populations de daphnies) et sur un plus grand nombre d'espèces, même si le sédiment récupéré en fin d'essai présente une toxicité moins élevée mais toujours significative vis-à-vis des amphipodes (selon résultats d'un essai monospécifique mené sur ce sédiment).

L'approche graduée mise en œuvre dans le cadre de ce programme Novosol® était surtout destinée à :

- fournir un diagnostic sur le traitement du sédiment 17000 par le procédé Novosol® dans le cadre d'un scénario de remplissage de gravière ou d'utilisation en milieu aquatique du sédiment traité,
- évaluer l'intérêt de mettre en œuvre des systèmes expérimentaux présentant une plus grande complexité biocénotique et un fonctionnement permettant de mieux simuler le scénario représenté.

Des essais menés, il ressort que :

- le traitement améliore globalement l'écocompatibilité du sédiment vis-à-vis de l'écosystème gravière, mais est à l'origine d'une production de chrome VI (oxydation du chrome due à l'étape de calcination) facilement relargué lors de l'immersion du sédiment et pouvant occasionner une toxicité aiguë sur les organismes ainsi qu'une contamination épisodique de la nappe traversant la gravière,
- le système expérimental « gravière » mis en œuvre permet de nuancer l'évaluation négative du sédiment traité au regard de l'essai en microcosmes 2 L, grâce à un suivi sur une période d'exposition plus longue qui fait apparaître, après des effets aigus suite à l'immersion, des possibilités de développement de quasiment toutes les populations. Cette amélioration observée est à l'évidence liée au renouvellement continu de la colonne d'eau qui élimine en particulier le chrome et à la percolation de la nappe à travers le sédiment. La mobilité des polluants est cependant limitée dans le temps, ce qui aboutit à des exportations quasi-négligeables en direction de la nappe au bout de quelques jours à quelques semaines selon le paramètre considéré.

Ces conclusions amènent à considérer que l'immersion en gravière de sédiments traités par le procédé Novosol® pourrait être envisagée dans certaines conditions :

- sites à faible enjeu AEP avec modélisation du panache de diffusion pour évaluer les niveaux de concentrations en polluants attendus au niveau des captages existants et vérifier que ces niveaux sont compatibles avec les normes de qualité,
- immersion du sédiment de façon progressive de façon à respecter une phase de lessivage avec des relargages limités,
- suivi de la qualité de la colonne d'eau et de la nappe (métaux, dont Cr(VI)) entre deux apports successifs,
- suivi biologique à long terme de l'écosystème gravière.

Il semble par ailleurs indispensable, pour tout scénario de valorisation de sédiments traités en conditions aquatiques, d'améliorer le protocole du traitement Novosol® de façon à augmenter le piégeage des métaux (étape de phosphatation) et à limiter le relargage du chrome VI (étape de calcination).

2.6. Discussion générale et perspectives

2.6.1. Préambule

Quel bilan tirer de près de dix ans de travaux basés sur des essais en microcosmes, et quelles perspectives proposer pour la poursuite des activités sur cette thématique ?

Nous rappellerons dans une première partie les avantages généraux des essais en microcosmes, qui confortent notre détermination à poursuivre dans cette voie en matière d'évaluation des risques écotoxicologiques. Nous résumerons ensuite les acquis obtenus au travers des travaux menés, en rappelant les problèmes rencontrés et les limites des approches développées, pour aboutir naturellement à des propositions destinées à améliorer la pertinence de cette approche.

2.6.2. Nécessité de développer l'évaluation écotoxicologique au travers d'essais en microcosmes

Nous réaffirmons avec Cairns *et al.* (1992) la nécessité de développer des protocoles d'essais qui estiment de façon plus précise et plus juste les concentrations en substances toxiques qui font peser un risque sur les écosystèmes, et qui soient capables de produire des informations pouvant être utilisées pour prédire les conséquences possibles *in situ*. La réponse des écosystèmes naturels n'est pas prédictible à partir des réponses de quelques espèces testées isolément au laboratoire, car le fonctionnement des premiers dépend de processus en œuvre à différents niveaux d'organisation biologique, ceux des individus, des populations, des communautés et de l'écosystème. Les bioessais standards mesurent les réponses de quelques espèces à un toxique mais pas les effets sur les dynamiques des communautés et des écosystèmes. Comme il n'existe probablement pas d'espèce systématiquement plus sensible que les autres, il est préférable d'utiliser plusieurs espèces de différents niveaux taxonomiques et fonctionnels. Mais, même dans le cas des batteries de tests, cela ne permet pas d'évaluer les effets sur les processus supérieurs (biomagnification, compétition, etc.). Le plus grand problème des essais monospécifiques est leur très faible réalisme environnemental : absence de compétiteurs, prédateurs, parasites qui peuvent affaiblir l'individu, organismes dépourvus de maladies et non limités en nourriture, conditions qui, dans le milieu naturel, peuvent accroître la sensibilité au stress. L'application de facteurs de sécurité, étant donnée l'incertitude qui pèse sur ces facteurs, peut conduire à surestimer ou sous-estimer le risque, donc à un surcoût environnemental. L'utilisation d'essais en microcosmes apparaît de nature à améliorer les choses, pour peu que l'incertitude autour des résultats ne soit pas trop grande et que ceux-ci puissent être extrapolés aux écosystèmes réels. Les efforts réalisés pour améliorer

le réalisme des conditions expérimentales (type de milieu, présence de sédiment, ...) et exposer simultanément différentes espèces sur une durée suffisamment longue vont *a priori* dans le sens d'une meilleure prédictibilité des effets qui seraient observés *in situ*.

Force est cependant de reconnaître que l'utilisation en routine des essais en microcosmes est assez peu développée, comme le montre le faible nombre de publications dans ce domaine au regard de l'ensemble des publications en écotoxicologie (*cf* 1. *Introduction*). Certes de tels essais sont plus longs et plus coûteux que les tests monospécifiques, ce qui explique en partie le rythme de publication moins élevé, mais ils se heurtent surtout aux critiques suivantes (Carpenter, 1996) : d'une part le manque de sélection des critères de toxicité appropriés et le faible niveau de répliquabilité et de reproductibilité, d'autre part le bénéfice apporté sur le plan du réalisme environnemental et de la prédictibilité, eu égard à l'énergie dépensée dans ce type d'essais. Il n'y a de fait pas de consensus sur les variables d'effet qui permettraient de traduire la réponse globale d'un écosystème à une perturbation écotoxique. Des critères portant sur les paramètres de structure (densités d'organismes, richesse spécifique, abondance des populations et diversité des peuplements ...) et de fonctionnement (respiration et production au travers des variations d'oxygène dissous, pH, flux d'éléments, métabolismes de recyclage de la matière organique, etc.) sont naturellement adoptés, mais pas de façon systématique. Ces critères ne sont de toutes façons que des indicateurs imparfaits de l'état d'un écosystème, et bien souvent il reste difficile de prendre des décisions à partir de leur connaissance. Si un toxique a un effet sur une espèce-clé, cela peut se répercuter sur le fonctionnement de l'écosystème entier, mais si l'effet conduit à la disparition d'une espèce redondante c'est-à-dire qui a un rôle identique à celui d'autres espèces proches (ex : différentes espèces de cladocères, comme dans notre étude sur les effets des percolats de MIOM en microcosmes 100 L, Clément *et al.*, 2005a), alors cela peut très bien ne pas être ressenti au niveau supérieur de l'écosystème ou de la communauté (Cairns *et al.*, 1992).

Il n'en demeure pas moins qu'il reste indispensable de développer des connaissances et des compétences s'appuyant sur des approches non réductionnistes, à partir d'évaluations portant sur les écosystèmes naturels (études *in situ*) et les écosystèmes reconstitués au laboratoire ou à l'extérieur. C'est ce que nous essayons modestement de faire à notre niveau, avec un certain nombre d'avancées mais encore beaucoup de problèmes.

2.6.3. Acquis des travaux menés à l'Université de Savoie et au L.S.E. en matière d'essais en microcosmes

Démarrant sur la thématique des essais en microcosmes à l'Université de Savoie dans l'équipe du Pr. Gérard Blake et poursuivant au Laboratoire des Sciences de l'Environnement à partir de 1999, nous avons défini un protocole d'essai en microcosmes de 2 L (Cadier, 1997 ; Clément et Cadier, 1998) qui permet d'évaluer la réponse de différents organismes exposés simultanément, dans des conditions où ils interagissent entre eux et avec le milieu, à un (ou de plusieurs) toxique(s) introduit(s) *via* la colonne d'eau ou le sédiment. Nous pouvons suivre ainsi :

- la survie et la reproduction de daphnies *Daphnia magna* sur 28 jours, avec des performances acceptables proches en moyenne des performances minimales demandées par les tests de reproduction 21 jours,
- la croissance d'un consortium d'algues *Pseudokirchneriella subcapitata* et *Chlorella vulgaris* introduites dans la colonne d'eau, au travers du suivi de la teneur en chlorophylle, ce qui permet notamment d'évaluer les interactions algues-daphnies, sur lesquelles des effets ont pu être mis en évidence dans certains essais,
- la croissance des lentilles d'eau *Lemna minor*, avec la possibilité de travailler sur deux paramètres différents (nombre de frondes, biomasse),
- la survie à différentes étapes (10, 21 et 28 jours) des larves du chironome *Chironomus riparius*, l'émergence des imagos (entre le 10^{ème} et le 28^{ème} jours), la croissance des larves à 10 jours voire à 21 jours en cas de retard dans le développement, en adoptant un seuil de validité de 70% pour la survie et de 50 à 70% pour l'émergence à 28 jours,
- la survie de l'amphipode *Hyaella azteca* à différentes étapes (10, 21 et 28 jours), qui a montré de bonnes performances (valeurs élevées avec variabilité acceptable, coefficient de variation <20%), en retenant un critère d'acceptabilité pour la survie 28 jours de 70% de survie individuelle (pour chaque microcosme),
- la croissance du même *Hyaella azteca* à différentes étapes (10, 21 et 28 jours), mais avec une variabilité inter-essais importante (cf plus loin),
- des paramètres liés au fonctionnement global des microcosmes (pH, conductivité, teneur en oxygène dissous, teneurs en anions et cations),
- les teneurs en contaminants dans les compartiments abiotiques (colonne d'eau, sédiment, eau interstitielle).

Au moyen d'une telle approche, nous avons pu étudier la biodisponibilité vis-à-vis de l'ensemble de la biocénose du microcosme, y compris le compartiment bactérien, d'HAPs en sédiments artificiels et naturels (Verrhiest, 1998 ; Muller, 1999 ; Clément *et al.*, 2000 ; Verrhiest *et al.*, 2000 ; Verrhiest *et al.*, 2001 ; Verrhiest *et al.*, 2002a ; Godde, 2001 ; Cauzzi, 2002 ; Clément *et al.*, 2005b). Nous avons obtenu des valeurs de toxicité d'HAPs seuls ou en mélange vis-à-vis des organismes du microcosme et confirmé l'importance du type de sédiment et de la teneur en matière organique du sédiment. Ces travaux nous amènent à déconseiller l'utilisation de sédiments artificiels pour l'étude de la biodisponibilité des HAPs, car elle conduit systématiquement à surestimer les effets de ces toxiques qui sont dans les sédiments naturels facilement piégés par les surfaces minérales et la matière organique complexe et qui ne présentent pas dans la majorité des cas de toxicité aiguë.

Nous avons pu également contribuer à l'évaluation de l'écotoxicité d'une substance industrielle, la 6PPD, à la suite d'une contamination accidentelle du milieu (Clément, 2000), substance largement utilisée sur laquelle on disposait pourtant de très peu d'informations. Les essais menés ont permis de mettre en évidence l'importance du phénomène de photolyse et de proposer un seuil d'effet de quelques dizaines de $\mu\text{g/g}$ dans les sédiments, à comparer aux 300 mg/kg trouvés *in situ* après contamination, et de quelques centaines de ng/L dans l'eau. Là encore, l'utilisation de sédiment artificiel conduit à surestimer les risques.

Les travaux de thèse de Gaëlle Triffault-Bouchet, ont permis de participer au programme *Ecocompatibilité* de l'ADEME au travers de l'étude des risques écologiques liés aux rejets de percolats de mâchefers d'incinération d'ordures ménagères (MIOM) dans des écosystèmes lenticques (Elbouazzaoui, 2002 ; Triffault-Bouchet, 2004 ; Triffault-Bouchet *et al.*, 2004 ; Triffault-Bouchet *et al.*, 2005a). Les résultats obtenus montrent que le percolat n'est pas très toxique au regard des essais monospécifiques alors que l'essai en microcosmes réalisé met en évidence des effets aigus à des teneurs faibles (1.5% v/v). Le pH très élevé du percolat (11 unités pH) nécessite un ajustement pour les tests monospécifiques (on souhaite s'affranchir de l'effet du pH, considéré ici comme un *artefact*), alors que la présence du sédiment abaisse rapidement le pH à des valeurs acceptables pour les organismes du microcosme, ceci même pour des concentrations élevées (25%). Dans le cas des tests monospécifiques, l'ajustement du pH s'accompagne de précipités qui modifient probablement la disponibilité des polluants présents (dont métaux) et expliquent peut-être la moindre toxicité observée.

Enfin, les essais en microcosmes 2 L apparaissent appropriés pour une évaluation des risques écologiques liés à la mise en dépôt dans des systèmes lenticques de sédiments contaminés (Babut *et al.*, 2002 ; Clément *et al.*, 2004 ; Triffault-Bouchet, 2004 ; Triffault-Bouchet *et al.*,

2005b) et de sédiments traités (thèse Cauzzi en cours, programme Novosol® en cours), une fois le dépôt stabilisé (sédiments sous eau non perturbés). Si les résultats sur organismes benthiques ne sont pas notoirement différents de ceux obtenus en tests monospécifiques, les essais en microcosmes permettent de montrer que les organismes pélagiques (daphnies, limnées) exposés dans la colonne d'eau au-dessus des sédiments présentent dans certains cas une sensibilité assez élevée qui s'explique davantage par l'exposition aux polluants particuliers des sédiments que par les teneurs en polluants dissous de la colonne d'eau (Triffault-Bouchet, 2004).

Nous avons également initié des essais dans des systèmes plus complexes et de plus grandes dimensions (microcosmes de 100 L avec ou sans renouvellement intermittent de l'eau, et microcosmes de 180 L simulant des gravières alimentées en continu par un écoulement d'eau au travers d'un massif de granulats) permettant d'exposer pendant plusieurs mois un plus grand nombre d'espèces. Dans ces essais, nous avons pu suivre :

- des populations de cladocères (*Daphnia magna*, *Simocephalus vetulus*, *Ceriodaphnia dubia*) évoluant librement dans la colonne d'eau,
- la croissance algale dans la colonne d'eau au travers de mesures de chlorophylle,
- le développement du périphyton (biomasse, teneur en chlorophylle, identification des Diatomées) qui, apporté avec le sédiment ou/et les macrophytes, apparaît après environ un mois de fonctionnement et colonise les surfaces,
- la croissance de deux espèces de lentilles d'eau (*Lemna minor* et *Spirodela polyrhiza*),
- la croissance de macrophytes enracinées (*Elodea canadensis*, *Groenlandia densa*, *Myriophyllum spicatum*) en béciers immergés (qu'il est possible de récupérer à tout moment pour des observations et mesurées aisées) ou plantées à même le sédiment (meilleure intégration dans le microcosme mais mesures moins faciles),
- la survie, croissance et reproduction du gastéropode *Lymnaea stagnalis*, qu'il est relativement facile d'élever au laboratoire et sur lequel de nombreux paramètres peuvent être mesurés (dommages à l'ADN, activités enzymatiques, bioaccumulation, cf 2.4.3.4.2.1.7. *Mollusques gastéropodes pulmonés*),
- le développement de populations du gastéropode *Physa acuta*, moins aisé à maintenir au laboratoire que *Lymnaea stagnalis* et moins facile à étudier en raison de sa petite taille, mais dont la présence pour limiter le développement du périphyton sur les parois et les plantes, qu'il ne consomme pas, s'avère intéressante.

Cette approche a permis d'affiner l'évaluation des risques liés aux rejets de percolats de MIOM dans des écosystèmes lenticques (Lottmann, 2003 ; Carbonel, 2003 ; Clément *et al.*, 2005a) et à l'immersion de sédiment de dragage contaminés et traités en gravière (Vaille, 2005 ; thèse Cauzzi et programme Novosol®). Dans l'étude sur les percolats de MIOM, nous avons pu simuler des apports répétés d'effluents liés à des évènements pluvieux, montré des réponses variables à l'intérieur du groupe des cladocères dont l'activité de broutage était par conséquent sinon totalement maintenue du moins relativement préservée, et au sein du groupe des gastéropodes, avec une sensibilité plus grande d'une des deux espèces. Les organismes benthiques ont quant à eux pu échapper aux effets des percolats par leur enfouissement dans le sédiment. Les essais en microcosmes de plus grande taille ont permis de compléter les essais en microcosmes 2 L sur sédiments contaminés et traités en intégrant à l'évaluation la phase d'immersion proprement dite suivie d'une phase de post-immersion au cours de laquelle le sédiment se dépose, puis d'une phase de dépôt stabilisé. Une meilleure simulation du scénario d'immersion en gravière a été possible grâce à la mise en œuvre de gravières pilotes permettant de reconstituer les conditions hydrauliques des gravières (écoulement de l'eau de nappe au travers des sédiments). Dans ces conditions, les effets ont été atténués et en général limités à la phase d'immersion qui s'est traduite par des pics de pollution dans la colonne d'eau et dans la nappe en aval. Dans tous les cas, il semble que le traitement proposé ait pour principal inconvénient l'augmentation de la mobilité du chrome qui apparaît majoritairement sous sa forme toxique hexavalente.

Que ce soit en microcosmes 2, 100 ou 180 L, l'approche a permis de confirmer ou de mettre en évidence un certain nombre d'avantages.

Lorsque des comparaisons avec des résultats obtenus en tests monospécifiques sont possibles, elles font apparaître des réponses souvent différentes (algues plus sensibles aux percolats de MIOM en test monospécifique, amphipode *H. azteca* moins sensible aux percolats de MIOM lorsqu'elle peut se réfugier dans le sédiment), probablement liées aux conditions d'exposition très différentes et à la prise en charge des toxiques par le système (partition dans différents compartiments, hydrolyse, volatilisation dans certains cas, photodégradation, biodégradation, adsorption particulière, etc.).

Il est important de travailler sur une période d'exposition suffisamment longue, pour prendre en compte les effets chroniques mais aussi l'atténuation des effets, la dégradation des substances testées ou la modification de leur biodisponibilité (atténuation des effets des

percolats de MIOM vis-à-vis de *D. magna* du fait d'une prise en charge du cuivre par le milieu (réduction de sa biodisponibilité), dégradation des HAPs testés par Verrhiest *et al.*, 2002a).

Les essais en microcosmes offrent la possibilité d'étudier le devenir et la biodisponibilité de polluants par la présence des principaux compartiments influençant ce devenir et cette biodisponibilité : colonne d'eau, sédiment, biota. C'est ce que nous avons fait avec des composés hydrophobes comme les HAPs mais aussi la 6PPD. La présence de plusieurs compartiments d'exposition nous a amenés à mettre en évidence des réponses différentes des daphnies exposées à un mélange d'HAPs en microcosmes par rapport aux mêmes daphnies exposées uniquement à l'eau. Le niveau de contamination de l'eau surnageante n'explique pas toujours les effets observés sur les organismes de la colonne d'eau également exposés au sédiment, nous avons pu le vérifier également sur des sédiments multi-contaminés. En outre, ces différents compartiments interagissent entre eux et influencent ainsi le devenir des toxiques : le sédiment apporte dans l'eau surnageante matières organiques dissoutes, colloïdales et particulaires pouvant influencer le devenir d'une substance hydrophobe dans la colonne d'eau, les organismes benthiques modifient par leur activité de bioturbation et d'enfouissement la partition des toxiques du sédiment, etc. L'exemple de la toxicité vis-à-vis des daphnies des eaux au-dessus du sédiment dopé avec la 6PPD illustre l'importance du mode d'exposition : les daphnies meurent rapidement dans les eaux brutes prélevées dans les microcosmes et ne sont au contraire pas affectées dans les mêmes eaux filtrées.

Il est intéressant de travailler par scénario pour tenter de simuler au mieux certaines conditions environnementales : présence d'un sédiment, ratio eau : sédiment, renouvellement ou non de l'eau, mode de contamination (apport du (ou des) toxique(s) par la colonne d'eau, par le sédiment, simulation d'un déversement ou d'un sédiment à l'état de dépôt stabilisé, apports répétés de percolats de MIOM pour simuler des événements pluvieux), reconstitution au laboratoire d'un scénario de dépôt en gravière. A noter que certains facteurs sont difficiles à représenter sans biais, du fait de la taille des systèmes et du caractère artificiel de certaines conditions. Ainsi, si la lumière a un effet certain sur le devenir et la toxicité de certains composés comme les HAPs ou la 6PPD, nos résultats, qui confirment en partie ceci, ont été tributaires du mode d'éclairage couramment utilisé, difficilement représentatif des conditions d'irradiation naturelles (Wilcoxon *et al.*, 2003), et de la difficulté de représenter l'extinction

de lumière par la colonne d'eau avec pour conséquence un éclairage probablement très différent du sédiment par rapport aux conditions *in situ*.

Les microcosmes offrent la possibilité d'étudier une large gamme d'effets sur plusieurs niveaux trophiques, des bactéries (travaux sur HAPs) aux macro-invertébrés en passant par les producteurs primaires, et de mettre en évidence des sensibilités variables aux substances ou matériaux toxiques testés des différents organismes, y compris au sein d'un même groupe (*D. magna*, *C. dubia* et *S. vetulus* exposés aux percolats de MIOM).

Nous avons pu mettre en évidence certaines interactions au sein des microcosmes : par exemple moindre toxicité du pyrène vis-à-vis des daphnies en présence d'algues, interactions entre algues et daphnies fonction de la teneur en percolats de MIOM (*cf* 2.4.3.4.2.1.4. *Algues et cladocères*), activité de bioturbation des oligochètes ayant pour résultat l'enfouissement du sédiment contaminé (essai 100 L n°1 sur sédiment Novosol®).

Des effets indirects ont pu également être observés : par exemple lentilles d'eau affectées par la présence d'HAPs (Verrhiest, 2001), pas directement mais peut-être par leurs produits de dégradation ou bien par déficit d'un nutriment ou oligo-élément suite à des effets sur certaines activités bactériennes du sédiment. De nombreux effets indirects se sont probablement manifestés, sans qu'il ait été possible de les mettre en évidence.

2.6.4. Limites des essais en microcosmes, problèmes rencontrés et pistes de travail

Un problème récurrent des essais en microcosmes est la variabilité des données obtenues, qui nuit au pouvoir de détection et à la sensibilité des critères d'effet pris en compte (Caquet *et al.*, 2001). Cette variabilité est inhérente aux essais en microcosmes, chaque microcosme, du fait de l'auto-organisation qui se met en place, développant des propriétés uniques (Beyers et Odum, 1993), même dans le cas de microcosmes relativement simples comme les microcosmes de 2 L. L'introduction d'un ou plusieurs toxiques apporte, comme nous l'avons constaté, une variabilité supplémentaire puisqu'elle conduit à augmenter le nombre de degrés de liberté du système au travers d'un facteur supplémentaire de variation. En fait, l'analyse de tels essais devrait se faire en ayant à l'esprit que la variabilité qui se présente n'est autre que l'expression des évolutions possibles des microécosystèmes initiés sous l'effet ou non du stress toxique, de la même façon qu'une population de daphnies pourtant identiques présente une distribution de réponses face à une substance toxique à laquelle elle est exposée. Ayant

cependant rarement toutes les clés pour comprendre la diversité de réponses des microcosmes, il est souvent difficile de généraliser les résultats de quelques essais.

Si la variabilité au sein des microcosmes est généralement plus élevée pour les paramètres biologiques que pour les paramètres physico-chimiques, comme l'ont montré Triffault-Bouchet (2004) pour les microcosmes 2 L du L.S.E. et Caquet *et al.* (2001) pour les mésocosmes de la station biologique de l'INRA de Rennes, certains critères offrent de meilleurs résultats. Nous appuyant sur l'analyse de l'ensemble des données biologiques d'essais en microcosmes 2 L effectuée dans ce rapport (*cf* 2.4.4.2. *Biocénoses*), et nous limitant à la variabilité intra-essai, nous retiendrons la survie et le poids sec des larves de chironomes, le jour de première émergence et le délai pour obtenir 50% des émergences, ainsi que la survie et le poids sec à 21 et 28 jours des amphipodes. Une amélioration doit cependant être recherchée, en vue notamment de réduire la variabilité inter-essais du poids sec des organismes benthiques, qui est pour le moment élevée (par exemple rapport de 3 à 10 pour le poids sec des amphipodes). Cela passe par une amélioration des élevages, en cherchant à obtenir une plus grande constance chez les organismes utilisés pour être sûr de disposer d'organismes dans le même état d'un essai à l'autre et réunir toutes les conditions pour obtenir des réponses identiques. Après quelques années de difficultés, l'élevage de chironomes présente actuellement une bonne productivité, il reste à vérifier la régularité de la sensibilité des larves utilisées dans les essais. Les conditions de l'élevage des amphipodes doivent être mieux définies en termes de productivité, de choix de l'âge des organismes utilisés dans les essais (conséquences sur la sensibilité et sur la croissance), et de sensibilité (tests sur toxiques de référence).

Pour la croissance des chironomes et des amphipodes, il conviendrait de préciser les paramètres responsables de la variabilité inter-essais obtenue et de voir si les effets observés sont dépendants ou non de l'intensité de la croissance. Pour les amphipodes on peut s'interroger sur l'existence d'un biais lorsque la survie n'est pas totale, car dans ce cas les survivants pourraient être favorisés du fait d'une ration alimentaire plus élevée. Mesurer la croissance à partir de la taille des organismes conduit peut-être à moins de variabilité et à plus de sensibilité.

La mise en œuvre d'essais sur des substances de référence (Ecological Service for Planning Ltd, 1984 ; Suedel et Rodgers, 1994b ; Kwan et Dutka, 1996) devrait permettre de contrôler la régularité de la sensibilité de nos organismes.

Pour les algues et les daphnies la variabilité augmente de façon significative et entraîne un manque de sensibilité des paramètres concernés (croissance algale, survie et reproduction des

daphnies). Le suivi de la croissance algale *via* la teneur en chlorophylle de l'eau est rendu difficile par le phénomène de sédimentation, qui soustrait une partie des algues à la colonne d'eau, mais aussi par la pression de broutage. Peut-être conviendrait-il de faire appel à des techniques particulières permettant de suivre la croissance intrinsèque des algues de façon à évaluer la réponse directe de celles-ci aux toxiques, comme le suivi de la croissance 7 jours *in situ* sur des algues (*Selenastrum capricornutum*) encapsulées sur des billes de 0,06 cm³ (Van Donk *et al.*, 1995). L'élevage de *Daphnia magna* est actuellement maîtrisé, avec des essais sur toxique de référence (dichromate de potassium) permettant de contrôler la sensibilité des jeunes, mais il conviendrait de vérifier que le transfert dans le milieu d'essai (à optimiser) n'a pas pour conséquence de stresser les organismes, sinon d'étudier la possibilité d'élevages spécifiques dans un tel milieu ou bien d'une phase d'acclimatation. Un contrôle plus rigoureux des élevages devrait permettre de gagner en répliquabilité et en régularité. En outre, une optimisation des conditions des microcosmes vis-à-vis de ces invertébrés et l'obtention d'une croissance algale soutenue par une amélioration de la composition de l'eau en relation avec le sédiment sont de nature à réduire la variabilité. Il conviendra de préciser la variabilité inter-daphnies liée à la reproduction, en gardant à l'esprit que la variabilité sur une reproduction cumulée est moindre que sur les données de reproduction instantanée.

D'une manière générale, une étude systématique de la variabilité de chacun des paramètres physico-chimiques et biologiques doit être menée, afin de comprendre la variabilité minimale à attendre et surtout d'identifier les causes de variabilité en vue d'en réduire les effets. Pour ce faire, les paramètres considérés doivent être étudiés dans des conditions de complexité croissantes où le nombre de degrés de liberté du système, et donc le nombre d'interactions possibles, augmente. Par exemple, les daphnies seront étudiées en présence d'une colonne d'eau et d'algues apportées *ad libitum* (pas de croissance algale, même densité algale partout), puis en présence d'algues en croissance, avec et sans sédiment, puis en présence d'autres espèces du microcosme, etc..

Pour les essais 100 et 180 L, la variabilité pour les organismes sus-cités est au moins aussi élevée qu'en microcosme 2 L, du fait notamment de l'augmentation de la complexité des systèmes, donc des interactions, et d'autres conditions défavorables à la survie et au développement de certaines espèces (notamment organismes benthiques). En revanche, les données sur gastéropodes et plantes enracinées et flottantes bénéficient d'une meilleure répliquabilité, pour peu que les conditions ne soient pas sub-optimales et que les organismes introduits soient en bon état. Cela passe par une maîtrise accrue des cultures et élevages.

Nos résultats tendent à montrer que les différentes eaux utilisées dans les essais n'ont pas, loin s'en faut, été optimisées pour chacun des organismes du microcosme, qu'il s'agisse du milieu synthétique OCDE, d'eau de nappe enrichie en nutriments ou d'eau du réseau enrichie. Même si les performances des organismes utilisés sont liées à plusieurs facteurs du microcosme (qualité de l'eau, du sédiment, interactions, quantité de nourriture, etc.), il est apparu clairement que certains milieux ne pouvaient, en l'état, satisfaire pleinement les exigences de chaque espèce. C'est par exemple le cas du milieu OCDE, milieu algal dont la dureté et l'absence d'oligo-éléments tels que le sélénium ne sont pas adaptées aux exigences des cladocères. Un milieu se rapprochant davantage du milieu M4 (Elendt et Bias, 1990) optimal pour les invertébrés, et adapté à la croissance des producteurs primaires, pourrait être un bon candidat. Par ailleurs, si l'eau de la nappe et celle du réseau apparaissent, par leur caractère naturel, pouvoir constituer une base intéressante, il restera à vérifier, par des études systématiques, qu'elles peuvent soutenir, après addition de nutriments, d'oligo-éléments, et de vitamines, un développement normal des organismes du microcosme, en particulier les algues et les lentilles d'eau. D'autres milieux comme celui de Taub (le milieu T82MV tel que défini dans la norme ASTM de 1993 et enrichi en une solution d'oligo-éléments (Br, Sr, Rb, Li, I, Se et V)) pourraient être testés. Il s'agira également de vérifier si le phosphore est disponible en présence du sédiment d'Aiguebelette, étant donné les difficultés que nous avons eues à obtenir une croissance algale au-dessus de ce sédiment. Naturellement il sera nécessaire de prendre en compte les interactions sédiment/eau, la présence du sédiment pouvant, comme nous l'avons montré, induire une évolution de la composition physico-chimique de l'eau surnageante.

Le choix d'un ratio eau : sédiment élevé dans les essais en microcosmes statiques (2 et 100 L) apparaît justifié pour compenser l'absence de renouvellement de l'eau et minimiser l'influence du sédiment sur la composition de l'eau surnageante (*cf 2.4.3.2. Eau surnageante et 2.4.3.3. Sédiment*). Cependant, on peut se demander si le fait de disposer d'une faible épaisseur de sédiment ne nuit pas aux fonctions de minéralisation de la matière organique propres à ce compartiment et ne crée pas de ce fait un biais dans le fonctionnement écologique du microcosme. Si l'on prend par exemple le cas d'un sédiment lacustre comme celui d'Aiguebelette qui présente probablement une épaisseur de plusieurs mètres pour une profondeur d'eau de moins de 2 m dans les zones littorales, un ratio eau : sédiment élevé en microcosme est-il une bonne façon de représenter cette situation? Une meilleure compréhension de l'influence de la profondeur du sédiment sur l'activité biologique des organismes supérieurs comme des microorganismes et sur le devenir des polluants et le

recyclage de la matière organique devrait permettre de répondre à cette question. Cela passe par une étude bibliographique et par une étude expérimentale.

Notre expérience nous incite à poursuivre les essais en microcosmes avec un sédiment naturel, l'utilisation de sédiment artificiel devant selon nous être abandonnée pour les raisons évoquées à plusieurs reprises (manque de réalisme, turbidité de la colonne d'eau, développement incontrôlable de micromycètes et autres microorganismes en surface). Des essais en microcosmes avec différents sédiments naturels propres devraient être mis en oeuvre, en testant différentes substances de référence, dans le but de choisir un sédiment adapté au développement des organismes benthiques et pélagiques et fournissant des réponses aux toxiques représentatives. Il ne s'agit pas de quelques expérimentations rapides, il y aurait là un sujet de thèse en soi.

Pour les essais sur une longue durée (> 1 mois), tels que les essais en microcosmes 100 et 180 L, l'apparition d'organismes indigènes peut, comme nous l'avons rapporté, constituer une source de perturbation et de biais pour les essais ; il conviendrait de préciser les choses en travaillant sur différents prélèvements de sédiment d'Aiguebelette au cours de l'année, en leur faisant subir différents conditionnements avant utilisation dans des essais (congélation, conservation 4 °C, mise sous eau avec aération, ...) et en examinant la survie et le développement des populations d'amphipodes et de chironomes. Pour faire varier la teneur en matière organique du sédiment d'Aiguebelette « craie » (le sédiment de référence retenu pour le moment), qui est un facteur majeur influençant la biodisponibilité des composés hydrophobes, il serait intéressant de tester un apport de sédiment d'Aiguebelette appelé « tourbe », que nous avons utilisé dans les études sur le pyrène, au sédiment « craie ». L'avantage tient au fait qu'il s'agit dans les deux cas de matériaux naturels, le sédiment « tourbe » étant essentiellement le résultat de la décomposition des végétaux de bordure de l'île où ont lieu les prélèvements.

Tous nos résultats et ceux de la littérature relatifs aux tests monospécifiques sur sédiments montrent qu'un apport de nourriture est indispensable pour les organismes benthiques, au moins dans des sédiments naturels peu riches en matière organique comme celui d'Aiguebelette, et ceci aussi bien en microcosmes 100 et 180 L que 2 L. Une étude bibliographique approfondie devrait permettre de vérifier précisément les conditions employées par les auteurs de travaux en microcosmes. Sauf à mettre au point un système dans lequel le stock initial de matière organique naturelle est suffisant et peut être renouvelé par recyclage, nous proposons de continuer à réaliser cet apport mais d'examiner l'influence de la

nourriture apportée sur les composantes du microcosme, et en particulier sur le devenir des toxiques testés.

Si les systèmes utilisés permettent en règle générale le développement simultané de différentes populations, nous savons peu de choses sur les interactions directes ou indirectes entre ces populations. Le couple algues-daphnies présente une relation trophique évidente, mais d'autres interactions doivent exister. Les deux espèces d'invertébrés benthiques présentes dans nos systèmes, *Chironomus riparius* et *Hyaella azteca*, se partagent le sédiment et la nourriture disponible, et interagissent donc probablement. Il serait intéressant d'identifier les interactions éventuelles et leurs conséquences sur la réponse de ces organismes à la présence d'un toxique par des essais où différentes situations de présence/absence des deux espèces sont étudiées. Le même type d'essai peut naturellement être mis en œuvre avec les autres organismes du microcosme. Ceci permettrait en particulier d'étudier le rôle de l'activité de bioturbation des organismes benthiques (chironomes, amphipodes, gastéropodes) sur les organismes pélagiques (algues, daphnies et lentilles d'eau), cette activité pouvant influencer sur les flux de nutriments et de toxiques du sédiment vers la colonne d'eau. Une meilleure connaissance des interactions entre les populations présentes, mais aussi des effets que celles-ci ont sur les facteurs biotiques du microcosme (qualité de l'eau surnageante, structure du sédiment en surface, partition des toxiques, ...), permettrait de réaliser des évaluations plus pertinentes sur le plan du fonctionnement écologique du microcosme. L'étude notamment des interactions entre plusieurs espèces de cladocères, comme celles utilisées dans les essais en 100 et 180 L (*D. magna*, *C. dubia*, *S. vetulus*), pourrait fournir des éléments permettant de décrypter les observations en présence d'un toxique (par exemple dominance d'une des trois espèces). En poussant le raisonnement, une connaissance approfondie des principales interactions et des équations qui régissent le développement des différentes populations permettrait de modéliser le fonctionnement du microcosme, comme l'ont fait Swartzman et collaborateurs avec les microcosmes de Taub (Swartzman et Rose, 1983 ; Rose *et al.*, 1988 ; Swartzman *et al.*, 1989), ce qui pourrait apporter une aide utile à l'interprétation des effets dus à un toxique. En effet, la seule comparaison d'un système contaminé avec un système témoin ne suffit pas toujours à comprendre quelles variables sont affectées et dans quel sens, et s'il s'agit d'effets directs ou d'effets indirects. Modéliser de tels systèmes, aussi simplistes soient-ils, reste cependant un objectif très ambitieux qui nécessiterait des collaborations avec des équipes compétentes dans ce domaine. Nous avons tenté, pour commencer, de modéliser le couple algues-daphnies dans un milieu synthétique et en l'absence de sédiment, en ne faisant intervenir que la croissance exponentielle des

premières et la pression de broutage (taux de filtration) exercée par les secondes (résultats obtenus dans le cadre des études pour le CEEP, non publiés). L'ajustement des données observées (densité d'algues en fonction du temps) est difficile à obtenir. Ceci montre que, même dans un cas considéré comme simple, la modélisation doit prendre en compte tous les processus déterminants dans les phénomènes observés (dans la situation décrite, probablement l'influence de l'activité d'excrétion des daphnies sur la disponibilité des nutriments donc la croissance algale, mais peut-être également les stocks nutritifs internes des cellules algales).

Les tentatives d'exposer des organismes en cages ou en compartiments dans les essais en microcosmes 100 et 180 L n'ont pas donné les résultats escomptés (Vaille, 2005). Nous pensons que de tels artifices peuvent être utiles dans certains cas, notamment lorsque le suivi de l'ensemble d'une population n'est pas possible, ou lorsqu'il s'agit d'apprécier les effets à court terme sur certains organismes, ou encore lorsque cela peut contribuer à supprimer certaines interactions négatives (prédation, concurrence, ...). C'est une technique employée assez largement en mésocosmes (Caquet *et al.*, 1996), mais aussi en microcosmes de laboratoire (Sanchez et Tarazona, 2002), on peut envisager de poursuivre les recherches dans ce domaine.

L'introduction de plantes enracinées, en pot ou à même le sédiment des microcosmes 100 et 180 L a donné en moyenne des résultats encourageants. En effet, les plantes sauf exception ont présenté une bonne croissance, et de nombreux paramètres peuvent être facilement acquis sur les plantes ou des fragments foliaires (*cf* 2.4.3.4.2.1.6. *Macrophytes enracinées*). Mais, comme précisé au 2.4.3.4.2.1.6., l'absence de maîtrise des conditions de culture ou d'acclimatation et la méconnaissance des paramètres influençant la croissance de ces macrophytes dans nos microcosmes confèrent aux essais un caractère aléatoire et rendent difficile l'interprétation des résultats (ex : croissance de *M. spicatum* plus forte avec le sédiment 17000 brut que dans le sédiment traité et le sédiment témoin). En fait, le type d'eau, le type de sédiment et la teneur en nutriments influencent tous trois la croissance des macrophytes, comme l'ont montré Irfanullah *et al.* (2004) dans un essai de croissance sur 40 jours d'*Elodea nuttallii* dans 24 microcosmes de 28 L faisant intervenir deux sédiments, deux eaux et présence ou absence de nutriments N et P ajoutés. L'azote sous forme nitrates peut inhiber la croissance d'*Elodea* spp. au-dessus de 5 mg NO₃-N/L (Ozymek *et al.*, 1993, cités par Moss *et al.*, 2004). La présence d'algues filamenteuses, favorisée par les nitrates, peut également contribuer à freiner la croissance des macrophytes (Irfanullah *et al.*, 2004). Une

plus grande maîtrise des conditions de culture et d'essai des macrophytes telles que *Elodea* spp. et *Myriophyllum spicatum* apparaît donc indispensable à la poursuite d'essais sur ces plantes. Cela passe probablement, si l'on conserve le sédiment d'Aiguebelette, qui s'est montré favorable à la croissance de ces macrophytes, par l'optimisation de la qualité de l'eau utilisée dans les essais, milieu synthétique ou eau de nappe, avec un contrôle des teneurs en nutriments.

Les essais en 2, 100 et 180 L ont montré la possibilité d'observer la croissance des lentilles d'eau, même si les conditions ne sont pas optimales. La possibilité de travailler sur plusieurs paramètres permet d'affiner l'analyse des effets. Cependant, dans les études menées ces effets se sont le plus souvent limités à une stimulation de croissance, c'est probablement dû aux matériaux testés (sédiments et effluents surtout). Comme pour la plupart des organismes du microcosme, une difficulté est d'interpréter la croissance dans les microcosmes traités (i.e. contaminés) par rapport à celle observée dans les témoins, car cette croissance est le résultat d'effets directs mais aussi indirects, qui aboutissent à des variations du stock de nutriments. L'incidence du sédiment reste encore difficile à cerner. En microcosmes 100 et 180 L, il est possible, comme nous l'avons montré, de travailler sur deux espèces, mais il convient d'opérer des prélèvements pour éviter de recouvrir complètement la surface du plan d'eau ou/et de passer trop de temps au comptage. Ces prélèvements pourraient être mis à profit pour mener d'autres investigations sur les lentilles (bioaccumulation, activités enzymatiques, teneur en chlorophylle, etc.).

Notre expérience nous conforte dans l'idée que la maîtrise de la partie analytique est indispensable, comme nous l'ont appris nos essais sur les HAPs et les problèmes rencontrés avec le pyrène, ainsi que les essais sur la 6PPD, substance pour laquelle les compétences analytiques sont rares et dont le caractère photodégradable apporte une difficulté supplémentaire pour son suivi. La maîtrise de la chimie des composés peut aller jusqu'à la détermination des espèces présentes. Nous avons montré l'intérêt de doser le chrome VI dans les essais sur le sédiment 17000 traité. Il eût également été très enrichissant de préciser la spéciation du cuivre dans les essais sur les percolats de MIOM, et l'influence des anions et cations dans la biodisponibilité des métaux dans les études sur percolats de MIOM et sédiments. Ceci peut être fait en faisant appel à des modèles de spéciation comme JCHESS (Ecole des Mines de Paris) ou PHREEQC, mais surtout en s'entourant des compétences de chimie de la spéciation présentes dans certains laboratoires. Des rapprochements pourraient être envisagés avec l'équipe de Janssen (Université de Gand), qui travaille sur des modèles de

ligands biotiques (De Schamphelaere et Janssen, 2002) pour expliquer l'atténuation des effets des métaux en présence de calcium, et avec qui nous avons travaillé dans le passé (Clément *et al.*, 1996, 1997).

Enfin, il semble pertinent de se poser à nouveau la question du choix des paramètres d'effets sur les organismes supérieurs exposés en microcosmes, pour améliorer l'analyse des réponses et la compréhension des effets observés, voire s'affranchir de la variabilité liée aux paramètres structuraux (densités d'organismes). Ce sont par exemple :

- des paramètres de génotoxicité comme la mesure des dommages à l'ADN, que nous avons expérimentée avec succès sur *Lymnaea stagnalis*,
- l'activité glutathione-S-transférase (GST) des producteurs primaires (algues, lentilles d'eau) qui permet de détoxifier les contaminants (Lei *et al.*, 2003),
- l'activité acétylcholine estérase des invertébrés, qui répond bien aux substances de type organophosphoré mais aussi à certains métaux (Lagadic *et al.*, 1994)
- les activités de détoxification de composés type HAPs par les monooxygénases à cytochrome P450 chez des invertébrés comme *Daphnia magna* (Akkanen et Kukkonen, 2003).

La grande disponibilité de certaines des espèces utilisées dans les essais (daphnies, lentilles d'eau, plantes enracinées, physes) permet d'envisager de réaliser des prélèvements pour ce type de mesures parfois non destructives (par exemple dommages à l'ADN des limnées). Cela peut alourdir considérablement les manipulations et nécessite donc des moyens humains suffisants, ce qui peut être obtenu par un travail d'équipe associant plusieurs étudiants ou/et chercheurs permanents menant différents types d'investigations sur les microcosmes.

De la même façon, il apparaît intéressant, dans le cas de contaminants bien identifiés (mono-contamination ou multi-contamination avec quelques contaminants à risque), de doser les substances testées à l'intérieur des organismes exposés. Ceci devrait permettre de s'affranchir de la variabilité liée à certains paramètres d'effets, de mieux interpréter les effets observés, de mettre en évidence d'éventuels phénomènes de métabolisation comme l'a suggéré notre étude sur le pyrène bioaccumulé par les organismes des microcosmes, et de confirmer ou non la biodisponibilité de ces substances. En microcosmes 100 et 180 L cela peut être assez aisé sur certains organismes présentant une biomasse suffisante, tels que plantes, lentilles d'eau, gastéropodes. Nous avons d'ailleurs conservé ces organismes à l'issue des essais sur sédiments (programme Novosol®) en vue de réaliser l'analyse des métaux les plus significatifs (Cr, Zn).

2.6.5. Propositions à court et moyen terme

La discussion qui précède a mis en évidence plusieurs pistes de progrès, qui peuvent nécessiter de nombreuses collaborations mais aussi d'étoffer l'équipe « microcosmes » du L.S.E., notamment en personnel technique, ce qui n'est pour le moment pas à l'ordre du jour. Il est donc nécessaire de hiérarchiser les actions à mener. Nous proposons de nous limiter dans un premier temps aux travaux visant à optimiser le protocole d'essais en microcosmes 2 L, qui a fait l'objet du plus grand nombre de publications et qui peut devenir rapidement opérationnel en raison de sa relative simplicité. Cela nécessite bien sûr de se recentrer sur des travaux à caractère méthodologique, ce qu'il a été difficile de faire jusqu'à présent en raison des objectifs opérationnels des contrats obtenus.

Nous proposons ainsi de travailler sur :

- l'optimisation des élevages notamment d'invertébrés benthiques,
- l'optimisation de l'eau utilisée,
- la recherche d'un sédiment naturel adapté aux essais en microcosmes,
- la réduction de la variabilité et la recherche d'une meilleure répétabilité voire reproductibilité.

Dans un second temps, il serait utile, en se concentrant sur le même protocole d'essais en microcosmes 2 L, d'améliorer notre compréhension du fonctionnement de l'écosystème reconstitué par l'étude des interactions entre les organismes du microcosme et entre ces organismes et le milieu. Identifier ces interactions et si possible les quantifier pourrait constituer une première étape vers une modélisation de l'écosystème, modélisation qui pourrait constituer une aide à l'interprétation des effets observés en présence de toxique. Cette partie « modélisation » devrait être abordée par le biais de coopérations avec des équipes spécialisées dans ce domaine.

Références

- ADEME (2002). Evaluation de l'écocompatibilité de scénarios de stockage et de valorisation des déchets, Connaître pour agir, ADEME, Angers.
- AFNOR (1992). Déchets - Essai de lixiviation, norme NF X 31-210.
- AFNOR (1996). Association Française de Normalisation: XP T 90-337 : Détermination de l'inhibition de la croissance de *Lemna minor*. 10 pp.
- Agostini R., Pavageau P., Verley F. (1997). Curage et Devenir des Boues, Approche Réglementaire, rapport Agence de l'Eau Artois Picardie, Service Navigation Nord - Pas-de-Calais, DIREN Nord - Pas-de-Calais, 68 pages.
- Akkanen J., Kukkonen J.V.K. (2003). Biotransformation and bioconcentration of pyrene in *Daphnia magna*, *Aquatic Toxicol.* 64 : 53- 61.
- Akkanen J., Penttinen S., Haitzer M., Kukkonen J.V.K. (2001). Bioavailability of atrazine, pyrene and benzo(a)pyrene in European river waters, *Chemosphere* 45 : 453-462.
- Alexander M. (2000). Aging, bioavailability, and overestimation of risk from environmental pollutants, *Environ. Sci. Technol.* 34 : 4259-4264.
- Alzieu C. (2001). Dragage en estuaire et milieu marin. Colloque d'hydrotechnique. 166ème session du Comité Scientifique et Technique, Lyon, 28 et 29 mars 2001. Paris: Société hydrotechnique de France, mars 2001. p 159-164.
- Ankley G.T., Benoit D.A., Hoke R.A., Leonard E.N., West C.W., Phipps G.L., Mattson V.R., Anderson L.A. (1993). Development and evaluation of test methods for benthic invertebrates and sediments: effects of flow rate and feeding on water quality and exposure conditions, *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 25 : 12-19.
- Ankley G.T., Collyard S.A., Monson P.D., Kosian P.A. (1994). Influence of ultraviolet light on the toxicity of sediments contaminated with polycyclic aromatic hydrocarbons, *Environ. Toxicol. Chem.* 13 : 1791-1796.
- Ankley G.T., Erickson R.J., Phipps G.L., Mattson V.R., Kosian P.A., Sheedy B.R., Cox J.S. (1995). Effects of light intensity on the phototoxicity of fluoranthene to a benthic macroinvertebrate, *Environ. Sci. Technol.*, 29 : 2828-2833.
- Ankley G.T., Katko A., Arthur J.W. (1990). Identification of ammonia as an important sediment-associated toxicant in the Lower Fox River and Green Bay, Wisconsin, *Environ. Toxicol. Chem.* 9 : 313-322.
- Arfsten, D.P., Schaeffer, D.J., Mulveny, D.C. (1996). The effects of near ultraviolet light radiation on the toxic effects of polycyclic aromatic hydrocarbons in animals and plants : a review, *Ecotoxicol. Environ. Safety* 33 : 1-24.
- ASTM (1993a). Standard guide for conducting sediment toxicity tests with freshwater invertebrates, E1383-93, in ASTM Standards on Aquatic Toxicology and Hazard Evaluation, p. 294-320.
- ASTM (1993b). Standard practice for Standardized Aquatic Microcosms : Fresh Water, ASTM Standards on Aquatic Toxicology and Hazard Evaluation, E1366-91, pp 422-456.
- ASTM (1994). Standard guide for collection, storage, characterization and manipulation of sediment for toxicological testing. E 1391-94. Technical report. *American Society for Testing and Materials*, Philadelphia, PA, USA.

- ASTM (1995). Standard test methods for measuring the toxicity of sediment-associated contaminants by benthic invertebrates. E1706-95. Technical report, American Society Testing and Materials, Philadelphia, P.A., U.S.A., pp 1-82.
- Avrain N. (2000). Essai en microcosmes sur un sédiment naturel contaminé par un mélange d'HAPs, rapport de Travail de Fin d'Etudes de l'ENTPE, 37 pages + annexes.
- Babut M., Perrodin Y., Bedell J.P., Clément B., Cosnier S., Corriger B., Delmas H., Delolme C., Devaux A., Miège C., Péry A., Roulier J.L., Vollat B. (2003). Méthodologie d'évaluation écotoxicologique de matériaux de dragage : tests de la démarche et essais d'optimisation, Rapport final, août 2003, 90 pages.
- Babut M., Perrodin Y. (2001). Evaluation écotoxicologique de sédiments contaminés ou de matériaux de dragage. I. Présentation et justification de la démarche, 47 pages.
- Babut M., Perrodin Y., Bray M., Clément B., Delolme C., Devaux A., Durrieu C., Garric J., Vollat B., Bécart, D., Charrier C. (2002). Évaluation des risques écologiques causés par des matériaux de dragage : proposition d'une approche adaptée aux dépôts en gravière en eau. *Rev. Sci. Eau* 15 : 615-639.
- Barry M.J., Logan D.C., Ahokas J.T., Holdway D.A. (1995). The effects of algal food concentration on toxicity of two agricultural pesticides to *Daphnia carinata*, *Ecotoxicol. Environ. Safety* 32 : 273-279.
- Barry M.J., Davies W. (2004). Effects of invertebrate predators and a pesticide on temporary pond microcosms used for aquatic toxicity testing, *Environ. Pollut.* 131 : 25-34.
- Barry M.J., Logan D.C. (1998). The use of temporary pond microcosms for aquatic toxicity testing : direct and indirect effects of endosulfan on community structure, *Aquat. Toxicol.* 41 : 101-124.
- Baumard P. (1997). Biogéochimie des composés aromatiques dans l'environnement marin, Thèse de Doctorat en Chimie Analytique et Environnement de l'Université de Bordeaux I, 145 pages.
- Baumard P., Budzinski H., Garrigues P. (1998). Polycyclic aromatic hydrocarbons in sediments and mussels of the western Mediterranean Sea. *Environ. Toxicol. Chem.* 17: 765-776.
- Bennett W.E., Maas J.L., Sweeney S.A., Kagan J. (1986). Phototoxicity in aquatic organisms : the protecting effect of beta-carotene, *Chemosphere* 15 : 781-786.
- Bhattacharyya S., Klerks P.L., Nyman J.A. (2003). Toxicity to freshwater organisms from oils and oil spill chemical treatments in laboratory microcosms, *Environ. Pollut.* 122 : 205-215.
- Bitton G., Rhodes K., Koopman B., Cornejo M. (1995). Short-term toxicity assay based on daphnid feeding behavior, *Wat. Environ. Res.* 67 : 290-293.
- Bluzat R., Jonot O., Lespinasse G., Seuge J. (1979). Chronic toxicity of acetone in the fresh water snail *Lymnaea stagnalis*, *Toxicology* 14 : 179-190.
- Bluzat R., Seuge J. (1979). Effets de trois insecticides (Lindane, fenthion et carbaryl) : toxicité aiguë sur quatre espèces d'invertébrés limniques ; toxicité chronique chez le mollusque pulmoné *Lymnaea*, *Environ. Pollut.* 18 : 51-70.
- Boese B.L., Lamberson J.O., Swartz R.C., Ozretich R., Cole F. (1998). Photoinduced toxicity of PAHs and alkylated PAHs to a marine infaunal amphipod (*Rhepoxinius abronius*), *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 34 : 235-240.
- Bogusz D. (2001). Gérer les sédiments pollués. Colloque d'hydrotechnique. 166^{ème} session du Comité Scientifique et Technique, Lyon, 28 et 29 mars 2001. Paris: Société hydrotechnique de France, mars 2001. p 111-118.

- Böing W.J., Wagner A., Voigt H., Deppe T., Benndorf J. (1998). Phytoplankton responses to grazing by *Daphnia galeata* in the biomanipulated Bautzen reservoir, *Hydrobiologia* 389 : 101-114.
- Bonnet C. (2000). Développement de bioessais sur sédiments et applications à l'étude, en laboratoire, de la toxicité de sédiments dulçaquicoles contaminés, spécialité «Toxicologie de l'Environnement» Université de Metz, Metz, 326 pages.
- Borglin S., Wilke A., Jepsen R., Lick W. (1996). Parameters affecting the desorption of hydrophobic organic chemicals from suspended sediments, *Environ. Toxicol. Chem* 15 : 2254-2262.
- Boudou A., Inza B., Lemaire-Gony S., Maury-Brachet R., Odin M., Ribeyre F. (1998). Metal bioaccumulation in freshwater systems : experimental study of the actions and interactions between abiotic factors and contamination factors, in *Ecotoxicology : Ecological Fundamentals, Chemical Exposure, and Biological Effects*, G. Schüürmann & B. Markert Eds, Environmental Science and Technology, John Wiley & Sons, Inc. And Spektrum Akademischer Verlag, 1998, 451-482.
- Brandt K.K., Jørgensen N.O.G., Nielsen T.H., Winding A. (2004). Microbial community-level toxicity testing of linear alkylbenzene sulfonates in aquatic microcosms, *FEMS Microbiol. Ecol.* 49 : 229-241.
- Bray M., Babut M., Vollat B., Montuelle B., Devaux A., Bedell J.P., Delolme C., Durrieu C., Clément B., Perrodin Y., Triffault-Bouchet G. (2003). Evaluation écotoxicologique de matériaux de dragage : Application à 5 sédiments du Nord-Pas de Calais, rapport Cetmef/Drast/VNF, septembre 2003, 142 pages.
- Bray M., Babut M., Montuelle B., Vollat B., Devaux A., Delolme C., Durrieu C., Bedell J.P., Clément B. (2001). Evaluation écotoxicologique de sédiments contaminés ou de matériaux de dragage. (III). Application au Canal de l'Est Branche Sud, rapport Cetmef/Drast et VNF, avril 2001, 70 pages.
- Brazillet C., Badreddine R. (2002). Caractérisation des mâchefers d'incinération d'ordures ménagères - Etude expérimentale de l'impact des dioxines sur l'environnement, INERIS, Paris, 19.
- Briche N., Dufraisse C., Flacquet-Lacoux V., Geai C., Le Fur J.P., Marotta K., Pavageau P., Sarthou J.M. (1998). Guide d'intervention pour la pratique des dragages. VNF, avril 1998, 50 pages.
- Brockway D.L., Hill J., Maudsley J.R., Lassiter R.R. (1979). Development, replicability and modeling of naturally derived microcosms, *Intern. J. Environ. Studies* 13 : 149-158.
- Brockway D.L., Smith P.D. and Stancil F.E. (1984). Fate and Effects of Atrazine in Small Aquatic Microcosms, *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 32 : 345-353.
- Brönmark C. (1985). Interactions, between macrophytes, epiphytes and herbivores : An experimental approach. *Oikos* 45 : 26-30.
- Brönmark C. (1989). Interactions between epiphytes, macrophytes and freshwater snails : A review. *J. Mollusc. Stud.* 55 : 299-311.
- Burton G.A. (1992). Plankton, macrophyte, fish and amphibian toxicity testing of freshwater sediments, in G.A. Burton Jr., Ed., *Sediment toxicity assessment*, Lewis Publishers, USA, pp167-181.
- Burton Jr., G.A. (1996). Artificial sediments: current issues for standardization, prepared for OECD Expert Group on Chironomidae Toxicity Testing.
- Cabridenc, R. (1991). Dégradation et transformation dans les sédiments. Congrès international de la Société d'Ecotoxicologie Fondamentale et Appliquée. La Rochelle . 5-7 juin. pp 59-80.
- Cadier C. (1997). Mise au point méthodologique d'un microcosme aquatique à compartiment sédimentaire. DEA "Méthodes de recherche sur l'Environnement et la Santé", ESIGEC, juin 1997.

- Cairns J. Jr., Buikema A.L. (1984). Verifying predictions of environmental safety and harm, in : *Concepts in marine pollution measurements* (Eds. H.H. White), 81-112, Maryland Sea Grant College, University Maryland, College Park, MD.
- Cairns J. Jr., Pratt J.R., Niederlehner B.R. (1985). A provisional multi-species toxicity test using indigenous organisms, *J. Testing Eval.* 13 : 316-319.
- Cairns J.Jr., Cherry D.S. (1993). Freshwater Multi-Species Test Systems, 101-116, Handbook of Ecotoxicology, Volume one, P. Calow (Ed.), Blackwell Scientific Publications, 478 pages.
- Cairns J.Jr., McCormick P.V., Belanger S.E. (1992). Ecotoxicological testing : small is reliable, *J. Environ. Pathol. Toxicol. Oncol.* 11 : 247-263.
- Cairns J.Jr., Niederlehner B.R., Pratt J.R. (1990). Evaluation of joint toxicity of chlorine and ammonia to aquatic communities, *Aquatic Toxicol.* 16 : 87-100.
- Cairns J.Jr., Pratt J.R. (1989). The scientific basis of bioassays, *Hydrobiologia* 188/89 : 5-20.
- Calow P. (1993). General principles and overview in Handbook of ecotoxicology, Calow P. (ed.), Blackwell Scientific Publications, Oxford, 1-5.
- Canivet V., Fruget J-F.(2002). Ecocompatibilité des eaux de percolation de déchets stabilisés - Evaluation écotoxique au laboratoire et étude expérimentale en canaux artificiels extérieurs, *Déchets Sciences et Techniques* 28 : 8-14.
- Canton J.H., Slooff W. (1977). The usefulness of *Lymnaea stagnalis* L. as a biological indicator in toxicological bio-assays (model substance α -HCH), *Water Research* 11 : 117-121.
- Capilla (2005). Dynamique de transfert du cadmium et du zinc au sein des dépôts de sédiments de curage végétalisés, Thèse de Doctorat en Sciences Agronomiques de l'Institut National Polytechnique de Lorraine, 182 p..
- Caquet T., Lagadic L., Jonot O., Baturu W., Kilanda M., Simon P., Le Bras S., Echaubard M., Ramade F. (1996). Outdoor experimental ponds (mesocosms) designed for long-term ecotoxicological studies in aquatic environment, *Ecotoxicol. Environ. Safety* 34 : 125-133.
- Caquet T., Lagadic L., Monod G., Lacaze J.C., Couté A. (2001). Variability of physico-chemical and biological parameters between replicated outdoor freshwater lentic mesocosms, *Ecotoxicology* 10 : 51-66.
- Carbonel J. (2003). Conception d'essais écotoxicologiques en microcosmes aquatiques de laboratoire, étude de la variabilité. Rapport de DEA Analyse et Modélisation des Systèmes Biologiques, Lyon I, 50 pages.
- Cardwell A.J., Hawker D.W., Greenway M. (2002). Metal accumulation in aquatic macrophytes from southeast Queensland, Australia, *Chemosphere* 48 : 653-663.
- Carpenter S.R. (1996). Microcosms experiments have limited relevance for community and ecosystem ecology, *Ecology* 77 : 677-680.
- Carr G.M., Duthie H.C., Taylor W.D. (1997). Models of aquatic plant productivity : a review of the factors that influence growth, *Aquatic Botany* 59 : 195-215.
- Cauzzi N. (2002). Devenir des hydrocarbures aromatiques polycycliques dans un écosystème aquatique et impact sur les organismes vivants : exemple du pyrène, Mémoire de DEA Toxicologie de l'Environnement, Université de Metz, 60 pages.
- Cedergreen N., Streibig J.C., Spliid N.H. (2004). Sensitivity of aquatic plants to the herbicide metsulfuron-methyl, *Ecotoxicol. Environ. Safety* 57 : 153-161.

- Chandler A. J., Eighmy T. T., Hartlen J., Hjelmar O., Kosson D. S., Sawell S. E., van der Sloot H. A., Vehlow J. (1997). Bottom ash. In : Municipal solid waste incinerator residues, pp. 339-417, Elsevier, Amsterdam.
- Chevron N. (2004). Mise en évidence de la biodégradation du pyrène dans une matrice organique, rapport de DEA Sciences et Stratégies Analytiques de Lyon 1, 37 p.
- Chui P.C., Tay J.H. (1997). Non-conventional construction materials from dredging spoils, *Environ. Monitor. Assessment* 44 : 285-294.
- Clément B. (1994). La toxicité aiguë des lixiviats de décharge. Apports respectifs et complémentarité des approches biologique et physico-chimique. Thèse de Doctorat l'Université de Savoie, spécialité Biologie et Biochimie Appliquées, 326 p.
- Clément B. (1995-1998). CEEP Research Program on Eutrophication, ESIGEC Final Reports.
- Clément B., Bouvet Y. (1993). Assessment of landfill leachate toxicity using the duckweed *Lemna minor*. Proceed. 2nd Europ. Conf. Ecotoxicol., Amsterdam (The Netherlands), 1992, May 11-15, *Sci. Total Environ.*, 1179-1190.
- Clément B., Cadier C. (1998). Development of a new laboratory freshwater/sediment microcosm test, *Ecotoxicology* 9 : 279-290.
- Clément B., Cauzzi N., Godde M., Crozet K., Chevron N. (2005b). Pyrene toxicity to aquatic pelagic and benthic organisms in single-species and microcosm tests, *Polycyclic Aromatic Compounds* 25 : 271-298.
- Clément B., Devaux A., Perrodin Y., Danjean M., Ghidini –Fatus M. (2004). Assessment of sediment ecotoxicity and genotoxicity in freshwater laboratory microcosms *Ecotoxicology* 12 : 323-333.
- Clément B., Janssen C.R., Le Dû-Delepierre A. (1997). Estimation of the hazard of landfills through toxicity testing of leachates. 2. Comparison of physico-chemical characteristics of landfill leachates with their toxicity determined with a battery of tests, *Chemosphere* 35 : 2783-2796.
- Clément B., Merlin G. (1995). The contribution of ammonia and alkalinity to landfill leachate toxicity to duckweeds. *Sci. Total Environ.* 170 : 71-79.
- Clément B., Muller C., Verrhiest G. (2000). Influence of exposure conditions on the bioavailability of fluoranthene to *Daphnia magna* (Cladocera), *Polycyclic Aromatic Compounds* 20 : 259-274.
- Clément B., Persoone G., Janssen C.R., Le Dû-Delepierre A. (1996). Estimation of the hazard of landfills through toxicity testing of leachates. 1. Determination of lachate toxicity with a battery of acute tests, *Chemosphere*, 33/11, 2303-2320.
- Clément B., Triffault-Bouchet G., Lottmann A., Carbonel J. (2005a). Are percolates released from solid wastes incineration bottom ashes safe for lentic ecosystems ? A laboratory ecotoxicological approach based on 100 litre indoor microcosms, *Aquatic Ecosystem Health Management* 8 : 427-439.
- Clément B., Zaid S. (2004). A new protocol to measure the effects of toxicants on daphnid-algae interactions, *Chemosphere* 55/10 : 1429-1438.
- Collyard S.A., Ankley G.T., Hoke R.A., Goldenstein T. (1994). Influence of age on the relative sensitivity of *Hyaella azteca* to diazon, alkylphenol ethoxylates, copper, cadmium and zinc, *Environ. Toxicol. Chem.* 26 : 110-113.
- Conquest L.L., Taub F.B. (1989). Repeatability and reproducibility of the Standardized Aquatic Microcosm: statistical properties, *Aquatic Toxicology and Hazard Assessment: 12th Volume*, ASTM STP 1027, American Society for Testing and Materials, Philadelphia, 159-177.

- Conrad A.U., Comber S.D., Simkiss K. (2002). Pyrene bioavailability; effect of sediment-chemical contact time on routes of uptake in an oligochaete worm, *Chemosphere* 49 : 447-454.
- Cooley J.M. (1977). Filtering rate performance of *Daphnia retrocurva* in pulp mill effluent, *J. Fish. Res. Board Can.* 34 : 863-868.
- Cragg B.A., Fry J.C. (1984). The use of microcosms to simulate field experiments to determine the effects of herbicides on aquatic bacteria, *J. General Microbiol.* 130 : 2309-2316.
- Crossland N.O., Bennett D. (1984). Fate and biological effects of methyl parathion in outdoor ponds and laboratory aquaria, *Ecotoxicol. Environ. Safety* 8 : 471-481.
- Crow M.E., Taub F.B. (1979). Designing a microcosm bioassay to detect ecosystem level effects, *Intern. J. Environmental Studies* 13 : 141-147.
- Crum S.J.H., Aalderink G.H., Brock T.C.M. (1998). Fate of the herbicide linuron in outdoor experimental ditches, *Chemosphere* 36 : 2175-2190.
- Cuppen J.G.M., Crum S.J.H., Van den Heuvel H.H., Smidt R.A., Van den Brink P.J. (2002). Effects of a mixture of two insecticides in freshwater microcosms : I. Fate of chlorpyrifos and lindane and responses of macroinvertebrates, *Ecotoxicology* 11 : 165-180.
- Cuppen J.G.M., Van den Brink P.J., Camps E., Uil K.F., Brock T.C.M. (2000). Impact of the fungicide carbendazim in freshwater microcosms - I. Water quality, breakdown of particulate organic matter and responses of macroinvertebrates, *Aquat. Toxicol.* 48 : 233-250.
- Czech P., Weber K., Dietrich D.R. (2001). Effects of endocrine modulating substances on reproduction in the hermaphroditic snail *Lymnaea stagnalis* L., *Aquat. Toxicol.* 53 : 103-114.
- Day K.E., Kaushik N.K. (1987). Short-term exposure of zooplankton to the synthetic pyrethroid, fenvalerate, and its effects on rates of filtration and assimilation of the alga, *Chlamydomonas reinhardtii*, *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 16 : 423-432.
- De Schampelaere, K.A.C., Janssen, C.R. (2002). A biotic ligand model predicting acute copper toxicity to *Daphnia magna*: the effects of calcium, magnesium, sodium, potassium and pH. *Environ. Sci. Technol.* 36 : 48-54.
- DePaolis F., Kukkonen J. (1997). Binding of organic pollutants to humic and fulvic acids : influence of pH and the structure of humic material, *Chemosphere* 34 : 1693-1704.
- Desouky M.M., Powell J.J., Jugdaohsingh R., White K.N., McCrohan C.R. (2002). Influence of oligomeric silicic and humic acids on aluminum accumulation in a freshwater grazing invertebrate, *Ecotoxicol. Environ. Safety* 53 : 382-387.
- Désy J.C., Amyot M., Pinel-Alloul B., Campbell P.G.C. (2002). Relating cadmium concentrations in three macrophyte-associated freshwater invertebrates to those in macrophytes, water and sediments, *Environ. Pollut.*, 120 : 759-769.
- Di Toro D.M., Allen H.E., Bergman H.L., Meyer J.S., Paquin P.R., Santore R.C. (2001). Biotic ligand model of the acute toxicity of metals. I. Technical basis, *Environ. Toxicol. Chem.* 20 : 2383-2396.
- Di Toro D.M., Zarba C.S., Hansen D.J., Berry W.J., Swartz R.C., Cowan C.E., Pavlou S.P., Allen H.E., Thomas N.A., Paquin P.R. (1991). Technical basis for establishing sediment quality criteria for nonionic organic chemicals using equilibrium partitioning, *Environ. Toxicol. Chem.* 10 : 1541-1583.

- Ditsworth G.R., Schults D.W., Jones J.K.P. (1990). Preparation of benthic substrates for sediment toxicity testing, *Environ. Toxicol. Chem.* 9 : 1523-1529.
- Dobbs M.G., Cherry D.S., Cairns J.Jr. (1996). Toxicity and bioaccumulation of selenium to a three-trophic level food chain, *Environ. Toxicol. Chem.* 15 : 340-347,
- Doutriaux E. (2001). Point de vue du concessionnaire: gestion des sédiments du Rhône. Colloque d'hydrotechnique de France. Mars 2001. p. 101-107.
- Driscoll S.K., Landrum P.F., Tigu E. (1997). Accumulation and toxicokinetics of fluoranthene in water-only exposures with freshwater amphipods, *Environ. Toxicol. Chem.* 16 : 754-761.
- Ecological Service for Planning Ltd. (1984). Guidance document on measurement of test precision using control sediments spiked with a reference toxicant. Third draft, Conservation and Protection Environment Canada, Ottawa, Ontario, GC048.
- Eedems (2004). Étude du comportement en scénario de sédiments de dragage avant et après traitement NOVOSOL®. Phase 1.1, Etude bibliographique relative aux gravières en lit majeur, 32 p.
- Eisler R. (2000). Polycyclic Aromatic Hydrocarbons. In : *Handbook of chemical risk assessment. Health hazards to humans, plants and animals. Organics*. Ed. R. Eisler. CRC Press. Lewis Publishers, pp. 1343-1411.
- Elbouazzaoui I. (2002). Evaluation de l'écotoxicité de mâchefers d'incinération d'ordures ménagères (MIOM) ; étude de quelques paramètres influençant les résultats de toxicité, Mémoire de DEA Sciences et Techniques du Déchet, INSA de Lyon, 55 pages.
- Elendt B.P., Bias W.R. (1990). Trace nutrient deficiency in *Daphnia magna* cultured in standard medium for toxicity testing. Effects of the optimization of culture conditions on life history parameters of *D. Magna*, *Water Res.* 24 : 1157-1167.
- Elger A., Barrat-Segretain M.H. (2002). Use of pond snail *Lymnea stagnalis* (L.) in laboratory experiments for evaluating macrophyte palatability, *Arch. Hydrobiol.* 153 : 669-683.
- Ellis D.A., Hanson M.L., Sibley P.K., Shahid T., Fineberg N.A., Solomon K.R., Muir D.C.G., Mabury S.A. (2001). The fate and persistence of trifluoroacetic and chloroacetic acids in pond waters, *Chemosphere* 42 : 309-318.
- Emerson K., Russo R.C., Lund R.E., Thurston R.V. (1975). Aqueous ammonia equilibrium calculations : effect of pH and temperature, *J. Fish. Res. Board Canada* 32 : 2379-2383.
- Feiler U., Kirchesch I., Heininger P. (2004). A new plant-based bioassay for aquatic sediments, *J. Soils & Sediments* 4 : 261-266.
- Fent K. (2003). Ecotoxicological problems associated with contaminated sites, *Toxicology Letters* 140-141 : 353-365.
- Fernandez-Casalderrey A. , Ferrando M.D., Andreu-Moliner E. (1993). Effect of the insecticide methylparathion on filtration and ingestion rates of *Brachionus calyciflorus* and *Daphnia magna*, *Sci. Tot. Environ.*, Supplement, 867-876.
- Ferrari B. (2000). Contribution à l'étude de l'écocompatibilité de mâchefers d'incinération d'ordures ménagères et de scories de seconde fusion du plomb, Thèse de Doctorat de l' Université de Metz, spécialité « Toxicologie de l'environnement», Metz, 151 pages.

- Ferrari B., Radetski C. M., Veber A.-M., Férard J.-F. (1999). Ecotoxicological assessment of solid wastes: a combined liquid and solid-phase testing approach using a battery of bioassays and biomarkers, *Environ. Toxicol. Chem.* 18 : 1195-1202.
- Feurtet-Mazel A., Grollier T., Grouselle M., Ribeyre F., Boudou A. (1996). Experimental study of bioaccumulation and effects of the herbicide Isoproturon on freshwater rooted macrophytes, *Chemosphere* 32 : 1499-1512.
- Fleeger J.W., Carman K.R., Nisbet R.M. (2003). Indirect effects of contaminants in aquatic ecosystems, *Sci. Tot. Environ.* 317 : 207-233.
- Fleming R.J., Holmes D., Nixon S.J. (1998). Toxicity of permethrin to *Chironomus riparius* in artificial and natural sediment, *Environ. Toxicol. Chem.* 17 : 1332-1337.
- Flickinger A.L., Bruins R.J.F., Winner R.W., Skillings J.H. (1982). Filtration and phototactic behavior as indices of copper stress in *Daphnia magna* Straus, *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 11 : 457-463.
- Fliedner A., Klein W. (1996). Effects of Lindane on the Plancktonic Community in Freshwater Microcosms, *Ecotoxicol. Environ. Safety* 33 : 228-235.
- Foekema E.M., Scholten M.C.TH., Jak R.G., Hernandez P., Prats D., Clément B., Blake G., Hoornsman G., Van Den Veen D.P.C., Asensi J.C., Navarro M.J. Anton P. (1996). Phosphorus- algal response curves : a critical analysis of the Vollenweider model, Technical report of the 1995 Research Programm, TNO- Report TNO-MEP- R 96/030, 57.
- Forbes V.E., Forbes T.L. (1994). Microcosmes (in *Ecotoxicologie, théorie et applications*, traduit par J.L. Rivière, INRA Editions, 256 pages), 88-91.
- Freyssinet Ph., Piantone P., Azaroual M., Itard Y., Clozel-Leloup B., Guyonnet D., Baudron J.C. (2002). Chemical changes and leachate mass balance of municipal solid waste bottom ash submitted to weathering, *Waste Manag.* 22 : 159-172.
- Gaidon B. (1994). Le problème de la prise en compte de la double complexité effluent/milieu récepteur dans l'évaluation écotoxicologique des effluents. DEA Analyse et Modélisation des Systèmes Biologiques, ENTPE, Rapport bibliographique, janvier 94.
- Gaillard J.F. (1995). Limnologie chimique : principes et processus, in *Limnologie générale*, Pourriot R. & Meybeck M., Editions Masson, 115-156.
- Garban B., Ollivon D. (1995). Transport et devenir de polluants et micropolluants en Seine. Rôle des matières en suspension et des sédiments dans les processus de transfert, Thèse de Doctorat de l'Université de Paris VI, pp 46-49.
- Garric J., Bray M., Vollat B., Clément B., Devaux A., Delolme C., Durrieu C., Bedell J.P. (2001). Evaluation écotoxicologique de sédiments contaminés ou de matériaux de dragage. (II). Présentation des méthodes d'essai, rapport Cetmef/Drast et VNF, avril 2001, 46 pages.
- Gauthier T.D., Shane E.C., Guerin W.F., Seltz W.R., Grant C.L. (1986). Fluorescence quenching method for determining equilibrium constants for polycyclic aromatic hydrocarbons binding to dissolved organic materials, *Environ. Sci. Technol.* 20 : 1162-1166.
- Geffard O., Budzinski H., His E. (1999). The toxicity of phenanthrene (PHE), 2 methylphenanthrene (2MP) and benzo(a)pyrene (BAP) on embryogenesis and larval development oysters (*Crassostrea gigas*) and sea urchins

- (*Paracentrotus lividus*). Abstract. 17 th International Symposium on Polycyclic Aromatic Compounds, 25-29 October, Bordeaux, France, p 195.
- Geiger J.G., Buikema A.L. Jr (1981). Oxygen consumption and filtering rate of *Daphnia pulex* after exposure to water-soluble fractions of naphthalene, phenanthrene, No.2 fuel oil, and coal-tar creosote, *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 27 : 783-789.
- Giddings J.M., Biever R.C., Helm R.L., Howick G.L., deNoyelles Jr. F.J. (1994). The fate and effects of guthion (azynphos methyl) in mesocosms, In *Aquatic Mesocosm Studies in Ecological Risk Assessment*, R.L. Graney, J.H. Kennedy, J.H. Rodgers, Eds, SETAC Special Publications Series, Lewis Publishers.
- Giddings J.M., Eddlemon G.K. (1979). Some ecological and experimental properties of complex aquatic microcosms, *Intern. J. Environ. Studies* 13 : 119-123.
- Girling A. E., Pascoe D., Janssen C. R., Peither A., Wenzel A., Schäfer H., Neumeier B., Mitchell G. C., Taylor E. J., Maund S. J., Lay J. P., Jüttner I., Crossland N. O., Stephenson R. R., Persoone G. (2000). Development of methods for evaluating toxicity to freshwater ecosystems, *Ecotoxicol. Environ. Safety* 45 : 148-176.
- Godde M. (2001). Evaluation de la toxicité du pyrène sur des organismes aquatiques au moyen de tests monospécifiques, Mémoire de DEA Sciences et Techniques du Déchet, INSA de Lyon, 53 pages.
- Gomot A. (1998). Toxic Effects of Cadmium on Reproduction, Development, and Hatching in the Freshwater Snail *Lymnaea stagnalis* for Water Quality Monitoring, *Ecotoxicol. Environ. Safety* 41 : 288-297.
- Gourlay C. (2004). Biodisponibilité des hydrocarbures aromatiques polycycliques dans les écosystèmes aquatiques : influence de la matière organique naturelle et anthropique, Thèse de Doctorat de l'ENGREF, spécialité Géosciences et ressources naturelles, 128 pages hors annexes.
- Gourlay C, Miège C, Tusseau-Vuillemin MH, Mouchel JM, Garric J. (2002). The use of spectrofluorimetry for the determination of polycyclic aromatic hydrocarbons bioaccumulation and biotransformation in *Daphnia magna*. *Polycyclic Aromatic Compounds* 22 : 3-4, pp 501-516.
- Grathwohl P. (1990). Influence of organic matter from soils and sediments from various origins on the sorption of some chlorinated aliphatic hydrocarbons, implications on Koc correlations, *Environ. Sci. Technol.* 24 : 1687-1693.
- Gros R. (2002). Fonctionnement et qualité des sols soumis à des perturbations physiques et chimiques d'origine anthropique : Réponses du sol, de la flore et de la microflore bactérienne tellurique, Thèse de Doctorat de l'Université de Savoie, spécialité « Biologie des populations et des écosystèmes », Chambéry, 237 pages.
- Guerrero N.R. V., Taylor M.G., Davies N.A., Lawrence M.A.M., Edwards P.A., Simkiss K., Wider E.A. (2002). Evidence of differences in the biotransformation of organic contaminants in three species of freshwater invertebrates, *Environ. Pollut.* 117 : 523-530.
- Guthrie E.A., Bortiatynski J.M., Van Heemst J.D.H., Richman J.E., Hardy K.S., Kovach E.M., Hatcher P.G. (1999). Determination of [C-13]pyrene sequestration in sediment microcosms using flash pyrolysis GC-MS and C-13 NMR, *Environ. Sci. Technol.* 33 : 119-125.
- Haitzer M., Höss S., Transpurger W., Steinberg C. (1998). Effects of dissolved organic matter (DOM) on the bioconcentration of organic chemicals in aquatic organisms – a review, *Chemosphere* 37 : 1335-1362.
- Haitzer M., Höss S., Traunspurger W., Steinberg C. (1999). Relationship between concentration of dissolved organic matter (DOM) and the effect of DOM on the bioconcentration of benzo(a)pyrene, *Aquat. Toxicol.* 45 : 147-158.

- Hanson M.L., Sibley P.K., Ellis D.A., Mabury S.A., Muir D.C.G., Solomon K.R. (2002). Evaluation of monochloroacetic acid (MCA) degradation and toxicity to *Lemna gibba*, *Myriophyllum spicatum*, and *Myriophyllum sibiricum* in aquatic microcosms, *Aquat. Toxicol.*, 61 : 251-273.
- Hanson M.L., Sibley P.K., Ellis D.A., Mabury S.A., Muir D.C.G., Solomon K.R. (2003). Field level evaluation and risk assessment of the toxicity of dichloroacetic acid to the aquatic macrophytes *Lemna gibba*, *Myriophyllum spicatum*, and *Myriophyllum sibiricum*, *Ecotoxicol. Environ. Safety*, 55 : 46-63.
- Heimbach F., Pflueger W., Rätte H.T. (1992). Use of small artificial ponds for assessment of hazards to aquatic ecosystems, *Environ. Toxicol. Chem.* 11 : 27-34.
- Heyvang (2004). Détermination de la toxicité de sédiments vis-à-vis de *Chironomus riparius* – Application aux boues de l'assainissement pluvial, Laboratoire Régional de l'Ouest Parisien, Programme D, Opération 1D011 : Transfert de polluants dans les eaux de ruissellement et les sols, 41 p..
- Hense B.A., Welzl G., Severin G.F., Schramm K.W. (2005). Nonylphenol induced changes in trophic web structure of plankton analysed by multivariate statistical approaches, *Aquatic Toxicol.* 73 : 190–209.
- Holm H.W., Kollig H.P., Payne Jr. W.R., Proctor L.M. (1983). Fate of methyl parathion in aquatic channel microcosms, *Environ. Toxicol. Chem.* 2 : 169-176.
- Huang X.D., Dixon D.G., Greenberg G.B.M. (1995). Increased polycyclic aromatic hydrocarbon toxicity following their photomodification in natural sunlight : impacts on the duckweed *Lemna gibba* L.G-3, *Ecotoxicol. Environ. Safety* 32 : 194-200.
- Huovinen P.S., Soimasuo M.R., Oikari A.O.J. (2001). Photoinduced toxicity of retene to *Daphnia magna* under enhanced UV-B radiation, *Chemosphere* 45 : 683-691.
- Ingersoll C.G., Nelson M.K. (1990). Testing sediment toxicity with *Hyaella azteca* (Amphipoda) and *Chironomus riparius* (Diptera), in Landis W.G. and Van der Schalie W.H. (Eds), *Aquatic Toxicology and Risk Assessment*, American Society for Testing and Materials, Philmdelphia, P.A., U.S.A., 13 : 93-109.
- Irfanullah H.Md, Moss B. (2004). Factors influencing the return of submerged plants to a clear-water, shallow temperate lake, *Aquatic Botany* 80 : 177-191.
- ISO (1989). Qualité de l'eau - Détermination de l'inhibition de la mobilité de *Daphnia magna* Strauss (Cladocera, Crustacea), norme ISO 6341.
- ISO (2003). Qualité de l'eau - Détermination de l'effet toxique des composants des eaux et des eaux résiduaires vis-à-vis des lentilles d'eau (*Lemna minor*) - Essai d'inhibition de croissance des lentilles d'eau, ISO/DIS 20079, 29 p..
- Jak R.G., Foekema E.M., Scholten M.C.Th. (1998). Dimethoate effects in outdoor and indoor multispecies systems, 8th Annual Meeting of SETAC-Europe, 14-18 April 1998, Bordeaux (France), résumé de poster.
- Jenner H. A., Janssen-Mommen J. P. M. (1993). Duckweed *Lemna minor* as a tool for testing toxicity of coal residues and polluted sediments, *Arch. Environ. Contam. Tox.* 25 : 3-11.
- Jontofsohn M., Stoffels M., Hartmann A., Pfister G., Jüttner I., Severin-Edmair G., Schramm K.W., Schloter M. (2002). Influence of nonylphenol on the microbial community of lake sediments in microcosms, *Sci. Total Environ.* 285 : 3-10.
- Jouanneau Y., Blake G., Clément B., David B., Naffrechoux E. (2003). Devenir des hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP) dans un écosystème aquatique et impact sur les organismes vivants : exemple du

- pyrène. Rapport CNRS-PEVS, Ecosystèmes et Environnement, appel d'offres "Dynamique des contaminants", 126 pages.
- Juchelka C.M., Snell T.W. (1995). Rapid toxicity assessment using ingestion rate of cladocerans and ciliates, *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 28 : 508-512.
- Kähkönen M.A., Kairesalo T. (1998). The effect of nickel on the nutrient fluxes and on the growth of *Elodea canadensis*, *Chemosphere* 37 : 1521-1530.
- Kalf D.F., Crommentuijn T., Van De Plassche E.J. (1997). Environmental Quality Objectives for 10 Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs), *Ecotoxicol. Environ. Safety* 36 : 89-97.
- Kefford B.J., Nuggeoda D. (2005). No evidence for a critical salinity threshold for growth and reproduction in the freshwater snail *Physa acuta*, *Environ. Pollut.* 134 : 377-383.
- Kemble N.E., Dwyer F.J., Ingersoll C.G., Dawson T.D., Norberg-King T.J. (1999). Tolerance of freshwater test organisms to formulated sediments for use as control materials in whole-sediment toxicity tests, *Environ. Toxicol. Chem.* 18/2 : 222-230.
- Kersting K., Van Wijngaarden R. (1992). Effects of chlorpyrifos on a microecosystem, *Environ. Toxicol. Chem.* 11 : 365-372.
- Kimball K.D., Levin S.A. (1985). Limitations of laboratory bioassays : the need for ecosystem-level testing, *Bioscience* 35 : 165-171.
- Kratasyuk V.A., Esimbekova E.N., Gladyshev M.I., Khromichuk E.B., Kuznetsov A.M., Ivanova E.A. (2001). The use of bioluminescent biotests for study of natural and laboratory aquatic ecosystems, *Chemosphere* 42 : 909-915.
- Kroer N., Coffin R.B., Jorgensen N.O.G. (1994). Comparisons of microbial trophic interactions in aquatic microcosms designed for the testing of introduced microorganisms, *Environ. Toxicol. Chem.* 13 : 247-257.
- Krylov S.N., Huang X.D., Zeiler L.F., Dixon D.G., Greenberg B.M. (1997). Mechanistic quantitative structure-activity relationship model for the photoinduced toxicity of polycyclic aromatic hydrocarbons: I. Physical model based on chemical kinetics in a two-compartment system, *Environ. Toxicol. Chem.* 16 : 2283-2295.
- Kubitz J. A., Besser J. M., Giesy J. P. (1996). A two-step experimental design for a sediment bioassay using growth of the amphipod *Hyaella azteca* for the test end point, *Environ. Toxicol. Chem.* 15 : 1783-1792.
- Kukkonen J., Oikari A. (1991). Bioavailability of organic pollutants in boreal waters with varying levels of dissolved organic material, *Wat. Res.* 25 : 455-463.
- Kwan K.K., Dutka B.J. (1996). Development of reference sediment samples for solid phase toxicity screening tests, *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 56 : 696-702.
- Labroue L., Capblancq J., Dauta A. (1995). Cycle des nutriments : l'azote et le phosphore, in *Limnologie générale*, Pourriot R. & Meybeck M., Editions Masson, 727-764.
- Lagadic L., Caquet T. (1996). Marqueurs biologiques de pollution : des outils au service de l'écotoxicologie, *INRA mensuel* 88 : 34-38.
- Lagadic L., Caquet T., Ramade F. (1994). The role of biomarkers in environmental assessment (5). Invertebrate populations and communities, *Ecotoxicology* 3 : 193-208.
- Lambolez L., Vasseur P., Férard J.F., Giesbert T. (1994). The environmental risks of industrial waste disposal : an experimental approach including acute and chronic toxicities studies, *Ecotoxicol. Environ. Safety* 28 : 317-328.

- Lampert W. (1987). Feeding and nutrition in *Daphnia*, in R.H. Peters & R. De Bernardi, Eds., “*Daphnia*”, *Memorie dell’Istituto Italiano di Idrobiologia* 45 : 143-192.
- Lampert W., Fleckner W., Rai H., Taylor B.E. (1986). Phytoplankton control by grazing zooplankton : a study on the clear-water phase, *Limnol. Oceanogr.* 31 : 478-490.
- Landis W.G., Matthews R.A., Markiewicz A.J., Matthews G.B. (1993). Multivariate analysis of the impacts of the turbine fuel JP-4 in a microcosm toxicity test with implications for the evaluation of ecosystem dynamics and risk assessment, *Ecotoxicology*. 2 : 271-300.
- Landrum P.F., Dupuis W.S., Kukkonen J. (1994). Toxicokinetics and toxicity of sediment-associated pyrene and phenanthrene in *Diporeia* spp.: examination of equilibrium-partitioning theory and residue-based effects for assessing hazard, *Environ. Toxicol. Chem.* 13 : 1769-1780.
- Landrum P.F., Faust W.R. (1994). The role of sediment composition on the bioavailability of laboratory-dosed sediment-associated organic contaminants to the amphipod, *Diporeia* (spp.), *Chem. Speciation Bioavail.* 6 : 85-92.
- Landrum P.F., Gossiaux D.C., Kukkonen J. (1997). Sediment characteristics influencing the bioavailability of nonpolar organic contaminants to *Diporeia* spp., *Chemical Speciation and Bioavailability* 9 : 43-55.
- Larsen D.P., Denoyelles F.Jr., Stay F., Shiroyama T. (1986). Comparisons of single-species, microcosm, and experimental point responses to atrazine exposure, *Environ. Toxicol. Chem.* 5 : 179-190.
- Lay J.P., Peither A., Jüttner I., Weiss K. (1993). *In situ* pond mesocosms for ecotoxicological long-term studies, *Chemosphere* 26 : 1137-1150
- Leffler, J.W. (1984). The use of self-selected, generic aquatic microcosms for pollution effects assessment. In: White, H.H. (Ed.), *Concepts in Marine Pollution Measurements*. University of Maryland, College Park, MD, pp. 139-158.
- Legierse K.C.H.M., Sijm D.T.H.M., van Leeuwen C.J., Seinen W., Hermens J.L.M. (1998). Bioconcentration kinetics of chlorobenzenes and the organophosphorus pesticide chlorthion in the pond snail *Lymnaea stagnalis* - a comparison with the guppy *Poecilia reticulata*, *Aquat. Toxicol.* 41 : 301-323.
- Lei A.P., Wong Y.S., Tam N.F.Y. (2003). Pyrene-induced changes of glutathione-S-transferase activities in different microalgal species, *Chemosphere* 50 : 293–301.
- Lei A.P., Wong Y.S., Tam N.F.Y. (2001). Removal of pyrene by different microalgal species. In: *Proceedings of Asian Waterqual 2001, 1st Asia-Pacific Regional Conference*, Fukuoka, Japan. pp. 969–974.
- Leppänen M.T., Kukkonen J.V.K. (2000). Effect of sediment-chemical contact time on availability of sediment-associated pyrene and benzo(a)pyrene to oligochaete worms and semi-permeable membrane devices, *Aquat. Toxicol.* 49 : 227-241.
- Leung K.M.Y., Morley N.J., Grist E.P.M., Morrith D., Crane M. (2004). Chronic toxicity of tributyltin on development and reproduction of the hermaphroditic snail *Physa fontinalis* : Influence of population density, *Mar. Environ. Research* 58 : 157-162.
- Lewis M.A. (1993). Freshwater primary producers, in *Handbook of Ecotoxicology*, vol. 1, P. Calow Ed., 28-50.
- Liawska-Bizukojc E., Miksch K., Malachowska-Jutz A., Kalka J. (2005). Acute toxicity and genotoxicity of five selected anionic and nonionic surfactants, *Chemosphere* 58 : 1249-1253.

- Lodge D. M., Brown K. M., Klosiewski S. P., Stein R. A., Covich A. P., Leathers B. K., Brönmark, C. (1986). Distribution of freshwater snails : spatial scale and the relative importance of physicochemical and biotic factors. *Am. Malac. Bull.* 5, 73-84.
- Lottmann A. (2003). Application d'un protocole d'essais écotoxicologiques en microcosmes de 100 litres à l'étude d'un percolat de mâchefers d'incinération d'ordures ménagères, Mémoire de DEA Toxicologie de l'Environnement, Université de Metz, 65 pages.
- Lyons B.P., Pascoe C.K., McFadzen I.R.B. (2002). Phototoxicity of pyrene and benzo[a]pyrene to embryo-larval stages of the pacific oyster *Crassostrea gigas*, *Marine Environ. Research* 54 : 627–631.
- MacDonald D.D., C.G. Ingersoll, Berger T.A. (2000). Development and evaluation of consensus-based sediment quality guidelines for freshwater ecosystems, *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 39 : 20-31.
- Madsen S.D., Forbes T.L., Forbes V.E. (1997). Particle mixing by the polychaete *Capitella* species 1: coupling fate and effect of a particle-bound organic contaminant (fluoranthene) in a marine sediment, *Marine Ecology Progress Series* 147 : 129-142.
- Mal T.K., Adorjan P., Corbett A.L. (2002). Effect of copper on growth of an aquatic macrophyte *Elodea canadensis*, *Environ. Pollut.*, 120 : 307-311.
- Malley, D.F., Chang, P.S.S., Hesslein, R.H., 1989. Whole lake addition of ¹⁰⁹Cd: radiotracer accumulation in the mussel population in the first year. *Sci. Total Environ.* 87/88 : 397–417.
- Marot F. (1997). Caractérisation et traitement de sédiments de dragage contenant des polluants métalliques. Thèse de doctorat spécialité Génie civil et environnement : Université du Havre, 12 novembre 1997. 330 p.
- MATE (1992). Loi 92/646 du 13 juillet 1992 - Modification de la loi 75/633 du 15 juillet 1975 relative à l'élimination des déchets et la récupération des matériaux.
- MATE (1994). Circulaire ministérielle du 9 mai 1994 relative à l'élimination des mâchefers d'incinération des résidus urbains n° 94-IV-1.
- MATE (1997). Biologie et écologie des espèces végétales proliférant en France - Synthèse bibliographique, Les études des Agences de l'Eau, 202 p..
- McCarthy J.F. (1989). Bioavailability and toxicity of metals and hydrophobic organic contaminants, *In Aquatic humic Substances, influence on fate and treatment of pollutants*, I.H. Suffet and P. McCarthy Edit., American Chemical Society, Washington D.C., 864 p..
- McCarthy J.F. (1983). Role of particulate organic matter in decreasing accumulation of polynuclear aromatic hydrocarbons by *Daphnia magna*, *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 12 : 559-568.
- McDonald B.G., Chapman P.M. (2002). PAH phototoxicity - an ecologically irrelevant phenomenon ?, *Marine Pollut. Bull.* 44 : 1321–1326
- Meima J. A., Comans R. N. J. (1999). The leaching of trace elements from municipal solid waste incinerator bottom ash at different stages of weathering, *Appl. Geochem.* 14 : 159-171.
- Merlin G. (1988). Contamination par le PCP d'écosystèmes aquatiques reconstitués, Thèse de Doctorat, Grenoble I, 222 p..
- Merlin G., Blake G. (1991). Absorption des pesticides par les macrophytes aquatiques : effets comparés sur la photosynthèse, cas du PCP, *Verh. Internat. Verein. Limnol.*, 24 : 2282-2288.
- Merlin G., Kilanda M.M., Blake G. (1993). Evaluation of ecotoxicological impact of detergent effluents using laboratory microcosms, *Fresenius Envir. Bull.* 2 : 185-192.

- Merlin G., Lissolo T., Morel V. (1995). Precautions for Routine Use of INT Reductase Activity for Measuring Biological Activities in Soil and Sediments, *Environ. Toxicol. Water Qual.* 10: 185-192.
- Merlin G., Thiébaud H., Blake G., Sembiring S., Alary J. (1992). Mesocosms and microcosms utilization for ecotoxicity evaluation of dichloromethane, a chlorinated solvent, *Chemosphere* 24 : 37-50.
- Merlin G., Vuillod M., Lissolo T., Clément B. (2002). Fate and bioaccumulation of isoproturon in outdoor aquatic microcosms, *Environ. Toxicol. Chem.* 21 : 1236-1242.
- Merlin G., Yosowigdagdo R., Thiébaud H., Blake G., Benoit-Guyod J.-L. (1994). Application of aquatic laboratory microcosms as experimental exposure assessment models : comparison between methylene chloride and xylylxylene. SETAC Europe 4th Annual Meeting, Brussels, April 11-14th 1994.
- Meybeck M. (1995). Les lacs et leur bassin, in *Limnologie générale*, Pourriot R. & Meybeck M., 6-59.
- Miller J.S. (1999). Determination of polycyclic aromatic hydrocarbons by spectrofluorimetry, *Anal. Chim. Acta* 38 : 27-44.
- Munoz M.J., Tarazona J.V. (1993). Synergistic effect to two- and four-component combinations of the polycyclic aromatic hydrocarbons : Phenanthrene, Anthracene, Naphthalene and Acenaphthene on *Daphnia magna*, *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 50 : 363-368.
- Naffrechoux E., Combet E., Fanget B., Paturel L., Saber A. (1999). Occurrence and fate of PAHs from motorway runoff in the north drainage basin of Annecy lake, France. Abstract. 17th International Symposium On Polycyclic Aromatic Compounds, 25-29 October, Bordeaux, France, p 182.
- Naylor C., Rodrigues C. (1995). Development of a test method for *Chironomus riparius* using a formulated sediment, *Chemosphere* 31 : 3291-3303.
- Nebeker A.V., Cairns M.A., Wise C.M. (1984). Relative sensitivity of *Chironomus tentans* life stages to copper, *Environ. Toxicol. Chem.* 3 : 151-158.
- Newsted, J.L., Giesy, J.P. (1987) Predictive models for photoinduced acute toxicity of polycyclic aromatic hydrocarbons to *Daphnia magna*, Strauss (Cladocera, crustacea), *Environ. Toxicol. Chem.* 6 : 445-461.
- Nikkilä A., Kukkonen J.V.K. (2001). Effects of dissolved organic material on binding and toxicokinetics of pyrene in the waterflea *Daphnia magna*, *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 40 : 333-338.
- Nixon S.W. (1969). A synthetic microcosm, *Limnol. Oceanogr.* 14 : 142-145.
- NRCC (1983). Polycyclic aromatic hydrocarbons in the aquatic environment : formation, sources, fate and effects on aquatic biota. NRC Associate Committee on the Scientific Criteria for Environmental Quality, National Research Council of Canada, NRCC Publication No. 18981, Ottawa, 209 pp.
- Nyström B., Becker-Van Slooten K., Bérard A., Grandjean D., Druart J.C., Leboulanger C. (2002). Toxic effects of Irgarol 1051 on phytoplankton and macrophytes in Lake Geneva, *Water Res.* 36 : 2020-2028.
- OCDE (1993). Algal growth inhibition test, #201, adopted 7 june 1984, OECD Guideline for testing of chemicals.
- OCDE (1998). OECD Guidelines for the Testing of Chemicals - Proposal for a new guideline - Chironomid Toxicity Test Using Spiked Sediment, Draft Document, May 98, 14 pages.
- OCDE (2000). OECD Guidelines for Testing Chemicals - *Lemna* sp. Growth Inhibition Test, Proposal for a new guideline 221, revised draft document, October 2000.

- Ollivon D., Garban B., Chesterikoff A. (1995). Analysis of the distribution of some polycyclic aromatic hydrocarbons in sediments and suspended matter in the river Seine (France), *Water Air Soil Pollut.* 81: 135-152.
- Ozimek T., van Donk E., R.D. Gulati (1993). Growth and nutrient uptake by two species of *Elodea* in experimental conditions and their role in nutrient accumulation in a macrophyte dominant lake, *Hydrobiologia* 251 : 13-18.
- Parent-Raoult C. (2004). Etude en systèmes artificiels de laboratoire des effets de Rejets Urbains de Temps de Pluie sur les communautés périphytiques : influence de facteurs d'exposition, rapport de thèse de l'Université Claude Bernard Lyon 1, Ecole doctorale : Ecosystèmes, Evolution, Modélisation, Microbiologie, spécialité : Analyse et Modélisation des Systèmes Biologiques, 299 pages.
- Pascoe D., Williams K.A., Greene D.W.J. (1989). Chronic toxicity of Cadmium to *Chironomus riparius* Meigen - Effects upon larval development and adult emergence, *Hydrobiologia* 175 : 109-115.
- Pascoe M.A., Wenzel A., Janssen C., Girling A. E., Jüttner I., Fliedner A., Blockwell S.J., Maund S. J., Taylor E. J., Diedrich M., Persoone G., Verhelst P., Stephenson R. R., Crossland N. O., Mitchell G. C. , Pearson N. , Tattersfield L., Lay J.-P. , Peither A., Neumeier B., Velletti A.-R. (2000). The development of toxicity tests for freshwater pollutants and their validation in stream and pond mesocosms, *Wat. Res.* 34 : 2323-2329.
- Pelletier M.C., Burgess R.M., Ho K.T., Kuhn A., McKinney R.A., Ryba S.A. (1997). Phototoxicity of individual polycyclic aromatic hydrocarbons and petroleum to marine invertebrate larvae and juveniles, *Environ. Toxicol. Chem.* 16 : 2190-2199.
- Pérès F., Florin D., Grollier T., Feurtet-Mazel A., Costec M., F. Ribeyre F., Ricard M., Boudou A. (1996). Effects of the phenylurea herbicide isoproturon on periphytic diatom communities in freshwater indoor microcosms, *Environ. Pollut.* 94 : 141-152.
- Perrodin Y., Babut M., Bedell, J.P., Bray M., Clément B., Delolme C., Devaux A., Durrieu C., Garric J., Montuelle B. (2004). Approche méthodologique de l'évaluation des risques écologiques liés à la mise en dépôt sur sol de sédiments de dragage, *Déchets, Sciences et Techniques* 34 : 4-13.
- Perrodin Y., Gobbey A., Grelier-Volatier L., Canivet V., Fruget J.-F., Gibert J., Texier C. Cluzeau D., Gros R., Poly F., Jocteur-Monrozier L. (2002). Waste ecocompatibility in storage and reuse scenarios : global methodology and detailed presentation of the impact study on the recipient environments, *Waste Manag.* 22 : 215-228.
- Péry A.R.R., Mons R., Flammarion P., Lagadic L., Garric J. (2002). A modelling approach to link food availability, growth, emergence and reproduction for the midge *Chironomus riparius*. *Environ. Toxicol. Chem.* 21 : 2507-2513.
- Pieczynska E. (2003). Effect of damage by the snail *Lymnaea (Lymnaea) stagnalis* (L.) on the growth of *Elodea canadensis* Michx, *Aquatic Botany* 75 : 137-145.
- Pontasch K.W., Niederlehner B.R., Cairns J.Jr. (1989). Comparisons of single-species, microcosm and field responses to a complex effluent, *Environ. Toxicol. Chem.* 8 : 521-532.
- Pratt J.R., Niederlehner B.R., Bowers N., Cairns J.Jr. (1987). Prediction of permissible concentrations of copper from microcosm toxicity tests, *Toxicity Assessment : An International Quarterly* 2 : 417-436.

- Radix P., Léonard M., Papantoniou C., Roman G., Saouter E., Gallotti-Schmitt S., Thiébaud H., Vasseur P. (2000). Comparison of four chronic toxicity tests using algae, bacteria and invertebrate assessed with sixteen chemicals, *Ecotoxicol. Environ Safety* 47 : 186-194.
- Rai L.C., Mallick N. (1993). Heavy metal toxicity to algae under synthetic microcosm, *Ecotoxicology* 2 : 231-242.
- Ramade F. (2002). Dictionnaire encyclopédique de l'écologie et des sciences de l'environnement, Dunod, Paris, 1075.
- Ramos E.U. , Vermeer C., Vaes W.H.J., Hermens J.L.M. (1998). Acute toxicity of polar narcotics to three aquatic species (*Daphnia magna*, *Poecilia reticulata* and *Lymnaea stagnalis*) and its relation to hydrophobicity, *Chemosphere* 37 : 633-650.
- Rand G.M., Wheat J.V., Carriger J.F., Lee T.A. (2003). An automated overlying water-renewal system for sediment toxicity studies, *Environmental Pollution* 122 : 169–175.
- Raymond N., Geoffroy L., Bourasseau L., Budzinski H., Nadalig T., Gilewicz M. (1999). Bacterial aerobic degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by pure strains : characterisation of catabolic abilities using respiration studies. Abstract. 17 th International Symposium on Polycyclic Aromatic Compounds, 25-29 October, Bordeaux, France, p. 213.
- Ren L., Huang X.D., Mcconkey B.J., Dixon D.G., Greenberg B.M. (1994). Photoinduced toxicity of three polycyclic aromatic hydrocarbons (Fluoranthene, Pyrene, and Naphthalene) to the Duckweed *Lemna gibba* L. G-3, *Ecotoxicol. Environ. Safety* 28 : 160-171.
- Reynoldson T.B., Day K.E., Clarke C., Milani D. (1994). Effects of indigenous animals on chronic end points in fresh water sediment toxicity tests, *Environ. Toxicol. Chem.* 13 : 973-977.
- Rico-Martinez R., Perez-Legaspi I.A., Quintero-Diaz G.E., Rodriguez-Martinez M.G., Hernandez-Rodriguez M.A., Zaragoza-Almaraz J.E. (1998). Effects of copper addition to laboratory maintained microcosms of Presidente Calles Reservoir organisms (Aguascalientes, Mexico), *Aquatic Ecosystem Health Management* 1 : 323-332.
- Roghair C.J., Buijze A., Schoon H.N.P. (1992). Ecotoxicological risk evaluation of the cationic fabric softener DTDMAC. I. Ecotoxicological effects, *Chemosphere* 24 : 599-609.
- Rose K.A., Swartzman G.L., Kindig A.C., Taub F.B. (1988). Stepwise iterative calibration of a multi-species phytoplankton-zooplankton simulation model using laboratory data, *Ecol. Model.* 42 : 1-32.
- Russo J., Lagadic L. (2004). Effects of environmental concentrations of atrazine on hemocyte density and phagocytic activity in the pond snail *Lymnaea stagnalis* (Gastropoda, Pulmonata), *Environ. Pollut.* 127 : 303-311
- Salanki J., Farkas A., Kamardina T., Rozsa S. (2003). Molluscs in biological monitoring of water quality, *Toxicology Letters* 140/141 : 403-/410.
- Samecka-Cymerman A., Kempers A.J. (2004). Toxic metals in aquatic plants surviving in surface water polluted by copper mining industry, *Ecotoxicol. Environ. Safety* 59 : 64–69.
- Sánchez P., Alonso C., Fernández C., Vega M.M., García M.P., Tarazona J.V. (2004). Evaluation of a Multi-species Test System for Assessing Acute and Chronic Toxicity of Sediments and Water to Aquatic Invertebrates - Effects of Pentachlorophenol on *Daphnia magna* and *Chironomus prasinus*, *J Soils & Sediments* (OnlineFirst): 1 - 6.

- Sánchez P., Tarazona J.V. (2002). Development of a multispecies system for testing reproductive effects on aquatic invertebrates. Experience with *Daphnia magna*, *Chironomus prasinus* and *Lymnaea peregra*, *Aquat. Toxicol.* 60 : 249-256.
- Sanderson H., Boudreau T.M., Mabury S.A., Cheong W-J., Solomon K.R. (2002). Ecological impact of perfluorooctane sulfonate on the zooplankton community in indoor microcosms, *Environ. Toxicol. Chem.* 21 : 1490-1496 .
- Sanderson H., Boudreau T.M., Mabury S.A., Solomon K.R. (2003). Impact of perfluorooctanoic acid on the structure of the zooplankton community in indoor microcosms, *Aquatic Toxicol.* 62 : 227-234.
- Sawyer LN, Burton GA. (1994). Validation of various formulated sediment recipes for use in toxicity assessments. Abstract, 15th Annual Meeting Society Environmental Toxicology and Chemistry, Denver, CO, USA, October 30-November 3, 1994, p. 224.
- Scanferlato V.S., Cairns J. Jr. (1990). Effect of sediment-associated copper on ecological structure and function of aquatic microcosms, *Aquatic Toxicol.* 18 : 23-34.
- Scholten M.C.Th., Jak R.G., Foekema E.M., Blake G., Merlin G., Prats D., Hernandez P. (1994). Ecological control of algal densities. Towards a better comprehension of eutrophication problems in aquatic ecosystems, Report TNO, TNO-MW-R94/280, 41 pages.
- Seguin F, Leboulanger C, Rimet F, Druart J-C, Bérard A. (2001). Effects of atrazine and nicosulfuron on phytoplankton in systems of increasing complexity, *Arch. Environ. Contamin. Toxicol.* 40:198–208.
- Seguin F. (2001). Effets comparés de deux herbicides, l'atrazine et le nicosulfuron, sur un écosystème aquatique expérimental. Chapitre 1 : Mésocosmes aquatiques, éléments de caractérisation, pp1-22. Thèse Université Toulouse III.
- Seuge J., R. Bluzat R. (1979). Toxicité chronique du carbaryl et du lindane chez le mollusque d'eau douce *Lymnaea stagnalis*, *Water Res.* 13 : 285-293
- Seuge J., R. Bluzat R., Rodriguez-Ruiz F.J. (1978). Effets d'un mélange herbicide (2,4-D ET 2,4,5-T): toxicité aiguë sur 4 espèces d'invertébrés limniques ; toxicité chronique chez le mollusque pulmoné *Lymnaea*, *Environ. Pollut.* 16 : 87-104
- Shannon L., Harrass M., Yount J.D., Walbridge C.T. (1986). A comparison of mixed flask culture and standardized laboratory model ecosystems for toxicity testing. *Community Toxicity Testing*, STP920, Cairns J.Jr., pp 135-157.
- Sibley P.K., Benoit D.A., Ankley G.T. (1998). Life cycle and behavioural assessments of the influence of substrate particle size on *Chironomus tentans* (Diptera: Chironomidae) in laboratory assays, *Hydrobiologia* 361 : 1-9.
- Sivaci E.R., Sivaci A., Sökmen M. (2004). Biosorption of cadmium by *Myriophyllum spicatum* L. And *Myriophyllum tryphyllum* orchard, *Chemosphere* 56 : 1043-1048.
- Solomon K.R., Sibley P. (2002). New concepts in ecological risk assessment : where do we go from here ? *Mar. Pollut. Bull.* 44 : 279-285.
- Southworth G.R., Beauchamp J.J., Schmieders P.K. (1978). Bioaccumulation potential of polycyclic aromatic hydrocarbons in *Daphnia pulex*, *Water Research*, 12 : 973-977.
- Stay F., Katko A., Rohm C.M., Fix M.A., Larsen D.P. (1988). Effects of fluorene on microcosms developed from four natural communities, *Environ. Toxicol. Chem.* 7 : 635-644.

- Stay F.S., Flum T.E., Shannon L.J., Yount D.J. (1989). An assessment of the precision and accuracy of SAM and MFC microcosms exposed to toxicants, *Aquatic Toxicology and Hazard Assessment* : 12th volume, ASTM STP 1027, U.M. Cowgill and L.R. Williams, Eds., pp 189-203.
- Stay F.S., Jarvinen A.W. (1995). Use of microcosm and fish toxicity data to select mesocosm treatment concentrations, *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 28 : 451-458.
- Steevens J.A, Benson W.H. (1998). *Hyalella azteca* 10-day sediment toxicity test : comparison of growth measurement endpoints, *Environ. Toxicol. Water Qual.* 13 : 243-248.
- Stephenson, M. (1986). Distribution, production, and cadmium concentrations of *Hyalella azteca* (Crustacea: Amphipoda) in central Ontario soft-water lakes. Ph.D. thesis. University of Guelph, Guelph, ON, Canada.
- Stephenson M., Mackie G.L. (1988). Multivariate analysis of correlations between environmental parameters and cadmium concentrations in *Hyalella azteca* (Crustacea: Amphipoda) from central Ontario Lakes, *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 45 : 1705-1710.
- Stephenson M., Turner M.A. (1993). A field study of cadmium dynamics in periphyton and in *Hyalella azteca* (Crustacea: Amphipoda), *Water Air Soil Pollut.* 68 : 341-361.
- Sterner R.W. (1986). Herbivores' direct and indirect effects on algal populations, *Science* 231 : 605-607.
- Stewart K.M., Thompson R.S. (1995). Fluoranthene as a model toxicant in sediment studies with *Chironomus riparius*, *J. Aquat. Ecosystem Health* 4 : 231-238.
- Stewart K.M., Thompson R.S. (1996). Food and density effects in sediment tests with *Chironomus riparius*, poster (PW180), Second SETAC World Congress, 5-9 Nov. 96, Vancouver, Canada.
- Suedel B.C., Deaver E., Rodgers Jr. J.H. (1996). Formulated sediment as a reference and dilution sediment in definitive toxicity tests, *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 30 : 47-52.
- Suedel B.C., Rodgers Jr. J.H. (1994a). Development of formulated reference sediments for freshwater and estuarine sediment testing, *Environ. Toxicol. Chem.* 13/7 : 1163-1175
- Suedel B.C., Rodgers Jr. J.H. (1994b). Responses of *Hyalella azteca* and *Chironomus tentans* to particle-size distribution and organic matter content of formulated and natural freshwater sediments, *Environ. Toxicol. Chem.* 13 : 1639-1648.
- Sugiura K. (1992). A multispecies laboratory microcosm for screening ecotoxicological impacts of chemicals, *Environ. Toxicol. Chem.* 11 : 1217-1226.
- Sugiura K. (1996). The use of an aquatic microcosm for pollution effects assessment, *Water Res.* 30 : 1801-1812.
- Sugiura K. (1996). The use of an aquatic microcosm for pollution effects assessment. *Wat. Res.* 30 : 1801-1812.
- Sugiura K. (2001). Effects of Al³⁺ ions and Cu²⁺ ions on microcosms with three different biological complexities, *Aquatic Toxicol.* 51 : 405-417.
- Sugiura K., Sato S., Goto M., Kurihara Y.(1976). Effects of β -BHC on aquatic microcosm., *Chemosphere* 5 : 39-44.
- Swartz R.C., Ferraro S.P., Lamberson J.O., Cole F.A., Ozretich R.J., Boese B.L., Schults D.W., Behrenfeld M., Ankley G.T. (1997). Photoactivation and toxicity of hydrocarbon compounds in marine sediment, *Environ. Toxicol. Chem.* 10 : 2151-2157.

- Swartz R.C., Schults D.W., Ozretich R.J., Lamberson J.O., Cole F.A., Dewitt T.H., Redmond M.S., Ferraro S.P.(1995). PAHs : a model to predict the toxicity of polynuclear aromatic hydrocarbon mixtures in field-collected sediments, *Environ. Toxicol. Chem.* 14 :1977-1987.
- Swartzman G., Rose K., Kindig A., Taub F. (1989). Modeling the direct and indirect effects of streptomycin in aquatic microcosms, *Aquat. Toxicol.*14 : 109-130.
- Swartzman G., Rose K.A. (1983). Simulating the biological effects of toxicants in aquatic microcosm systems, *Ecol. Model.* 22 : 123-134.
- Swartzman G., Rose K.A. (1983). Simulating the biological effects of toxicants in aquatic microcosm systems, *Ecol. Model.* 22 : 123-134.
- Tanaka N., Inamori Y., Murakami K., Akamatsu T., Kurihara Y (1994). Effect of species composition on stability and reproductivity of a small-scale microcosm system, *Wat. Sci. Tech.* 30 : 125-131.
- Taub F. (1969). A biological model of a freshwater community : a gnotobiotic ecosystem, *Limnol. Oceanogr.* 14 : 136-141.
- Taub F.B. (1989a). Standardized Aquatic Microcosm. Development and Testing. *Aquatic Ecotoxicology : Fundamentals, Concepts and Methodologies*, vol.2, Boudou A., Rybeyre F. (Eds) CRC Press, Boca Raton, Florida, pp 47-91.
- Taub F.B. (1989b). Standardized Aquatic Microcosms, *Environ. Sci. Technol.* 23 : 1064-1066.
- Taub F.B. (1997). Unique information contributed by multispecies systems : examples from the Standardized Aquatic Microcosm, *Ecological Applications* 7 : 1103-1110.
- Taub F.B., Harrass M.C., Hartmann H.J., Kindig A.C., Read P.L. (1981). Effects of initial algal density on community development in aquatic microcosms, *Verh. Internat. Verein. Limnol.* 21 : 197-204.
- Taub F.B., Kindig A.C., Conquest L.L. (1986). Preliminary Results of Interlaboratory Testing of a Standardized Aquatic. *Community Toxicity Testing*, ASTM STP 920, J. Cairns, Jr., pp 93-120.
- Taub F.B., Kindig A.C., Meador J.P., Swartzman G.L. (1991). Effects of "seasonal succession" and grazing on copper toxicity in aquatic microcosms, *Verh. Internat. Verein. Limnol.* 24 : 2205-2214.
- Testard P. (1995). Rôle des macrophytes littoraux dans le fonctionnement des écosystèmes lacustres, in *Limnologie générale*, Pourriot R. et Meybeck M., 296-326.
- Thiébaud H., Merlin G., Capovilla M.P., Blake G. (1994). Fate of a volatile chlorinated solvent in indoor aquatic microcosms : sublethal and static exposure to ¹⁴C-dichloromethane, *Ecotoxicol. Environ. Safety* 28 : 71-81.
- Tidou A.S., Moreteau J.C., Ramade F. (1992). Effects of lindane and deltamethrin on zooplankton communities of experimental ponds, *Hydrobiologia* 232 : 157-168.
- Traub-Eberhard U., Schäfer H., Debus R. (1994). New experimental approach to aquatic microcosm systems, *Chemosphere* 28 : 501-510.
- Triffault-Bouchet G. (2004). Effets sur les écosystèmes aquatiques lenticques des émissions de polluants provenant de différents modes de valorisation/élimination de déchets. Application à des mâchefers d'incinération d'ordures ménagères et à des boues de dragage de canaux, Thèse de Doctorat de l'Université de Savoie (spécialité : Biologie et Biochimie Appliquées), 311 pages.
- Triffault-Bouchet G., Clément B., Blake G. (2005b). Ecotoxicological assessment of pollutant flux released from bottom ash reused in road construction, *Aquat. Ecosystem Health Manag.* 8 : 405-414.

- Triffault-Bouchet G., Clément B., Blake G. (2005a). Assessment of contaminated sediments with an indoor freshwater/sediment microcosm assay, *Environ. Toxicol. Chemistry* 24 : 2243-2253.
- Triffault-Bouchet G., Clément B., Blake G., Perrodin Y. (2004). Evaluation du potentiel toxique de percolats de mâchefers d'incinération d'ordures ménagères au laboratoire : comparaison de bioessais monospécifiques et d'un essai en microcosme, *Déchets, Sciences et Techniques* 33 : 25-33.
- Tripathi P.K., Singh A. (2004). Carbaryl induced alterations in the reproduction and metabolism of freshwater snail *Lymnaea acuminata*; *Pesticide Biochem. Physiol.* 79 : 1-9.
- USEPA (1999). 1999 Update of Ambient Water Quality Criteria for Ammonia, 147 pages.
- Valette-Silver N., Hammed M.J., Efurud D.W., Robertson A. (1999). Status of the contamination in sediments and biota from the western Beaufort Sea (Alaska), *Mar. Poll. Bull.* 38: 702-722.
- Van den Brink P.J., Hartgers E.M., Fettweis U., Crum S.J.H., Van Donk E., Brock T.C.M. (1997). Sensitivity of Macrophyte-Dominated Freshwater Microcosms to Chronic Levels of the Herbicide Linuron. I. Primary Producers, *Ecotoxicol. Environ. Safety* 38 : 13-24.
- Van den Brink P.J., Hartgers E.M., Gylstra R., Bransen F., Brock T.C.M. (2002). Effects of a mixture of two insecticides in freshwater microcosms : II. Responses of plankton and ecological risk assessment, *Ecotoxicology* 11 : 181-197.
- Van den Brink P.J., Hattink J., Bransen F., Van Donk E., Brock T.C.M. (2000). Impact of the fungicide carbendazim in freshwater microcosms - II : Zooplankton, primary producers and final conclusions, *Aquat. Toxicol.* 48 : 251-264.
- Van den Brink P.J., Van Donk E., Gylstra R., Crum S.J.H., Brock T.C.M. (1995). Effects of chronic low concentrations of the pesticides Chlorpyrifos and Atrazine in indoor freshwater microcosms, *Chemosphere* 31 : 3181-3200.
- Van Donk E., Prins H., Voogd H.M., Crum S.J.H., Brock T.C.M. (1995). Effects of nutrient loading and insecticide application on the ecology of *Elodea*-dominated freshwater microcosms. I. Responses of plankton and zooplanktivorous insects, *Arch. Hydrobiol.* 133 : 417-439.
- Verrhiest G. (2001). Toxicité de sédiments d'eau douce contaminés par des HAPs. Influence de la nature des sédiments sur la biodisponibilité des HAPs, Thèse de Doctorat de l'Université de Savoie (spécialité : Biologie et Biochimie Appliquées).
- Verrhiest G., Clément B., Blake G. (2001). Single and combined effects of sediment-associated PAHs on three species of freshwater macroinvertebrates, *Ecotoxicology* 10 : 363-372.
- Verrhiest G., Clément B., Merlin G. (2000). Influence of sediment organic matter and fluoranthene-spiked sediments on some bacterial parameters in laboratory freshwater / formulated sediment microcosms, *Aquat. Ecosystem Health Manag.* 3 : 359-368.
- Verrhiest G., Clément B., Volat B., Montuelle B., Perrodin Y. (2002a). Interactions between a polycyclic aromatic hydrocarbons mixture and the microbial communities in a natural freshwater sediment. *Chemosphere* 46 : 187-196.
- Verrhiest G., Cortes S., Clément B., Montuelle B. (2002b). Chemical and bacterial changes during laboratory conditioning of formulated and natural sediments, *Chemosphere* 46 : 961-974.
- Versteeg D.J., Stalmans M., Dyer S.D., Janssen C. (1997). *Ceriodaphnia dubia* and *Daphnia* : a comparison of their sensitivity to xenobiotics and utility as a test species, *Chemosphere* 34 : 869-892.

- Villaroel M.J., Ferrando M.D., Sancho E., Andreu E. (1999). *Daphnia magna* feeding behavior after exposure to tetradifon and recovery from intoxication, *Ecotoxicol. Environ. Safety* 44 : 40-46.
- Villaroel M.J., Ferrando M.D., Andreu E. (1998). Toxic anorexia as a sensitive endpoint in *Daphnia magna*, *J. Environ. Sci. Health B33* : 151-160.
- Vindimian, E., M. Bisson, R. Dujardin, P. Flammarion, J. Garric, M. Babut, M.-H. Lamy, J.-M. Porcher and E. Thybaud (2000). Complément au SEQ-Eau : méthode de détermination des seuils de qualité pour les substances génotoxiques. Rapport final", 2000, 151 p, INERIS, Agence de l'eau Rhin-Meuse - Verneuil-en-Halatte - avril 2000.
- Volatier L. (2004). Réponses d'une communauté périphtyque à un effluent complexe : *études en bio-essais et en canaux artificiels*, rapport de thèse de l'INSA de Lyon, École doctorale de Chimie de Lyon, spécialité : Sciences et Techniques du Déchet, 314 pages.
- Wang F., Richard R. G., Chapman P.M. (2004). Testing sediment biological effects with the freshwater amphipod *Hyaella azteca* : the gap between laboratory and nature, *Chemosphere* 57 : 1713-1724
- Wang N., Besser J.M., Buckler D.R., Honegger J.L., Ingersoll C.G., Johnson B.T., Kurtzweil M.L., MacGregor J., McKee M.J. (2005). Influence of sediment on the fate and toxicity of a polyethoxylated tallowamine surfactant system (MON 0818) in aquatic microcosms, *Chemosphere* 59 : 545-551.
- Warshawsky D., Cody T., Radike M., Reilman R, Schumann B., LaDow K., Schneider J. (1995). Biotransformation of benzo[a]pyrene and other polycyclic aromatic hydrocarbons and heterocyclic analogs by several green algae and other algal species under gold and white light, *Chemico-Biol. Interact.* 97 : 131-148.
- Watzin, M.C., Roscigno, P.F., Burke, W.D. (1994). Community level field method for testing the toxicity of contaminated sediment in estuaries. *Environ. Toxicol. Chem.* 13: 1187-1193.
- Wendt-Rasch L., Pirzadeh P., Woin P. (2003). Effects of metsulfuron methyl and cypermethrin exposure on freshwater model ecosystems, *Aquat. Toxicol.*, 63 : 243-256.
- Wernersson A.S., Dave G.R., Nilsson E. (1999). Combining sediment quality criteria and sediment bioassays with photoactivation for assessing sediment quality along the Swedish West Coast, *Aquat. Ecosystem Health Manag.* 2 : 379-389.
- Wernersson A-S., Dave G.R. (1997). Phototoxicity identification by solid phase extraction and photoinduced toxicity to *Daphnia magna*, *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 32 : 268-273.
- Whitman R.L., Nevers M.B., Goodrich M.L., Murphy P.C., Davis B.M. (2004). Characterization of Lake Michigan coastal lakes using zooplankton assemblages, *Ecological Indicators* 4 : 277-286.
- Wilbrink M., De Vries J., Vermeulen N. P. E., Janse C., De Vlieger T.A. (1987). Effects of dihalogenated biphenyls on various functional parameters in the pond snail *Lymnaea stagnalis* *Comparative Biochem. Physiol. Part A: Physiology* 87 : 1025-1031.
- Wilbrink M., Zul R., Roubos E.W., ter Maat A., de Vlieger T.A., Vermeulen N. P. E. (1992). Effects of 2,2'-dichlorobiphenyl on egg laying in the pond snail *Lymnaea stagnalis*, *Comparative Biochem. Physiol. Part C: Comparative Pharmacology* 102 : 3-9.
- Wilcoxon S.E., Meier P.G., Landrum P.F. (2003). The toxicity of fluoranthene to *Hyaella azteca* in sediment and water-only exposures under varying light spectra, *Ecotoxicol. Environ. Safety* 54 : 105 -117.
- Witt G. (1995). Polycyclic aromatic hydrocarbons in water and sediment of Baltic Sea, *Mar. Poll. Bull.* 31: 237-248.

Yosowidagdo R. (1996). Évaluation écotoxicologique en microcosmes aquatiques de laboratoire : mise au point méthodologique. Thèse de l'Université de Savoie, Chambéry.

Zaid S. (2001). Eutrophisation et toxicité : effets de certaines substances toxiques (cuivre et lindane) sur l'activité de broutage de *Daphnia magna*, Mémoire de DEA Toxicologie de l'Environnement, Université de Metz, 54 pages.

Annexes

**ANNEXE 1 : SYNTHÈSE BIBLIOGRAPHIQUE DES TRAVAUX MENÉS
SUR DES MICROCOSMES AQUATIQUES**

Tableau A1. Synthèse bibliographique des travaux réalisés en microcosmes de laboratoire de type « naturel »

Référence	Principe	Toxiques testés	Variables d'effets suivies
Brockway <i>et al.</i> (1979, 1984)	aquariums en verre de 7-8 L d'une eau et 0,5 cm sédiment issus d'une mare + inoculation hebdomadaire de plancton micro-algues, protozoaires, gastrotriches, rotifères, cladocères, copépodes, ostracodes, etc. ; température: 22°C; éclairage: 6500 lux 12 h/jour; apport en continu de milieu nutritif ; 39 semaines de colonisation et 10 semaines de test	Atrazine, méthoxychlore	pH, conductivité, oxygène dissous (P, R, P/R), teneurs en NH ₄ , NO ₂ , NO ₃ , PO ₄ , COD, phyto et zooplancton
Giddings et Eddlemon (1979)	Mirocosmes de 80 L contenant un sédiment (3-5 cm) et une eau prélevés dans mare naturelle ou lac. Inoculation en organismes prélevés <i>in situ</i> (algues filamenteuses, macrophytes, microinvertébrés, mollusques gastéropodes, larves d'insectes, petits poissons)	Arsénate de sodium	Teneur en toxique, solides dissous, alcalinité, Na, Ca, Mg, Cl, SO ₄ , K, NH ₄ , NO ₃ , PO ₄ , P total, production primaire P, respiration R, ratio P:R, suivi des populations
Holm <i>et al.</i> (1983)	Compartiments d'un canal communiquant entre eux et subissant différents traitements (irradiation UV, hydrolyse, addition de nutriments, présence ou non de sédiment, ...); communautés de microorganismes ; eau renouvelée en continu	Méthyl-parathion	dégradation du méthyl-parathion, identification quantitative des algues, teneur en ATP microbien, teneur en chlorophylle a, biomasse bactérienne
Leffler (1984), Shannon <i>et al.</i> (1986), Stay et Jarvinen (1995), Stay <i>et al.</i> (1988, 1989)	« Mixed Flask Cultures » : systèmes d'1 L inoculés à partir d'aquariums de labo ; algues, zooplancton, bactéries, protozoaires; pas de sédiment sauf exception ; 6 semaines de colonisation; contamination et test sur 42 jours	esfenvalérate, méthylazimphos, cuivre, fluorène, atrazine	oxygène dissous (P, R, P/R), pH, Eh, activité hétérotrophe, éventuellement: abondance phyto- et zooplancton
Cragg et Fry (1984), Barry <i>et al.</i> (1984)	Microcosmes de 3.5 L contenant des bactéries, des macrophytes (<i>Elodea canadensis</i>), 500 mL de sédiment issu d'un réservoir et 3 L d'eau ; exposition 30 jours	Diquat et Terbutryne	dénombrements bactériens de la colonne d'eau et du sédiment, oxygène dissous, CO ₂ total et CO ₂ libre, alcalinité, taux de décomposition des macrophytes
Crossland et Bennett (1984)	Systèmes de 24 L remplis d'un sédiment naturel, d'eau de robinet déchlorée, de cladocères, éphéméroptères, chironomes	Méthyl-parathion	
Cairns <i>et al.</i> (1985), Pratt <i>et al.</i> (1987)	Substrats colonisés en rivière par protozoaires, algues, bactéries, micromycètes, rotifères, annélides, et parfois larves d'insectes et micro-crustacés, immergés au labo dans chambres remplies de 7.5 L d'eau déchlorée ; exposition 21 jours	Cuivre	densités de protozoaires et identification des taxons, teneurs en chlorophylle a, ATP, K, PO ₄ , richesse spécifique, composition protozoaires, algues, métazoaires, consommation des nutriments

Tableau A1 (suite). Synthèse bibliographique des travaux réalisés en microcosmes de laboratoire de type « naturel »

Référence	Principe	Toxiques testés	Variables d'effets suivies
Cairns <i>et al.</i> (1990)	Récipients de 15 L contenant une eau déchlorée, du périphyton issu d'un étang apporté <i>via</i> un support artificiel ; pas de sédiment ; durée essai : 1 à 3 semaines	Chlore, ammoniac, chloramine	Production, respiration
Scanferlato et Cairns (1990)	Microcosmes contenant eau et sédiments naturels, exposés 8 semaines	Cuivre	Chlorophylle <i>a</i> , production, respiration, rapport respiration/biomasse, ATP
Merlin <i>et al.</i> (1992)	Bassins de 9 m ² contenant 2 m ³ d'eau (prof : 48 cm) et 1.5 m ³ sédiment sablo-limoneux (prof : 35 cm), des plantes (<i>Typha latifolia</i> , <i>Groenlandia densa</i> , <i>L. minor</i> , <i>Lemna trisulca</i>), des physes et des poissons (<i>Coregonus lavaretus</i>)	Dichlorométhane (DCM)	pH, oxygène dissous, conductivité, PO ₄ , chlorophylle <i>a</i> , teneur en DCM, activité photosynthétique des macrophytes, algues, diversité du périphyton (Shannon, Margalef), survie des physes et des poissons
Traub-Eberhard <i>et al.</i> (1994)	bassins verre de 1 m ² , profonds de 1 m, avec couche de sédiment de 15 cm + colonne de sédiment de 60 cm sous bassins pour récupérer l'eau qui percole ; eau et sédiment proviennent d'un étang, bassins placés dans une serre, algues, zooplancton, rotifères, organismes benthiques ; phase de stabilisation de 2-3 mois	pesticides	oxygène dissous, pH, température, NH ₄ , Eh sédiment, zoo- et phytoplancton, diversité (Shannon-Wiener)
Van Donk <i>et al.</i> (1995), Van den Brink <i>et al.</i> (1995)	Microcosmes de 605 L représentant des fossés de drainage dominés par macrophytes (Elodées); eau naturelle, sable naturel ; phytoplancton, zooplancton apportés avec le sédiment, macroinvertébrés introduits volontairement	Chlorpyrifos	teneurs en NH ₄ , NO ₃ , NO ₂ et PO ₄ , chlorophylle, chlorpyrifos, suivi des populations phyto- et zooplanctoniques
Peres <i>et al.</i> (1996)	Microcosmes contenant eau (origine ?), sédiment naturel, macrophytes (<i>Elodea densa</i>), mollusques bivalves (<i>Corbicula fluminea</i>), périphyton, exposés au moins 71 jours	Isoproturon	Densité et structure des communautés périphytiques
Fliedner et Klein (1996)	Microcosmes de 300 L remplis de sédiment de mare et eau naturelle, phyto- et zooplancton, gastéropodes ; durée essai : 3 mois	Lindane	pH, O ₂ , conductivité, teneurs de l'eau en lindane, NO ₃ , NH ₄ , PO ₄ , abondance phyto- et zooplancton, pigments photosynthétiques du phytoplancton et du périphyton

Tableau A1 (suite). Synthèse bibliographique des travaux réalisés en microcosmes de laboratoire de type « naturel » (suite)

Référence	Principe	Toxiques testés	Variables d'effets suivies
Van den Brink <i>et al.</i> (1997), Cuppen <i>et al.</i> (2000), Van den Brink <i>et al.</i> (2000)	Aquariums remplis de 600 L d'eau et de 10 cm de sédiment lacustre, représentant des fossés de drainage ; phytoplancton, zooplancton apportés avec le sédiment, macroinvertébrés introduits volontairement ; période d'acclimatation de 3 mois; suivi des systèmes sur 11 semaines après introduction du toxique	Linuron, carbendazim	teneurs en linuron de l'eau, suivi des communautés phytoplanctoniques, de la teneur en chlorophylle a, du périphyton, de la biomasse finale d'Elodées
Barry et Logan (1998)	Aquariums de 4 L remplis de 130 g d'un sédiment naturel issu d'une mare temporaire et de 3 L d'eau distillée ; protozoaires, zooplancton et macrophytes apportés avec le sédiment apparaissent au cours des 2 premières semaines	Endosulfan (1-10-50 µg/L)	teneur en endosulfan (eau, sédiment, macrophytes), pH, conductivité, oxygène dissous, ammoniacque, nitrites et orthophosphates, chlorophylle, zooplancton, phytoplancton, macrophytes et algues filamenteuses, faune benthique
Rico-Martinez <i>et al.</i> (1998)	Aquariums de 30 L contenant eau et organismes (rotifères, copépodes, cladocères, protozoaires) prélevés dans un réservoir	Cuivre	Dureté, nitrates, du pH, phosphore réactif, P total, solides totaux, teneur en chlorophylle, densité populations, diversité Shannon-Weaver
Jak <i>et al.</i> (1998)	Réservoirs de 5 m ³ contenant un sédiment et une eau naturels, incluant du phyto- et zooplancton autochtone, des macroinvertébrés (<i>Dreissena</i> , <i>Asellus</i> , <i>Gammarus</i> , <i>Chironomus</i>), des macrophytes (<i>Elodea</i> , <i>Potamogeton</i>) ; période de pré-contamination de 28 jours et de post-contamination de 28 jours.	Diméthoate	Biomasse, développement de population, survie, reproduction, émergence
Ellis <i>et al.</i> (2001)	Petits microcosmes de 120 mL d'eau de mare et de 5 g de sédiment naturel exposés 2 mois ; pas d'organismes supérieurs	Acides trichlo-, dichloro- et monochloroacétique, acide trifluoroacétique	Teneurs en toxiques et produits de dégradation
Kratasyuk <i>et al.</i> (2001)	Microécosystèmes de 12 L reconstitués à partir d'une eau d'épilimnion d'un plan d'eau, contaminés à J35 en benzoquinone et suivis pendant 1 semaine	Benzoquinone	Tests de bioluminescence sur eau du système
Seguin <i>et al.</i> (2001)	Récipients de 500 mL remplis d'une eau de lac filtrée et enrichie ; pas de sédiment ; inoculation en algues et zooplancton issus d'un étang	Atrazine, nicosulfuron	Dénombrement populations, capacité photosynthétique
Jontofsohn <i>et al.</i> (2002)	Microcosmes contenant 230 L d'eau de lac et 10 cm de sédiment lacustre implantés dans une mare artificielle extérieure ; suivi des populations bactériennes	Nonylphénol	Potentiel rédox et teneur en nonylphénol du sédiment, analyses microbiologiques (dénombrement bactérien, diversité bactérienne par hybridation in situ)

Tableau A1 (suite et fin). Synthèse bibliographique des travaux réalisés en microcosmes de laboratoire de type « naturel »

Référence	Principe	Toxiques testés	Variables d'effets suivies
Van den Brink <i>et al.</i> (2002), Cuppen <i>et al.</i> (2002)	Aquariums remplis de 600 L d'eau de nappe et de 10 cm de sédiment lacustre, représentant des fossés de drainage ; phytoplancton, zooplancton apportés avec le sédiment, macroinvertébrés introduits volontairement, substrats artificiels pour périphyton, invertébrés et décomposition de litière végétale, invertébrés encagés (<i>D. magna</i> , <i>Gammarus pulex</i> , <i>Asellus aquaticus</i> , ...); période d'acclimatation de 3 mois; suivi des systèmes sur 11 semaines après introduction du toxique	Mélange de chlorpyrifos et de lindane	pH, O ₂ , alcalinité, conductivité, teneurs en toxiques (eau), N et P, décomposition de matière organique particulaire (feuilles de peuplier), suivi des invertébrés libres et encagés (mortalité 7 jours), suivi du zooplancton (copépodes, cladocères, ostracodes, rotifères), survie 4 jours <i>D. magna</i> encagée, suivi du phytoplancton et du périphyton, teneur en Chlorophylle <i>a</i> , suivi de la croissance 7 jours de <i>Scenedesmus acutus</i> immobilisée sur des billes d'alginate
Sanderson <i>et al.</i> (2002, 2003)	Aquariums de 30 L remplis de sédiment, eau, animaux (Cladocères, Ostracodes, Rotifères, Gastéropodes, Ephéméroptères, Aselles), macrophytes (Elodées, Myriophylles), phytoplancton prélevés en milieu naturel ; durée d'exposition : 35 jours	Acide perfluorooctanoïque	Abondance et richesse zooplancton
Barry et Davies (2004)	Aquariums de 16 L remplis de 400 g d'un sédiment naturel issu d'une mare temporaire et de 10 L d'eau de réseau stérilisée et enrichie en N et P ; introduction d'un prédateur (notonecte <i>Anisops spp.</i> , 6 ind./microcosme) ; zooplanctons et macrophytes apportés avec le sédiment apparaissent au cours des 2 premières semaines: exposition 9 semaines	Endosulfan	teneur en endosulfan (eau, sédiment, macrophytes), pH, conductivité, oxygène dissous,
Cedergreen <i>et al.</i> (2004)	Aquariums de 25 L contenant un milieu synthétique, pas de sédiment, et 12 espèces de macrophytes immergées ou flottantes exposées 14 jours	Méthyl-metsulfuron	Biomasse, taux de croissance relatif et surface spécifique des feuilles
Brandt <i>et al.</i> (2004)	Microcosmes de 200 mL constitués de communautés microbiennes issues de 20 mL d'une eau lacustre et d'une eau usée, exposés 43 jours	LAS	teneurs en LAS, analyse des communautés par DGGE, incorporation de leucine, tolérance induite au toxique (méthode PICT), test de bioluminescence de <i>Nitrosomonas europaea</i> , dénombrement bactérien
Hense <i>et al.</i> (2005)	Microcosmes contenant 230 L d'eau de lac et 10 cm de sédiment lacustre implantés dans une mare artificielle extérieure ; suivi du phyto- et du zooplancton exposés 6 semaines au toxique	Nonylphénol	Suivi pH, conductivité, teneur O ₂ , PO ₄ , NO ₃ , NH ₄ , nonylphénol
Clément <i>et al.</i> (2005a)	Aquariums contenant 100 L de milieu synthétique et 12 kg de sédiment lacustre, inoculé en cladocères (<i>Daphnia</i> , <i>Ceriodaphnia</i> , <i>Simocephalus</i>), algues (<i>P. subcapitata</i>), amphipodes (<i>H. azteca</i>), chironomes (<i>C. riparius</i>), gastéropodes (<i>Limnaea</i> , <i>Physa</i>), lentilles d'eau (<i>L. minor</i> , <i>S. polyrhiza</i>), macrophytes enracinées (<i>Elodea</i> , <i>Groenlandia</i>)	Percolats de mâchefers d'incinération d'ordures ménagères	pH, O ₂ , conductivité, COD, anions et cations, métaux, chlorophylle <i>a</i> , densités cladocères, gastéropodes, émergences chironomes, développement amphipodes, croissance plantes et lentilles

Tableau A2. Synthèse bibliographique des travaux réalisés en microcosmes de laboratoire de type « gnotobiotique » ou « pseudo-gnotobiotique »

Référence	Principe	Toxiques testés	Variables d'effets suivies
Taub (1969, 1989a, 1989b, 1997), Conquest et Taub (1989), Taub <i>et al.</i> (1981, 1986, 1991), Swartzman et Rose (1983), Larsen <i>et al.</i> (1986), Swartzman <i>et al.</i> (1989), Stay <i>et al.</i> (1989), ASTM (1993), Rai et Mallick (1993), Landis <i>et al.</i> (1993)	Standardized Aquatic Microcosms : récipients cylindriques de 3.5 L, sédiment artificiel (sable + chitine + cellulose), milieu synthétique, non renouvelé, organismes issus d'élevage (10 algues, 1 daphnie, 1 amphipode, 1 ostracode, 1 protozoaire, 1 rotifère), addition des organismes de j0 à j4, addition du toxique à j7, test sur 56 jours après traitement	Cuivre, Nickel, Fer	O2 dissous (P, R, P/R) , pH, turbidité, nutriments (PO4, SiO4, NO3, NO2, NH3), teneur en toxique, densités algues, invertébrés, diversité des algues
Sugiura <i>et al.</i> (1976), Sugiura (1992, 1996, 2001)	Erlenmeyers remplis de 200 mL d'un milieu synthétique contenant un substrat organique (polypeptone) et inoculés en diverses espèces d'algues, de protozoaires, rotifères, oligochètes, bactéries	Cuivre, Aluminium, DDT, β - et γ -hexachlorocyclohexane	teneur en O2 en continu, taux de respiration et de production primaire, teneurs en toxiques
Merlin et Blake (1991)	enceintes de 2 L recevant un sédiment lacustre et un milieu synthétique ; macrophytes flottantes (laitue d'eau) ou enracinées (scirpe, ...), algues filamenteuses, suivi sur 1 mois	Pentachlorophénol (PCP)	activités photosynthétique et respiratoire par mesure des échanges d'oxygène sur fragments foliaires ou végétaux entiers
Kersting et Van Wijngaarden (1992)	Microcosme constitué de 3 enceintes de 1 à 6 L contenant séparément microalgues (<i>Chlorella</i>), daphnies (<i>D. magna</i>), sédiment avec bactéries et communiquant entre elles pour assurer une chaîne trophique contrôlée avec recyclage des M.O. Essais sur 445 jours	Chlorpyrifos	Biomasse algale, pH, O2, nombre de daphnies, teneur en chlorpyrifos de l'eau des différents compartiments
Merlin <i>et al.</i> (1992, 1993), Thiébaud <i>et al.</i> (1994)	Microcosmes contenant 500 g de sable, 3.5 L de milieu synthétique, des bryophytes immergés (<i>Fontinalis antipyretica</i>) des macrophytes (<i>L. minor</i> , <i>G. densa</i> , <i>E. canadensis</i>), des mollusques (<i>Physa fontinalis</i>), des micro-crustacés (<i>D. magna</i>) et une algue verte (<i>S. subspicatus</i>).	Dichlorométhane, effluents de lessive	pH, O2, conductivité, teneurs en DCM (eau, sédiment, biota), croissance d' <i>Elodea canadensis</i> , production et consommation d'O2 par fragments foliaires, survie des Physes
Tanaka <i>et al.</i> (1994)	Erlenmeyers de 300 mL remplis de 200 mL de milieu synthétique (Taub) enrichi en substrat organique, protozoaires, rotifères, oligochètes, microalgues (7 espèces), bactéries (4 espèces) ; durée essai : 21 jours	Aucun (essai témoin sur différentes combinaisons d'espèces)	Dénombrement des populations
Dobbs <i>et al.</i> (1996)	Microcosme à 3 compartiments contenant séparément des microalgues (<i>Chlorella vulgaris</i>), des rotifères (<i>Brachionus calyciflorus</i>), des poissons (<i>Pimephales promelas</i>) et reliés entre eux pour assurer une chaîne trophique ; exposition 25 j	Selenium	Croissance algale, biomasse rotifères, survie et croissance poissons, teneurs en Se dans les organismes et dans l'eau

Tableau A2 (suite et fin). Synthèse bibliographique des travaux réalisés en microcosmes de laboratoire de type « gnotobiotique » ou « pseudo-gnotobiotique » (suite et fin)

Références	Principe	Toxiques testées	Variabiles d'effets suivies
Feurtet-Mazel <i>et al.</i> (1996)	Aquarium en verre contenant 3 L d'eau du réseau déchlorée, 5 cm de sédiment de rivière argilo-limoneux amendé en sable (50%) et placé en récipient plastique, boutures de macrophytes enracinées (<i>Elodea densa</i> , <i>Ludwigia natans</i>), mollusques benthiques (<i>Corbicula fluminea</i>) introduits 7 jours après eau et sédiment ; essai sur 3 semaines	Isoproturon (IPU)	Poids sec des plantes en fin d'essai, longueur de tige et des pousses d'Elodée, teneur en IPU des plantes et des mollusques, pH eau, production d'O ₂ , teneur en IPU de l'eau
Boudou <i>et al.</i> (1998)	Microcosmes contenant 3 L d'eau du réseau déchlorée, 1 kg de sédiment de rivière, des nymphes d' <i>Hexagenia rigida</i> , des mollusques <i>Corbicula fluminea</i> ,	Cadmium, mercure, méthyl-mercure	bioaccumulation au niveau de l'organisme entier et de différents organes
Scholten <i>et al.</i> (1994), Jak <i>et al.</i> (1998)	Essai sur 7 jours dans des conteneurs de 80 L contenant un milieu synthétique hypereutrophe, des algues de culture (<i>Chlorella</i> , <i>Scenedesmus</i> , ...), avec ou sans cladocères (<i>Daphnia</i> , <i>Ceriodaphnia</i> , <i>Simocephalus</i>)	Diméthoate, métaux, fluoranthène	Teneur en chlorophylle, densités de cladocères
Clément et Zaid (2004)	Essai sur 7 jours dans des bécchers de 2 L contenant un milieu synthétique eutrophe, une espèce algale (<i>P. subcapitata</i>) et une espèce de cladocère (<i>Daphnia magna</i> ou <i>Simocephalus vetulus</i>)	Cuivre, lindane	Densité algale, survie et croissance des daphnies
Clément et Cadier (1998), Verriest <i>et al.</i> (2000, 2001, 2002), Clément <i>et al.</i> (2004), Triffault-Bouchet <i>et al.</i> (2005a, 2005b), Clément <i>et al.</i> (2005b)	Bécchers de 2 L comportant un sédiment artificiel ou naturel, une colonne de milieu synthétique et recevant des organismes issus de cultures et élevages du laboratoire (algues, lentilles d'eau, daphnies, amphipodes, chironomes, limnées) ; test sur 28 jours	Cu, HAP, percolats de MIOM, sédiments contaminés	O ₂ , pH, conductivité, nutriments, COD, pH sédiment, survie et croissance des organismes, émergence des chironomes, reproduction des daphnies, croissance algues (Chl a) et lentilles, densités et activités bactériennes (certains travaux)
Sanchez et Tarazona (2002)	Aquariums contenant 5 L d'eau de source, 3 cm de sable, des daphnies (<i>D. magna</i>), des chironomes (<i>C. prasinus</i>) et des limnées (<i>L. peregra</i>); durée de l'essai : 46 jours	Aucun (essai témoin)	reproduction daphnies et biomasse finale, émergences des chironomes et pontes, éclosion et survie des limnées
Sanchez <i>et al.</i> (2004)	Microcosmes de 2 L contenant un sédiment artificiel (300 g) et 1.2 L d'eau de source, un milieu synthétique, des daphnies (<i>D. magna</i>) et des chironomes (<i>C. prasinus</i>) ; daphnies libres ou encagées, exposées 2 ou 16 jours ; chironomes exposés 16 jours	Pentachlorophénol (PCP)	O ₂ , pH, teneurs en PCP (eau, sédiment), survie et reproduction daphnies, émergence et ponte chironomes

ANNEXE 2 : COMPOSITION DE DIFFERENTES EAUX UTILISEES
DANS LES ESSAIS EN MICROCOSMES

Tableau A2-1. Milieu OCDE modifié utilisé dans les essais en microcosmes 2 L

	Composants	Solutions mères	Préparation du milieu
OCDE I	NH ₄ NO ₃	1.1209 g/L	1.67 mL/L
	KH ₂ PO ₄	0.1268 g/L	
OCDE II	MgSO ₄ .7H ₂ O	3 g/L	5 mL/L
	MgCl ₂ .6H ₂ O	4.8 g/L	
	CaCl ₂ .2H ₂ O	3.6 g/L	
OCDE III	NaHCO ₃	25.05 g/L	5 mL/L
OCDE IV	FeEDTA	0.1094 g/L	1 mL/L
OCDE V	H ₃ BO ₃	0.185 g/L	1 mL/L
	MnCl ₂ .4H ₂ O	0.415 g/L	
	Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0.007 g/L	
	CoCl ₂ .6H ₂ O	0.0015 g/L	
	CuSO ₄ .5H ₂ O	1.5E-5 g/L	
	ZnSO ₄ .7H ₂ O	0.0063 g/L	
Vitamines	Thiamine	0.075 g/L	1 mL/L
	B12	0.001 g/L	
	Biotine	0.00075 g/L	
	H ₂ O		qsp 1 L

Tableau A2-2. Différents milieux d'essai (principaux éléments, teneurs nominales) et eaux naturelles (* après enrichissement en P)

		Milieu Afnor test daphnies	Milieu ISO test daphnie ISO, 1989	Milieu M4 élevages	Milieu OCDE essais microcosmes		Milieu Algues AFNOR	Milieu T82MV ASTM (1993)	Milieu <i>Lemna</i> AFNOR	Eau Lac Aiguebelette 24/06/2004	Eau Lac Léman	Eau de nappe Essai 100 L janv 2004	Eau de nappe 2000 à 2003	Eau réseau Essai pilote 2005
					2 L	100 L juil 2004								
pH	unités pH	8.0	8.2	8.2	7.33	8.4	7	7	5.1	nd	8.11	8.14	nd	7.68
Conductivité	µS/cm	nd	600	610	103	560	nd	nd	1930	nd	313	370	nd	413
Cl ⁻	mg/L	201.3	144.4	144.9	17.06	90.46	0.13	88.63	0	5.61	9.5	14	15.8 ± 1.8	11.6
NO ₃ ⁻	mg/L	0	0	0.020	1.448	8.7	71.84	31	619.89	1.76	2.6	12	11.9 ± 3.4	11.51*
NH ₄ ⁺	mg/L	0	0	0.000	0.42	2.52	0	0	0.05	nd	nd	0	0	3.34*
PO ₄ ³⁻	mg/L	0	0	0.020	0.147	0.886	21.94	3.77	47.47	nd	nd	0.3*	0	0.6*
SO ₄ ²⁻	mg/L	14.3	48.1	48.5	5.85	9.39	11.83	1.0	192.97	5.66	46.5	29	31.5 ± 2.7	29.8
HCO ₃ ⁻	mg/L	145.2	47.1	47.1	90.96	90.96	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd	198.2
Na ⁺	mg/L	54.8	17.7	18.25	34.29	34.29	0.00	73.6	0	3.20	7.7	10	10 ± 1.1	6.7
K ⁺	mg/L	11.7	3	3.2	0.060	3	56.72	1.55	214.98	0.96	1.5	2.3	1.86 ± 0.3	1.6
Mg ²⁺	mg/L	20	12.2	12.2	4.35	7	2.96	2.43	48.67	3.79	6.0	7	6.8 ± 0.5	6.2
Ca ²⁺	mg/L	80.9	80.1	80.1	4.90	49	6.79	40.0	200.32	40	44.5	57	91 ± 29.3	68.2
Ca/Mg	/	4.1	6.6	6.6	1.1	7	2.29	16.5	4.12	10.55	7.42	8.14	13.2 ± 3.4	11
Si	mg/L	0	0	0.1	0	0	0	22.4	0	nd	1	5	nd	2.31
Dureté	mg CaCO ₃ /L	285	250	250	31	152	nd	110	985	116	137	171.9	255 ± 75	201
Alcalinité	mg CaCO ₃ /L	119	80	90	82	100	nd	nd	2.5	nd	nd	nd	nd	162

Tableau A2-3. Différents milieux d'essai, de culture ou d'élevage (oligo-éléments, teneurs nominales ; * le fer EDTA est remplacé par du citrate de fer)

		Milieu Afnor test daphnies	Milieu ISO test daphnie ISO/DIS 6341.2	Milieu M4 élevages	Milieu OCDE essai microcosme (modifié)	Milieu Algues AFNOR	Milieu T82MV ASTM (1993)	Milieu <i>Lemna</i> AFNOR
Fe	µg/L	0	0	226	17.6	135.58	62.5	555.53
EDTA	µg/L	0	0	2160	91.83	0*	414.6	2904.47
B	µg/L	0	0	500	32.35	5.25	8	500.19
Zn	µg/L	0	0	6.24	1.43	6.82	1.5	50.04
Mn	µg/L	0	0	100	115.25	6.57	13.5	307.43
Cu	µg/L	0	0	6.15	0.0038	3.82	0.32	20.11
Mo	µg/L	0	0	25	2.78	16.31	2.4	69.59
Co	µg/L	0	0	2.48	0.37	7.43	0.15	9.99
Al	µg/L	0	0	0	0	0	260	0
Se	µg/L	0	0	1	0	0	0	0
Cr	µg/L	0	0	0	0	0	0	10.00
V	µg/L	0	0	0.25	0	0	0	100.02
Ni	µg/L	0	0	0	0	0	0	10.01
W	µg/L	0	0	0	0	0	0	10.00
Ti	µg/L	0	0	0	0	0	0	12.71
Li	µg/L	0	0	50.1	0	0	0	0
Rb	µg/L	0	0	50.18	0	0	0	0
Sr	µg/L	0	0	50	0	0	0	0
Br	µg/L	0	0	12.42	0	0	0	0
I	µg/L	0	0	2.48	0	0	0	0

ANNEXE 3 : RESULTATS DES ESSAIS EN MICROCOSMES
RELATIFS AUX ORGANISMES BENTHIQUES

Tableau A3. Synthèse d'une partie des résultats des essais en microcosmes relatifs aux organismes benthiques (moyennes ± écarts-types)

Référence	Clément et Cadier (1998)						Témoin Cu	Verrhiest (2001)				Avrain (2000)
	Essai témoin	différentes doses de Tétramin						A1	A2	N1	N2	Témoin
Sédiment				artificiel				Ain	Ain	Neyrieux	Neyrieux	Ain
Tétramin incorporé (mg/ind.)	0.00	4.52	9.04	13.57	16.96	21.48	10.83	11.14	11.14	11.14	11.14	11.14
Tétramin ajouté en cours (mg/ind.)				0						0		0
Renouvellement eau				non						non		non
Survie Chironomes (%)												
à 7 ou 8 jours							84					
à 10 jours	100	95	100	100	95	100				59 ± 20		
à 14, 15 ou 16 jours	70	100	100	100	95	100	80	69 ± 16	93 ± 5	47 ± 18	69 ± 17	75
à 21 jours										81 ± 20		
à 28 jours	0	95	100	100	95	90				65 ± 29		
Poids sec Chironomes (mg/larve)												
à 7 ou 8 jours							0.38					
à 10 jours	0.03	0.17	0.22	0.21	0.43	0.41						
à 14, 15 ou 16 jours	0.28	0.26	0.39	0.34	0.88	0.77	0.48		1.11 ± 0.20		0.42 ± 0.15	0.7
à 21 ou 23 jours												1.1
à 28 jours												1.2
Emergence Chironomes (%) J28	0	7.5	27.5	55	100	100	60					32 à 72
Survie Amphipodes (%)												
à 7 ou 8 jours							91			70 ± 17		
à 10 jours												
à 14, 15 ou 16 jours							82	97±5	93 ± 6	67 ± 6	97 ± 6	90 à 100
à 21 ou 23 jours										73 ± 6		
à 28 jours				88 en moyenne					97 ± 6	57 ± 6	80 ± 17	
Poids sec Amphipodes (mg/ind.)												
à 7 ou 8 jours										0.15 ± 0.09		0.3
à 10 jours												
à 14, 15 ou 16 jours							0,27		0.58 ± 0.03	0.27	0.49 ± 0.08	0.5
à 21 ou 23 jours				non déterminé						0.48 ± 0.08		0.8
à 28 jours									0.90 ± 0.16	0.85 ± 0.08	0.49 ± 0.29	1.05

Tableau A3 (suite). Synthèse d'une partie des résultats des essais en microcosmes relatifs aux organismes benthiques (moyennes ± écarts-types)

Référence	Clément <i>et al.</i> (2004)				Triffault-Bouchet (2004)	
	artificiel	1er essai sédiment B2, B13 ou B22	2ème essai sédiment B2, B13 ou B22		1er essai séd. artificiel	2ème essai
TétraMin incorporé (mg/ind.)		12.86	0	18	0	18
TétraMin ajouté en cours (mg/ind.)		0	0		0	
Renouvellement eau		non	non		oui	
Survie Chironomes (%)						
à 7 ou 8 jours		41 à 79			nd	
à 10 jours					nd	
à 14, 15 ou 16 jours		80 à 85			nd	
à 21 jours			sans amend.: 40 à 65 ; avec amend.: 65 à 75			
à 28 jours	84	50 à 90			nd	80 à 100%
Poids sec Chironomes (mg/larve)						
à 7 ou 8 jours	0.75	0.3 à 0.4			nd	nd
à 10 jours					nd	0.58 ± 0.23
à 14, 15, ou 16 jours		1 à 1.1			nd	0.4 à 1.2
à 21 ou 23 jours		0.85 à 1.1	sans amend.: 0.2 à 0.3 ; avec amendement: 0.85 à 0.9			0.2 à 1.4
à 28 jours					nd	1.9
Emergence Chironomes (%) J28	84	20 à 85	pas d'émergence à j21 sans amendement; pas d'effet du renouvellement			80
Survie Amphipodes (%)						
à 7 ou 8 jours		80 à 100			nd	nd
à 10 jours					nd	93 ± 12
à 14, 15, ou 16 jours		75 à 95			nd	50 à 90
à 21 ou 23 jours		80 à 90	sans amendement : 32 (B3) à 92% ; avec amendement : 88 (B13) à 93 % ; pas d'effet du renouvellement			60 à 100
à 28 jours	75	70 à 90			nd	70 à 90
Poids sec Amphipodes (mg/ind.)						
à 7 ou 8 jours		0.3			nd	nd
à 10 jours					nd	0.19 ± 0.05
à 14, 15, ou 16 jours		0.5			nd	0.12 à 0.32
à 21 ou 23 jours		0.9	sans amendement : 0.46 à 0.72 ; avec amendement : 0.67 à 1.01 ; pas d'effet du renouvellement			0.12 à 0.38
à 28 jours	0.7	0.9 à 1.1				0.38 à 0.49

Tableau A3 (suite). Synthèse d'une partie des résultats des essais en microcosmes relatifs aux organismes benthiques (moyennes ± écarts-types)

Référence	Clément (non publié)		Triffault-Bouchet (2004)		Clément (essai 6PPD)		Triffault-Bouchet (2004)			
	Essai témoin		Essai témoin sur renouvellement eau		Essai sur témoins uniquement		Essais témoin et sédiments contaminés			
Sédiment	Neyrieux		Aiguebelette (600 g)		séd. artificiel	rivière Bedat	Aiguebelette	12570	12730	12800
TétraMin incorporé (mg/ind.)	9.75		0		12.86	6.86		0		
TétraMin ajouté en cours (mg/ind.)	0		6		non	non		6		
Renouvellement eau	non		25%/sem	50%/sem.	50%/semaine			non		
Survie Chironomes (%)										
à 7 ou 8 jours					73 ± 10					
à 14, 15 ou 16 jours	94 ± 5.4				85 ± 9	36 ± 14				
à 21 jours	86 ± 6.2		49 ± 31	21 ± 6	87 ± 9	50 ± 9				
à 28 jours	83 ± 7.6		39 ± 12	53 ± 21		65 ± 10	84 ± 8	91 ± 12	91 ± 9	85 ± 11
Poids sec Chironomes (mg/larve)										
à 7 ou 8 jours					0.15 ± 0.03					
à 10 jours							0.81 ± 0.05	0.95 ± 0.09	0.67 ± 0.07	0.85 ± 0.10
à 14, 15, ou 16 jours	0.177 ± 0.02				0.99 ± 0.15	0.42 ± 0.04				
à 21 ou 23 jours	0.779 ± 0.02		0.28 ± 0.03	0.35 ± 0.07		0.68 ± 0.03				
à 28 jours	1.311 ± 0.14		0.52 ± 0.07	0.38 ± 0.11		0.72 ± 0.04				
Emergence Chironomes (%) J28	60 ± 14 (à J22)		0	0	89 ± 6	50 ± 8	79 ± 5	99 ± 9	89 ± 6	87 ± 14
Survie Amphipodes (%)										
à 7 ou 8 jours	89 ± 17				90 ± 0	83 ± 6				
à 10 jours			80 ± 17	80 ± 17			57 ± 23	47 ± 12	40 ± 10	
à 14, 15, ou 16 jours	100 ± 0				93 ± 12	87 ± 12				
à 21 ou 23 jours	94 ± 9		90 ± 10	87 ± 12		80 ± 14	90 ± 17	10 ± 10	10 ± 17	13 ± 6
à 28 jours	97 ± 7		97 ± 6	80 ± 10		83 ± 12	97 ± 6	13 ± 12	13 ± 12	23 ± 21
Poids sec Amphipodes (mg/ind.)										
à 7 ou 8 jours	0.54 ± 0.08				0.19 ± 0.04	0.07 ± 0.01				
à 10 jours			0.07 ± 0.01	0.07 ± 0.01			0.07 ± 0.02	0.08 ± 0.02	0.08 ± 0.01	
à 14, 15, ou 16 jours	0.63 ± 0.07				0.40 ± 0.08	0.19 ± 0.01				
à 21 ou 23 jours	0.75 ± 0.10		0.39 ± 0.04	0.38 ± 0.02		0.47 ± 0.07	0.39 ± 0.05	0.22 ± 0.08	0.25 ± 0.25	0.25 ± 0.11
à 28 jours	0.96 ± 0.13		0.56 ± 0.03	0.62 ± 0.03		0.87 ± 0.06	0.86 ± 0.05	0.79 ± 0.39	0.50 ± 0.25	0.60 ± 0.23

Tableau A3 (suite et fin). Synthèse d'une partie des résultats des essais en microcosmes relatifs aux organismes benthiques (moyennes ± écarts-types)

Référence	Cauzzi (thèse)			Cauzzi (thèse)			Triffault-Bouchet (2004)			Cauzzi (2002)					
	Essai sur sédiment 12570			Essai sur sédiment 13990			Essai P1-1	Essai P2	Essai P3	Essai pyrène 1		Essai pyrène 2			
Sédiment	séd. artificiel	12570	12570 traité	séd. artificiel	13990	13990 traité	Aiguebelette			Aiguebelette Craie	Aiguebelette Tourbe	Aiguebelette Craie	Aiguebelette Tourbe		
TétraMin incorporé (mg/ind.)	12.86	0		12.86	0		0					0			
TétraMin ajouté en cours (mg/ind.)	0	8.4		0	8.4		6					3			
Renouvellement eau	non						non			non					
Survie Cr (%)															
à 7 ou 8 jours							80 ± 4								
à 10 jours	87 ± 8	38 ± 15	67 ± 9	97 ± 3	75 ± 10	92 ± 6	86 ± 5			84 ± 4	76 ± 13	64 ± 4	75 ± 27	88 ± 11	
à 14, 15 ou 16 jours							91 ± 10								
à 21 jours	75 ± 10	31 ± 13	56 ± 12	74 ± 11	71 ± 24	72 ± 6	70 ± 15			88 ± 7	60 ± 11	76 ± 22	75 ± 5	71 ± 8	
à 28 jours							81 ± 10			73 ± 17	81 ± 12	69 ± 13	46 ± 16	67 ± 38	52 ± 14
Poids sec Cr (mg/larve)															
à 7 ou 8 jours							0.168 ± 0.03								
à 10 jours	1.05 ± 0.22	0.67 ± 0.10	0.72 ± 0.11	1.16 ± 0.22	1.08 ± 0.22	1.03 ± 0.32	0.43 ± 0.06			0.55 ± 0.01					
à 14, 15, ou 16 jours												0.54 ± 0.10	0.26 ± 0.02		
à 21 ou 23 jours	non mesurable	0.95 ± 0.26	non mesurable				0.79 ± 0.03			0.70					
Emergence Cr (%) J28	69 ± 9	44 ± 10	31 ± 6	62 ± 15	84 ± 11	83 ± 4	81 ± 10	70 ± 14	80 ± 14	69 ± 11	40 ± 22	67 ± 38	49 ± 10		
Survie Ha (%)															
à 7 ou 8 jours	78 ± 18	0	0	73 ± 22	63 ± 5	95 ± 10	77 ± 12								
à 10 jours							87 ± 6			90 ± 10	77 ± 12	60 ± 10	87 ± 6	87 ± 15	
à 14, 15, ou 16 jours															
à 21 ou 23 jours	60 ± 27	0	0	66 ± 17	62 ± 22	96 ± 5	87 ± 12	90 ± 10		73 ± 21	70 ± 17	90 ± 0	83 ± 6		
à 28 jours	85 ± 17	0	0	70 ± 20	68 ± 8	94 ± 9	77 ± 6	87 ± 15		73 ± 5	73 ± 10	93 ± 12	90 ± 10		
Poids sec Ha (mg/ind.)															
à 7 ou 8 jours	/		/				0.10 ± 0.03								
à 10 jours	0.04 ± 0.02			0.12 ± 0.02	0.07 ± 0.04	0.08 ± 0.01	0.11 ± 0.03			0.06 ± 0.01	0.07 ± 0.008	0.08 ± 0.006			
à 14, 15, ou 16 jours												0.11 ± 0.03	0.12 ± 0.01		
à 21 ou 23 jours	0.27 ± 0.08	/	/	0.43 ± 0.14	0.48 ± 0.17	0.45 ± 0.08	0.54 ± 0.09	0.29 ± 0.05		0.37 ± 0.03	0.45 ± 0.04	0.39 ± 0.07	0.43 ± 0.12		
à 28 jours	0.66 ± 0.15	/	/	0.79 ± 0.22	0.92 ± 0.19	0.77 ± 0.19	0.74 ± 0.12	0.43 ± 0.03		0.67 ± 0.13	0.88 ± 0.09	0.66 ± 0.14	0.79 ± 0.10		

**ANNEXE 4 : PERFORMANCES DES ORGANISMES AU COURS DES
ESSAIS EN MICROCOSMES 100 ET 180 L**

Tableau A4-1. Résumé des performances de développement des larves de *Chironomus riparius* obtenues en essais microcosmes 100 et 180 L (contam : contamination ou contaminé; séd : sédiment ; NC : non calculable)

Essai	Durée	Durée phase	Réplicats	Délai d'émergence	Taux d'émergence (%)
1er essai MIOM 100 L	91 jours	exposition	1	17 jours	49 (témoin) - 46 (contam)
		59 jours		NC	50
2ème essai MIOM 100 L	95 jours	pré-contam : 22 jours	6	14 jours	71 ± 9
		contam : 54 jours	3	14 jours	75 ± 27
1er essai SOLVAY 100 L	150 jours	pré-contam : 28 jours	6	12 à 15 jours	63 ± 7
		pré-contam : 52 jours	6	16 à 27 jours	58 ± 7
		contam : 36 jours	2	10 à 16 jours	80 ± 23 (témoin) 46 ± 55 (séd brut) 40 ± 34 (séd traité)
2ème essai SOLVAY 180 L	172 jours	pré-contam : 36 jours	6	13 jours	40 ± 15
		pré-contam : 42 jours	6	10 à 22 jours	48 ± 17
		contam : 56 jours	2	env 16 jours	120 (témoin) 35 ± 16 séd brut 57 ± 51 séd traité
		contam : 34 jours	2	NC	NC

Tableau A4-2. Résumé des performances de développement de l'amphipode *Hyalella azteca* obtenues en essais microcosmes 100 et 180 L (contam : contamination ; séd : sédiment)

	Durée	Durée phase	Réplicats	Nombre initial	Nombre final		Poids sec final (mg/ind.)	
					témoin	contaminé	témoin	contaminé
1er essai MIOM	91 jours	exposition 59 jours	1	100	129	299	0.15 à 0.79	0.05 à 0.73
2ème essai MIOM	95 jours	pré-contam : 22 j contam : 54 j	3	100	125 ± 65	44 ± 13	0.61 ± 0.07	0.38 ± 0.09
1er essai SOLVAY	150 jours		6 ou 2	50	0	0		
Essai gravière Solvay	102 jours	102 jours (dont 70 jours contam)	1	100	64	22 (séd brut) 61 (séd traité)	1.19 (témoin)	0.76 (séd brut) 0.44 (séd traité)

Tableau A4-3. Résumé des performances de développement des populations de *D. magna* obtenues en essais microcosmes 100 et 180 L (contam : contamination ou contaminé; séd : sédiment)

	Durée essai	Durée phase	Réplicats	Nombre initial	Nombre final	Nombre maximal
1er essai MIOM	91 jours	pré-contam : 30 jours	2	220	875 ± 29	
		contam : 59 jours	1	survie difficile, nombreuses réinoculations		
2ème essai MIOM	95 jours	pré-contam : 22 jours	6	100	1151 ± 383	
		contam : 27 jours	3	100	24 ± 21 témoins 9 ± 9 contam	
		contam : 20 jours	3	+ 60 individus	45 ± 33 témoins 36 ± 14 contam	
1er essai SOLVAY	151 jours	pré-contam : 30 j	6	50	121 à 1951	400 à 1951
		pré-contam : 32 j	6	+ 100 à J31	0 à 961	139 à 1024
		pré-contam : 50 j contam : 38 j	6 2	+ 100 à J63 +100 à J113	2 à 31 0 à 136	78 à 221 0 à 136
2ème essai SOLVAY	172 jours	pré-contam : 22 j	6	50	311 ± 203	684
		pré-contam : 43 j	6	remise à 0 à J22 + 50 individus à J36	167 ± 246	3455 à J63
		contam : 88 j	2	+ 18 ind. à J84	0 ± 0 témoins 387 ± 460 séd traité 1176 ± 670 séd brut	385 ± 544 témoins 417 ± 358 séd traité 1243 ± 377 séd brut
Essai gravière Solvay		pré-contam : 22 jours	3	50 ind à J-22 et 50 à J-5	pas de comptage mais survie mères moyenne	
		contam : 69 jours	1	+ 100 à J3 en G1 et G2 + 100 à J21 en G2	0 témoin 1489 séd brut 750 séd traité	706 témoin 4940 séd brut 2222 séd traité

Tableau A4-4. Résumé des performances de développement des populations de *Ceriodaphnia dubia* obtenues en essais microcosmes 100 et 180 L (contam : contamination ou contaminé; séd : sédiment)

	Durée essai	Durée phase	Réplicats	Nombre initial	Nombre final
1er essai MIOM	91 jours	contam : 59 jours	1	30	2400 témoin - 3000 contam
2ème essai MIOM	95 jours	pré-contam : 22 jours	6	50	78 ± 67
		contam : 54 jours	3	pas de réintroduction	3267 ± 2616 témoins 4500 ± 1803 contam
1er essai SOLVAY	150 jours	pré-contam : 113 j	6	50	0 à 9000
		contam : 38 jours	2		0
Essai gravière Solvay		pré-contam : 5 jours	3	+ 50 individus à J-5	non mesuré
		contam : 69 jours	1		16730 témoin 142 séd brut 2284 séd traité

Tableau A4-5. Résumé des performances de croissance de *Lemna minor* obtenues en essais microcosmes 100 et 180 L (contam : contamination ou contaminé; séd : sédiment ; croiss : croissance ; exp : exponentielle ; fr : fronde ; en cas de croissance linéaire le taux de croissance est exprimé comme la pente de la droite d'ajustement, en frondes/jour, en cas de croissance exponentielle il s'agit de μ en jours^{-1} , avec $N = N_0 * \exp^{\mu t}$)

Essai	Durée	Durée phase	Réplicats	Croissance	
				Témoins	Contaminés
1er essai MIOM	91 jours	pré-contam : 30 j	2	taux = 0.108 j^{-1} (croiss exp)	
		contam : 54 j	1	18.8 fr/jour	4.5 fr/jour
2ème essai MIOM	95 jours	pré-contam : 28 j	6	4.6 ± 1.3 fr/jour	
		1ère contam : 20 j	3	1.4 ± 0.7 fr/jour	2.4 ± 2.6 fr/jour
		2ème contam : 23 j	3		
1er essai Solvay	150 jours	pré-contam : 64 j	6	21 ± 9 fr/jour	
		contam : 38 j	2	0.78 ± 1.24 fr/j	17.6 ± 8.5 (séd brut) 5.3 ± 4.9 (séd traité)
2ème essai Solvay	172 jours	pré-contam : 28 j	6	croiss exp : $0.11 \pm 0.12 \text{ j}^{-1}$	
		pré-contam : 21 j	6	croiss exp : $0.11 \pm 0.12 \text{ j}^{-1}$	
		pré-contam : 40 j	6	croiss exp : $0.08 \pm 0.016 \text{ j}^{-1}$	
		contam : 42 j	2	0.09 ± 0.03 j^{-1} (témoin)	0.08 ± 0.008 j^{-1} (séd traité) 0.09 ± 0.013 j^{-1} (séd brut)
		contam : 35 j	2	0.089 ± 0.04 j^{-1} (témoin)	0.077 ± 0.011 j^{-1} (séd traité) 0.095 ± 0.022 j^{-1} (séd brut)
Essai gravière Solvay	102 jours	pré-contam : 39 j	3	0.066 ± 0.003 j^{-1}	
		contam : 21 j	1	0.0609 j^{-1} (témoin)	0.0862 j^{-1} (séd brut) 0.0417 j^{-1} (séd traité)
		contam : 34 j	1	0.0879 j^{-1} (témoin)	0.1354 j^{-1} (séd brut) 0.0077 j^{-1} (séd traité)
		contam : 13 j	1	0.1088 j^{-1} (témoin)	0.1494 j^{-1} (séd brut) 0.0838 j^{-1} (séd traité)

Tableau A4-6. Résumé des performances de croissance de *Spirodela polyrhiza* obtenues en essais microcosmes 100 et 180 L (contam : contamination ou contaminé; séd : sédiment ; croiss : croissance ; exp : exponentielle ; fr : fronde ; en cas de croissance linéaire le taux de croissance est exprimé comme la pente de la droite d'ajustement, en frondes/jour, en cas de croissance exponentielle il s'agit de μ en jours⁻¹, avec $N = N_0 * \exp^{\mu t}$)

Essai	Durée	Durée phase	Réplicats	Croissance	
				Témoins	Contaminés
2ème essai MIOM	95 jours	contam : 52 j	3	0.58 ± 0.20 fr/jour	0.38 ± 0.15 fr/jour
2ème essai Solvay	172 jours	pré-contam : 28 j	6		0.11 ± 0.0065 j ⁻¹
		pré-contam : 21 j	6		0.10 ± 0.0105 j ⁻¹
		pré-contam : 40 j	6		0.09 ± 0.012 j ⁻¹
		contam : 42 j	2	0.07 ± 0.03 j ⁻¹	0.049 ± 0.014 j ⁻¹ (séd traité)
		contam : 35 j	2	0.065 ± 0.000 j ⁻¹	0.10 ± 0.010 j ⁻¹ (séd brut)
Essai gravière Solvay	102 jours	pré-contam : 22 j	3		1.98 ± 0.96 fr/j
		contam : 21 j	1	7.2 fr/j	19.3 fr/j (séd brut)
		contam : 34 j	1	0 j ⁻¹	2.5 fr/j (séd traité)
		contam : 13 j	1	0.088 j ⁻¹	0.104 j ⁻¹ (séd brut)
					0.038 j ⁻¹ (séd traité)
				0.112 j ⁻¹ (séd brut)	
				0.031 j ⁻¹ (séd traité)	

Tableau A4-7. Résumé des performances de croissance de plantes enracinées (*Elodea canadensis* et *Myriophyllum spicatum*) obtenues en essais microcosmes 100 et 180 L (Ec : *Elodea canadensis* ; Ms : *Myriophyllum spicatum*; EN : entre-noeuds ; contam : contamination ou contaminé; séd : sédiment ; croiss : croissance ; exp : exponentielle ; fr : fronde ; en cas de croissance linéaire le taux de croissance est exprimé comme la pente de la droite d'ajustement, en frondes/jour, en cas de croissance exponentielle il s'agit de μ en jours⁻¹, avec $N = N_0 * \exp^{\mu t}$)

Essai	Durée	Durée phase	Réplicats	Plante	Croissance	
					Témoins	Contaminés
1er essai MIOM	91 jours	pré-contam : 30 j contam : 59 j	2 1	Ec	croiss variable et modérée maxi + 0.2 entre-nœud/jour	
2ème essai MIOM	95 jours	pré-contam : 28 j	6	Ec	croissance linéaire sur les 71 jours, pas d'effets des contam	
		1ère contam : 20 j	3		0.78 ± 0.34 cm/j	0.71 ± 0.18 cm/j
		2ème contam : 23 j	3		1.61 ± 0.44 EN/j	1.60 ± 0.25 EN/j
1er essai Solvay	150 jours	pré-contam : 42 j	6	Ec	1.76 ± 0.46 EN/j 0.50 ± 0.20 cm/j plus de plante en période de contamination	
2ème essai Solvay	172 jours	85 j (dont 55 j contam)	2	Ec	4.22 ± 0.38 EN/j (témoin) 1.99 ± 0.32 cm/j (témoin)	2.91 ± 1.26 EN/j (séd traité) 1.49 ± 0.74 cm/j (séd traité) 3.35 ± 1.29 EN/j (séd brut) 1.67 ± 0.73 cm/j (séd brut)
Rq : pas d'effet des traitements appliqués. calcul sur l'ensemble de l'essai croissance linéaire						
Essai gravière Solvay		84 jours dont 49 jours de post-contamination	1	Ec	1.28 EN/j (témoin) 0.43 cm/j (témoin)	1.76 ± 0.5 EN/j (séd traité) 0.75 ± 0.13 cm/j (séd traité) 1.02 ± 0.39 EN/j (séd brut) 0.44 ± 0.23 cm/j (séd brut)
		60 jours post-contam	1	Ms	0.0116 j-1 (EN témoin) 0.0197 j-1 (L témoin)	0.0309 j-1 (EN séd brut) 0.0397 j-1 (L séd brut) 0.0178 j-1 (EN séd traité) 0.0281 j-1 (L séd traité)

Tableau A4-8. Résumé des performances du mollusque gastéropode *Lymnaea stagnalis* obtenues en essais microcosmes 100 et 180 L (contam : contamination ou contaminé; séd : sédiment)

Essai	Durée	Durée phase	Réplicats	Survie (%)		Croissance (mm/jour)		Reproduction			
				Témoins	Contam	Témoins	Contam	nombre de pontes/jour/limnée		nombre d'œufs/jour/limnée	
								Témoins	Contam	Témoins	Contam
1er essai MIOM	91 jours	exposition 59 jours	1	environ 50% (témoins et contam)		variable et faible					
2ème essai MIOM	95 jours	pré-contam : 28 j	6	93 ± 7	/					/	/
		1ère contam : 20 j	3	83 ± 19	83 ± 7	0.085 ± 0.023	0.068 ± 0.0168	/	/		
		2ème contam : 23 j	3	71 ± 19	33 ± 14						
1er essai SOLVAY	150 jours	pré-contam : 95 j	6	variable et faible				0.147 ± 0.024		4.31 ± 0.74	
		pré-contam : 18 j	6	90 à 100		/	/	pas de pontes (jeunes limnées)			
		contam : 38 j	2	70 à 90				pas de pontes (jeunes limnées)			
2ème essai SOLVAY	172 jours	pré-contam : 77 j	6	80 ± 28	/			0.124 ± 0.028		6.29 ± 1.31	
		contam à J81									
		contam : 38 j	2	60 ± 28	95 ± 7 (séd traité) 96 ± 7 (séd brut)	/	/	0.130 ± 0.026	0.188 ± 0.056 traité 0.173 ± 0.019 brut	6.31 ± 0.77	7.06 ± 0.29 traité 7.22 ± 0.94 brut
		remplacement limnées à J119									
		contam : 50 j	2	81 ± 27	100 ± 0 (séd traité) 100 ± 0 (séd brut)	/	/	/	/	/	/
Essai gravière Solvay		pré-contam : 20 j	3	90 ± 10		0.422 ± 0.062		négligeable (< 3)		/	/
		contam : 24 h	1	80	70 (séd traité) 100 (séd brut)						
		contam : 59 j	1	80	100 (séd traité) 100 (séd brut)	0.146	0.197 (séd brut) 0.135 (séd traité)	0.345 (témoin)	0.197 (séd brut) 0.33 (séd traité)	21 (témoin)	14.2 (séd brut) 19.3 (séd traité)

Tableau A4-9. Résumé des performances du mollusque gastéropode *Physa acuta* obtenues en essais microcosmes 100 et 180 L (contam : contamination ou contaminé; séd : sédiment)

Essai	Durée	Durée phase	Réplicats	Nombre de physes final	
				Témoins	Contaminés
1er essai MIOM	91 jours	exposition 29 jours	1		
2ème essai MIOM	95 jours	pré-contam : 28 j	6	239 ± 111	252 ± 59
		1ère contam : 20 j	3		
		2ème contam : 23 j	3		
1er essai SOLVAY	150 jours	pré-contam : 95 j	6	506 à 1199	
		contam : 38 j	2	437	132 - 151
Essai gravière Solvay	75 jours	contam : 56 j	1	504	528 (séd brut) 415 (séd traité)

**ANNEXE 5 : DONNEES SUR LA VARIABILITE DE LA CROISSANCE
DES LENTILLES D'EAU EN MICROCOSMES 2 L**

Tableau A5-1. Statistiques relatives aux coefficients de variation intra-essai pour le nombre de frondes de *L. minor* dans les microcosmes témoins et les microcosmes contaminés

	7 jours		14 jours		21 jours		28 jours	
	témoins	contam.	témoins	contam.	témoins	contam.	témoins	contam.
nombre de valeurs								
moyenne	11.62	11.33	15.16	13.31	16.72	14.62	20.32	20.14
écart-type	5.36	5.85	9.60	6.93	13.17	8.16	13.08	15.02
min	3.01	0.00	3.61	1.08	1.30	1.47	1.52	0.90
max	23.34	34.79	45.47	32.13	49.77	42.62	49.29	69.01
médiane	11.33	9.80	13.08	12.63	12.90	13.72	17.88	15.63
% CV <20%	93	90	71	80	62	77	55	63

Tableau A5-2. Statistiques relatives aux coefficients de variation intra-essai pour la biomasse pondérale de lentilles d'eau *L. minor* dans les microcosmes témoins et les microcosmes contaminés

	7 ou 10 jours		14 jours		21 jours		28 jours	
	témoins	contam.	témoins	contam.	témoins	contam.	témoins	contam.
nombre de valeurs	14	32	8	18	15	44	18	40
moyenne	15.38	17.72	18.09	13.30	10.12	15.76	15.00	21.87
écart-type	24.02	32.21	13.02	7.36	6.91	14.35	8.04	15.76
min	1.18	0.58	6.07	0.46	0.38	0.10	4.05	1.46
max	96.13	152.21	44.41	23.79	21.19	73.48	28.96	64.79
médiane	11.75	9.82	12.61	13.61	11.11	12.48	14.10	18.18
% CV <20%	86	91	63	72	93	73	72	60

Tableau A5-3. Statistiques relatives aux coefficients de variation intra-essai pour la biomasse par fronde (poids sec) dans les microcosmes témoins et les microcosmes contaminés

	7 ou 10 jours		14 jours		21 jours		28 jours	
	témoins	contam.	témoins	contam.	témoins	contam.	témoins	contam.
nombre de valeurs	13	30	6	14	14	42	17	38
moyenne	16.49	11.61	18.40	14.78	9.67	12.08	17.81	20.59
écart-type	9.95	5.87	8.73	7.74	10.07	8.30	15.29	22.94
min	1.40	1.74	7.32	5.43	1.87	1.34	3.76	2.03
max	34.92	24.05	33.51	30.56	35.69	31.45	55.90	124.39
médiane	15.39	10.37	16.68	13.81	5.79	9.59	12.22	11.72
% CV <20%	69	83	67	86	86	83	71	63

**ANNEXE 6 : TENEURS EN HAPS DE SEDIMENTS
PLUS OU MOINS CONTAMINES**

Tableau A6. Concentrations en HAPs de quelques sédiments (d'après Verrhiest 2001 et complété par l'auteur de ce rapport).

	Lieu	Zone étudiée	Phénanthrène (mg/kg)	Fluoranthène (mg/kg)	Benzo(k)fluoranthène (mg/kg)	Pyrène (mg/kg)	Σ 16 HAPs (mg/kg)	Références
Sédiments marins	Ouest de la mer Méditerranée	N+C	0.06 à 1.86	0.001 à 3.18	–	nd	1.18 à 20.44	Baumard <i>et al.</i> , 1998
	Bassin d'Arcachon	C	–	–	–	nd	5 à 10	Geffard <i>et al.</i> , 1999 Raymond <i>et al.</i> , 1999
	Ouest de la mer Beaufort (Alaska)	N	–	–	–	nd	0.16 à 1.1	Valette-Silver <i>et al.</i> , 1999
	Mer Baltique	N	0.03 à 0.08	0.05 à 0.27	0.05 à 0.16	nd	0.72 à 1.9	Witt, 1995
Sédiments d'eau douce	Ain	N *	0.05 à 0.12	0.25 (moyenne)	0.07 à 0.3	nd	–	Verrhiest, 2001
	Neyrieux	N *	<0.05	<0.05	0.03	nd	–	Verrhiest, 2001
	Confluence Seine-Marne	N	0.5 (moyenne)	0.82 (moyenne)	–	nd	1.5 à 7.4	Garban et Ollivon (1995)
	Rhône, Saône et Ain	N+C	<0.05 à 0.55	< 0.04 à 0.88	< 0.01 à 0.67	nd	0.52 à 14.64	Bonnet, 2000
	Moselle et Meurthe (France)	N+C	<0.53 à 3.44	0.75 à 6.3	0.38 à 1.5	nd	6.68 à 32	Bonnet, 2000
	Seine	N	–	–	–	nd	2 à 4	Ollivon <i>et al.</i> , 1995
		C	–	–	–	–	60	
	Lac d'Annecy	C	–	–	–	nd	1.43	Naffrechoux <i>et al.</i> , 1999
	Niagara river (EU)	N	0.01	0.04	–	nd	0.4 (moyenne)	Eisler, 2000
		C	0.4	0.9	–	–	3.3 à 5.4	
	Black river (EU)	C	52 (moyenne)	33 (moyenne)	1.5 (moyenne)	nd	–	Eisler, 2000
	Lac d'Aiguebelette craie	N*	0.0006	0.003	0.0019	0.0029	0.03	Godde, 2001
	Lac d'Aiguebelette tourbe	N*	0.006	0.014	0.0046	0.0127	0.13	Godde, 2001
	CEBS code B2	C*	0.51	0.87	0.26	0.95	5.86	Bray <i>et al.</i> , 2001
	CEBS code B13	C*	1.3	1.6	0.48	1.5	9.58	Bray <i>et al.</i> , 2001
	CEBS code B22	C*	0.84	1.45	0.46	1.33	9.59	Bray <i>et al.</i> , 2001
	Nord 13990	C*	0.53	0.68	0.89	1.84	10.09	Bray <i>et al.</i> , 2003
Nord 17000	C*	3.96	2.53	0.15	7.00	19.11	Bray <i>et al.</i> , 2003	
Nord 12570	C*	1.23	1.64	2.04	3.31	17.04	Bray <i>et al.</i> , 2003	
Nord 12730	C*	2.29	7.36	4.43	6.34	37.64	Bray <i>et al.</i> , 2003	
Nord 12800	C*	2.52	4.67	3.71	5.59	62.54	Bray <i>et al.</i> , 2003	

N : normal ; C : contaminé ; CEBS : Canal de l'Est Branche Sud ; nd : donnée non disponible ; * sédiments utilisés dans nos études

ANNEXE 7 : TOXICITE DE QUELQUES HAPS
VIS-A-VIS D'ORGANISMES AQUATIQUES

Tableau A7-1. Données de toxicité aiguë du phénanthrène, du fluoranthène et du benzo(k)fluoranthène vis-à-vis d'invertébrés d'eau douce (source: Verrhiest, 2001)

HAP	Organisme	Mode de vie	CI50/CL50 (µg/l eau surnageante ou mg/kg sédiment sec)	Durée d'exposition/ Paramètre observé
Phénanthrène	<u>Hydre</u> <i>Hydra sp.</i>	Pélagique	96 µg/l	_ /mortalité
	<u>Daphnie</u> <i>Daphnia magna</i>	Pélagique	700 µg/l	_ /mortalité
	<i>Daphnia pulex</i>		734 µg/l	_ /mortalité
	<u>Amphipode</u> <i>Gammarus pseudolimnaeus</i>	Epibenthique	126 µg/l	_ /mortalité
	<u>Insecte</u> <i>Chironomus tentans</i>	Benthique	490 µg/l	_ /mortalité
	<u>Annélide</u> <i>Lumbriculus variegatus</i>	Benthique	> 419 µg/l	_ /mortalité
Fluoranthène	<u>Hydre</u> <i>Hydra americana</i>	Pélagique	70.06 µg/l	_ /mortalité
	<u>Daphnie</u> <i>Ceriodaphnia dubia</i>	Pélagique	45 µg/l	_ /mortalité
	<i>Daphnia magna</i>		102.8 µg/l	_ /mortalité
			43 à 92 µg/l 4.2 à 15 mg/kg	10 jours/mortalité 10 jours /mortalité
	<u>Amphipode</u> <i>Hyalella azteca</i>	Epibenthique	97 à 114 µg/l 32 à 54 µg/l 2.3 à 7.4 mg/kg	10 jours/mortalité 10 jours/mortalité 10 jours/mortalité
	<u>Insecte</u> <i>Chironomus tentans</i>	Benthique	30 à 61 µg/l	10 jours /mortalité
			3 à 8.7 mg/kg	10 jours /mortalité
	<i>Chironomus riparius</i>		29 à 41 µg/l 170 mg/kg	11 jours /mortalité 28 jours /émergence
	<u>Annélide</u> <i>Lumbriculus variegatus</i>	Benthique	> 178.5 µg/l	_ /mortalité

Tableau A7-2. Données de toxicité d'HAPs en phase aqueuse sur trois organismes pélagiques (Vindimian *et al.*, 2000)

µg/L	Daphnie		Algue		Cériodaphnie	
	CL50-48 h survie	IC95%	CE10 croissance	IC95%	CE10 reprod 7 j	IC95%
Benzo(k)fluoranthène	> 1.1		> 1.5		> 1.5	
Banzo(a)anthracène	> 9.1		4.1	3.8-4.6	> 13	
Benzo(b)fluoranthène	> 1.1		> 1.5		> 1.5	
Benzo(ghi)pérylène	> 0.2		> 0.26		0.124	0-0.17
Benzo(a)pyrène	> 2.7		1.54	1.52-1.57	0.77	0.03-2.2
Dibenzo(a,h)anthracène	> 0.35		0.73	0.52-1.31	> 0.046	
Acénaphène	958	916-994	308	266-371	64	50-100
Acénaphthylène	1800	1731-1956	595	505-703	95	47-231
Anthracène	> 25		23.3	18.6-27.8	> 4.9	
Fluorène	408	368-449	485	411-540	33	28-45
Chrysène	> 1.3		> 3.9		> 0.13	
Fluoranthène	> 112		33.1	27.8-37.5	1.2	0.2-4.9
Indéno(1,2,3,cd)pyrène	> 357		5.7	3.6-9.8	0.38	0-9.49
Naphtalène	1664	1441-1902	> 8024		999	761-1331
Phénanthrène	> 400		123.5	80.1-170.4	15	4.7-19
Pyrène	24.6	21.6-28.4	12.4	6.7-17.9	2.1	1.3-3.1

**ANNEXE 8 : SYNTHÈSE DES EFFETS DES PERCOLATS DE MIOM
A DIFFÉRENTES ÉCHELLES D'ESSAI**

Tableau A8-1. Synthèse des effets des percolats de MIOM sur quelques producteurs primaires exposés dans différents types d'essai (NT : non testé)

	MIOM		Test mono	2 L	100 L n°1	100 L n°2	
Algue	MIOM1	P1	CE50-72h<1.56% (f, aj)	effet à partir de 4%	mais reprise croissance même à 8% après 10 jours (favorisée par déclin des daphnies)	NT	
		P2	CE50-72h=5.5% (f, aj)	effet à partir de 8%			
		P3	CE50-72h=35% (f, aj)	effet à partir de 1.56%			
<i>P. subcapitata</i>	MIOM2	fractions A à D	CE50-72h<1.56% à 8% (f, aj)	NT	pas d'effet même à 6%, après apport cumulé de plus de 200 µg Cu/L	NT	
		fraction E à H composite ^a	CE50-72h=22 à 54% (f, aj) NT				données non utilisables
Périphyton	MIOM2	Fractions A à H composite ^a	NT	NT	NT	NT pas d'effet	
Lentille	MIOM1	P1 filtré	CE50-96h=24% (f, aj)	effet à partir de 8%	NT	NT	
		P1 non filtré	CE50=14% (aj)				
		P2 filtré	CE50=44% (f, aj)				
		P2 non filtré	CE50=51% (aj)	effet à partir de 4%			
		P3 filtré	CE50<1.56% (f, aj)	effet à partir de 8%			
		P3 non filtré	CE50<1.56% (aj)				
<i>L. minor</i>	MIOM2	fractions A à D	CE50=6% à non toxique (f, aj)	NT	effet à partir de 2%, correspondant à un apport en Cu de 148 µg/L et une teneur mesurée de 130 µg/L	NT	
		fraction E à H composite ^a	CE50=<1.56% à non toxique (f, aj)				pas d'effet
Plantes enracinées <i>E. canadensis</i> <i>G. densa</i>	MIOM1	P1, P2, P3			NT	NT	
	MIOM2	fractions A à H composite ^a	NT	NT	données inutilisables	pas d'effet	

f : percolat filtré 0.45 µm
aj : pH ajusté à 8

^a mélange fractions A,B,C,F,G,H
NT : non testé

Tableau A8-2. Synthèse des effets des percolats de MIOM sur quelques invertébrés pélagiques et benthiques exposés dans différents types d'essai

MIOM		Test mono	2 L	100 L n°1	100 L n°2		
Amphipode <i>H. azteca</i>	MIOM1	P1 P2 P3	NT	effet survie à partir de 8%, pas d'effet sur croissance à 8%	NT	NT	
	MIOM2	Fractions A à H composite ^a	CL50-5 j = 1%	NT	effet à partir de 2% via la colonne d'eau, pas d'effet via le sédiment	NT	effet à 1% via l'eau
Chironome <i>C. riparius</i>	MIOM1	P1 P2 P3	NT	Effet sur émergence à partir de 8%	Effet sur croissance à partir de 4%	NT	NT
	MIOM2	Fractions A à H composite ^a		NT	pas de données	pas d'effet sur émergence	NT
Limnée <i>L. stagnalis</i>	MIOM1	P1, P2, P3			NT	NT	NT
	MIOM2	Fractions A à H composite ^a	NT	NT	données inutilisables	NT	effet sur survie et consommation à 3%
Physe <i>P. acuta</i>	MIOM1	P1, P2, P3			NT	NT	NT
	MIOM2	Fractions A à H composite ^a	NT	NT	pas d'effet même à 6%	NT	pas d'effet à 3%
Cladocère <i>D. magna</i>	MIOM1	P1 P2 P3	pas d'effet sur 48 h (ajustement du pH)	survie effet à partir de 1.56%	repro pas d'effet effet à partir de 4%	NT	NT
	MIOM2	fractions A à D fraction E à H composite ^a	CE50-24 h=1.5%	NT	NT	effets à 1, 2 et 3% puis pas d'effet	NT
Cladocères <i>C. dubia</i> <i>S. vetulus</i>	MIOM1	P1, P2, P3				NT	NT
	MIOM2	Fractions A à H composite ^a	NT	NT		pas d'effet même à 6%	pas d'effet

f : percolat filtré 0.45 µm
aj : pH ajusté à 8

^a mélange fractions A,B,C,F,G,H
NT : non testé

