Développement d'une batterie de mesures biologiques pour l'évaluation du risque associé aux sédiments contaminés

C. Durand

▶ **To cite this version:**

C. Durand. Développement d'une batterie de mesures biologiques pour l'évaluation du risque associé aux sédiments contaminés. Sciences de l'environnement. Doctorat, Ecotoxicologie, Biodiversité, Ecosystèmes, Université de Lorraine, 2012. Français. NNT : . tel-02597771

HAL Id: tel-02597771
https://hal.inrae.fr/tel-02597771

Submitted on 15 May 2020

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.

Laboratoire dôécotoxicologie, Institut national de Recherche en Sciences et Technologies pour lôEnvironnement et lôAgriculture (IRSTEA)
Laboratoire des Interactions Ecotoxicologie, Biodiversité, Ecosystèmes (LIEBE) UMR 7146

THESE

Présentée devant L'UNIVERSITE DE LORRAINE pour l'obtention du grade de

Docteur de l'Université de Lorraine

Discipline : Ecotoxicologie, Biodiversité, Ecosystèmes

par

Cyrielle Lucie DURAND

Développement dôune batterie de mesures biologiques pour lôévaluation du risque associé aux sédiments contaminés

---

Soutenue publiquement le 09 novembre 2012 devant la commission dôexamen suivante :

Directrice	**Mme. Jeanne GARRIC**	Directrice de recherche, Irstea
Co-directeurs de thèse	**M. Benoit J.D. FERRARI**	Chercheur, Irstea
	M. Jean-François FERARD	Professeur, Université de Lorraine
Rapporteurs	**Mme. Catherine MOUNEYRAC**	Professeur, Université Catholique de lôOuest
	M. Bernard CLEMENT	Professeur de lôEcole Nationale des Travaux Publics de l'Etat
Examinatrice	**Mme. Maria del Carmen CASADO MARTINEZ**	Chercheur, Ecole Polytechnique Fédérale de Lausanne (Suisse)

En essayant continuellement on finit par réussir.
Donc : plus ça rate, plus on a de chances que ça marche.
(devise Shadok)

Remerciements

Tout dôabord je tiens à remercier Jeanne Garric, directrice du laboratoire dôécotoxicologie et directrice de cette thèse, de môavoir accueillie dans son équipe. Elle est une mine dôidées et travailler à son contact fait évoluer en tant que jeune chercheur.

Pendant toute la durée de mon projet de thèse, jôai également eu la chance dôêtre co-encadrée par Benoit Ferrari. Je souhaite sincèrement à tout étudiant en doctorat dôavoir un encadrant comme lui, côest enrichissant à la fois sur les plans scientifique, professionnel et humain. Merci de môavoir soutenue du début à la fin.

Je tiens également à remercier les membres de mon comité de thèse pour lôintérêt quôils ont porté à ce travail et pour les remarques constructives quôils ont fait sur mon projet de thèse. Jôadresse également mes remerciements aux membres du jury dôavoir accepté de juger ce travail.

Côest avec émotion que je dis un grand merci à tous les membres du labo, Manuela, Emilie, Delphine, Judith, Guillaume, Romain, Juliette, Jean-phi, Räph, Rebecca, Claire, Renaud, Patrice, Amandine, Olivier, Arnaud, Khédidja, Marc, Adeline, Hervé, Alex, Jérôme. Vous môavez tous aidé à un moment où un autre, à la paillasse ou au bureau, mais aussi pour me détendre autour dôapéro ou encore devant un plateau de jeu (merci aux chevaliers de la table carrée). Marion, je te remercie tout spécialement pour ton soutien et ton aide inconditionnelle, et bien que tu ais essayer de me tuer en montagne, je te considère désormais comme une amie très chère.

Une thèse est prenante, elle vous enferme dans sa bulle, un monde à part, pendant quelques années. Difficile souvent pour mes amis restés dans le monde réel, de bien comprendre ce que ça représente, mais vous avez été fantastiques. Compréhensifs, vous avez su me laisser en paix quand cô était nécessaire, mô écouter quand jôavais besoin de parler, môaider quand le travail me submergeait, et surtout me détendre quand le stress môenvahissait. Des tas de souvenirs me reviennent avec vous et tout spécialement Claudia, Fanny, Estelle, Rémi, Damien, Stéphanie, Aurélie, Guillaume, Manue, Giovanni, et bien sûr Boris. Jôai hâte que lôon se retrouve pour la saison 2.
Plus jôécris, plus la liste des choses que jôai envie de dire sôallonge, mais il y en a trop, et vous êtes nombreux à y avoir contribué. Ça môaide à me rendre compte de lôampleur du soutient que jôai eu jôai de la chance de vous avoir, Merci.
Je tiens tout de même à décerner le lapin dôor de lôami le plus présent, le plus patient, toujours à lô écoute, sur qui je peux compteré Bref, le lapin dôor du meilleur ami, à toi Luc. Je ne trouve pas les mots pour te dire à quel point tu es fantastique. Merci pour tout !

Jôaime garder le meilleur pour la fin, ma famille, et en particulier papa, maman, Faustine, Corentin, Loïc, mamie et Bibi. Je ne vous ai pas vraiment fait rentrer dans ma bulle de thésarde. Jôai principalement partagé avec vous les bons moments, et vous avez su me laisser mon jardin secret. Grâce à ça, chaque retour à la maison me permettait dôoublier pour quelques jours les tracas de la thèse. Vous êtes mon refuge, je vous aime.

Table de matières

Remerciements
Table des matières
Liste des valorisations
Liste des abréviations
Liste des figures
Liste des tableaux

Introduction p 1
Contexte p 1
Problématique p 2
Démarche mise en î uvre p 4

Chapitre 1 Etat de l'art p 9
I- Les caractéristiques sédimentaires p 12
1- Définition et rôle p 12
2- Composition et structure p 13
3- Les contaminants p 14
a- Les métaux p 15
b- Les composés organiques p 16
4- Interactions entre les sédiments et les contaminants p 17
a- Répartition et mobilité des contaminants dans les sédiments p 17
b- Mobilité des contaminants p 18
c- Interactions avec les organismes vivants p 20
d- Remise en suspension des sédiments p 20
5- Enjeux réglementaires et sociétaux p 22
a- Enjeux réglementaires p 22
b- Enjeux sociétaux p 23
II- Les méthodes d'évaluation de la qualité des sédiments p 24
1- Les critères de qualité des sédiments p 24
2- Les tests écotoxicologiques standardisés disponibles p 26
III- Matériel biologique p 30
1- *Gammarus fossarum* p 30
a- Classification p 30
b- Ecologie et biologie p 30
2- *Chironomus riparius* p 38
a- Classification p 38
b- Ecologie et biologie p 38
3- *Potamopyrgus antipodarum* p 43
a- Classification p 43
b- Ecologie et biologie p 43
4- Utilisation des trois espèces modèles en écotoxicologie appliquée à l'évaluation de toxicité des sédiments p 47

Chapitre 2 Matériels et méthodes p 55
I- Collecte, stockage et préparation des échantillons p 58
1- Collecte, stockage et analyse des sédiments p 58
a- Collecte et stockage des sédiments p 58
b- Analyse physicochimique des sédiments et dosages des métaux et des micropolluants organiques p 59
2- Préparation des sédiments avant les tests p 62
a- Les sédiments bruts p 62
b- Dopage d'un sédiment de référence en cadmium p 62
II- Origine des organismes, prélèvement, élevage et maintien au laboratoire p 64
1- *Gammarus fossarum* p 64
2- *Chironomus riparius* p 65
3- *Potamopyrgus antipodarum* p 66
III- Les bioessais p 68
1- Conditions générales d'exposition p 68
2- Mesures biologiques sur *Gammarus fossarum* p 69
a- La reproduction des adultes p 69
b- La croissance des juvéniles p 71
c- L'alimentation des mâles adultes p 72
d- Les taux de survie p 73
3- Mesures biologiques sur *Chironomus riparius* p 74
a- La croissance des larves p 74
b- L'émergence des imagos p 75
c- Les taux de survie p 76
4- Mesures biologiques sur *Potamopyrgus antipodarum* p 76
a- La reproduction des adultes p 76
b- La croissance des juvéniles p 77
c- Les taux de survie p 78
5- Suivi physico chimique des tests p 78
6- Dosage des métaux accumulés dans les organismes p 78
IV- Traitement statistisque des données p 80
1- Définition des gammes de réponse en conditions de référence p 80
2- Impact des sédiments contaminés p 84
a- Comparaison des réponses des critères de mesure obtenues en conditions contaminées avec les référentiels de réponse définis sur sédiments de référence p 84
b- Sédiment dopé : relation dose réponse p 84

Chapitre 3 Présentation des sédiments testés p 89
I- Choix des sites de prélèvement p 92
1- Sélection des sites de référence p 93
2- Sélection des sites contaminés p 101
II- Caractérisation des sédiments p 102
1- Principales caractéristiques géochimiques des sédiments p 102
a- Sédiments de référence p 103
b- Sédiments contaminés p 105

c- Comparaison des caractéristiques géochimiques des deux catégories de sédiments, références et contaminés p 107
2- Contamination métallique et micropolluants organiques p 108
a- Contenu en contaminants des sédiments sélectionnés p 109
b- Représentativité des sédiments sélectionnés dans le contexte franco-belge p 112
c- Niveaux de contamination et toxicité p 115
III- Organisation des expérimentations p 118
IV- Discussion p 102

Chapitre 4 Etude de la variabilité naturelle des traits de vie sur des sédiments de référence et définition des seuils de réponse p 125
I- *Gammarus fossarum* p 18
1- Résultats des biotests sur sédiments de référence avec *G. fossarum* p 129
a- Reproduction p 129
b- Alimentation p 130
c- Croissance p 130
2- Discussion p 132
II- *Chironomus riparius* p 137
1- Résultats des biotests sur sédiments de référence avec *C. riparius* p 137
a- Croissance p 137
b- Emergence p 138
2- Discussion p 140
III- *Potamopyrgus antipodarum* p 144
1- Résultats des biotests sur sédiments de référence avec *P. antipodarum* p 144
a- Reproduction p 144
b- Croissance p 146
2- Discussion p 148

Chapitre 5 Evaluation de la batterie de tests en conditions contaminées p 155
I- Sédiments naturels contaminés p 158
1- *Gammarus fossarum* p 158
a- Résultats des biotests sur sédiments contaminés avec *G. fossarum* p 158
b- Bilan des tests avec *G. fossarum* sur sédiments contaminés p 167
2- *Chironomus riparius* p 168
a- Résultats des biotests sur sédiments contaminés avec *C. riparius* p 168
b- Bilan des tests avec *C. riparius* sur sédiments contaminés p 174
3- *Potamopyrgus antipodarum* p 175
a- Résultats des biotests sur sédiments contaminés avec *P. antipodarum* p 175

b- Bilan des tests avec *P. antipodarum* sur sédiments contaminés p 182
4- Synthèse des résultats obtenus sur sédiments naturels contaminés p 183
II- Sédiment dopé en cadmium p 186
1- Choix des concentrations de dopage p 186
2- Efficacité du dopage p 187
3- Résultats des biotests p 189
a- Comparaison des sédiments dopés avec le témoin non dopé p 192
b- Comparaison des réponses obtenues sur sédiments dopés avec la gamme de réponse définie sur sédiments de référence p 194
4- Discussion p 202
III- Interprétation des résultats et sélection des traits p 205

Chapitre 6 **Discussion générale** p 211
I- La démarche p 214
1- Intérêt des tests d'écotoxicité p 214
2- Choix et complémentarité des organismes de test p 215
3- Comparaison de notre méthode avec les méthodes existantes pour tester la toxicité des sédiments p 216
II- Intégration dans une démarche d'évaluation du danger p 219
III- Conclusions p 222
IV- Perspectives p 223

Bibliographie p 225
Annexes p 245

Liste des valorisations associées

ARTICLES :

Avec comité de lecture:

- A. Dabrin, C.L. Durand, J. Garric, O. Geffard, B.J.D. Ferrari, M. Coquery (2012) Coupling geochemical and biological approaches to assess the availability of cadmium in freshwater sediment. *Science of the Total Environment* 424: 308-315.

Sans comité de lecture:

- C.L. Durand, R. Mons, M. Coquery, A. Chaumot, O. Geffard, J. Garric, B.J.D. Ferrari (2011) Développement d'une batterie de biotests sur sédiments d'eau douce. *École Doctorale RP2E, Nancy, France.*

POSTERS :

Colloques nationaux:

- C. Durand, B. Ferrari, R. Mons, O. Geffard, J. Garric (2009) Development of a new biotest battery for the hazard assessement of contaminated sediment. *Adebiotech national meeting 10/20-22 2009, Romainville, France.*
- C. Durand, B.Ferrari, R. Mons, O. Geffard, J. Garric (2011) Développement d'une batterie de biotests pour l'évaluation du risqué associé aux sédiments contaminés. *RP2E doctoral school annual meeting 01/20, Nancy, France.*

Colloques internationaux:

- C. Durand, B.Ferrari, R. Mons, O. Geffard, J. Garric (2009) Development of a new biotest battery for the hazard assessement of contaminated sediment. *International Symposium on Toxicity Assessment 14th meeting 08/30-09/04 2009, Metz, France.*
- R. Charlatchka, M. Grote, J.F. Férard, K. Burga, C. Durand, J. Garric, B. Ferrari, O. Geffard (2009) DIESE : an ongoing French research program developing diagnostic tools for sediment ecotoxicity assessment. *Aquatic Toxicity Workshop 09/27-30, La Malbaie, Québec.*
- A. Dabrin, M. Coquery, C. Durand, O. Geffard, J. Garric, B.J.D. Ferrari (2011) Assessment of trace metals bioavailability in contaminated sediments by means of Diffusive Gradient in Thin films (DGT): confrontation with trace metal bioaccumulation in benthic organisms. *4^{-th} International Passive Sampling Workshop and Symposium, 05/11-05/14/2011, Krakow, Poland.*
- C L Durand, R Mons, A Dabrin, M Coquery, O Geffard, A Chaumot, J Garric, B J D Ferrari (2011) Responses of a battery of macroinvertebrates bioassays for the hazard assessment of sediments: approach integrating the natural variability of the organism life-traits. *International Symposium on Toxicity Assessment 15th meeting 07/02-07/09 2011, Hong Kong, China SAR.*

COMMUNICATIONS ORALES :

Colloques internationaux:

- C. Durand, A. Dabrin, O. Geffard, J.L. Roulier, M. Coquery, J. Garric, B.J.D. Ferrari (2010) Coupling geochemical and biological approaches to assess the availability of cadmium in a natural sediment. *m^3-life (modelling management monitoring) workshop 06/16-17, Luxembourg, Luxembourg*.

Liste des abréviations

ACP	Analyse en composantes principales
ANOVA	Analyse de variance
As	Arsenic
BPA	Bisphénol A
Cd	Cadmium
CMR	Cancérigène Mutagène Reprotoxique
Co	Cobalt
COC	Carbone organique colloïdal
COD	Carbone organique dissout
COP	Carbone organique particulaire
Cr	Chrome
Cu	Cuivre
CV	Coefficients de variation
DCE	Directive cadre sur lœau
EDF	Electricité de France
EdR	Evaluation des risques
EDTA	Acide éthylènediaminotétraacétique
EE	Ethinylestradiol
ERL	Effect range low - Rang d'effet bas
ERM	Effect range median - Rang d'effet médian
Fe	Fer
FOS	Mélange dœune eau de forage naturelle avec de lœau osmosée
HAP	Hydrocarbures aromatiques polycycliques
HCB	Hexachloro benzène
Hg	Mercure
HHCB	1,3,4,6,7,8-hexahydro-4,6,6,7,8,8-hexamethylcyclopenta[g]-2-benzopyran
IC50	Concentration dœimpact 50 %
IC95	Intervalles de confiance à 95 %
INRA	Institut National de le Recherche Agronomique
LOI	Perte au feu
MES	Matières en suspension
Mn	Manganèse
MO	Matière organique
Ni	Nickel
NOEC	No observed effect concentration - Concentration observée sans effet
NP	Nonyl phénol
NQE	Norme de qualité environnementale
ONEMA	Office National de l'Eau et des Milieux Aquatiques
OP	Octyl phenol
P95	Percentiles 95 %

Pb	Plomb
PCB	Polychlorobiphényles
PEC	Probable effect concentration - Concentration à effet probable
PEL	Probable effect level - Niveau à effet probable
ph	Poids humide
ps	Poids sec
SHE	Electrode hydrogène standard
SR	Seuils référentiels
STEP	Station dœpuration
TBT	Tributyletain
TEC	Threshold effect concentration - Concentration seuil dœffet
TEL	Threshold effect level - Niveau seuil dœffet
TPT	Triphenyletain
UFT	Ultrafiltration tangentielle
UV	Ultraviolet
Zn	Zinc

Liste des figures

Chapitre 1			
Figure I-1	Diagramme triangulaire de classification des sédiments en fonction de leur texture	p	14
Figure I-2	Principaux processus de contrôle de la répartition des contaminants dans un sédiment	p	18
Figure I-3	Equilibre de partition des contaminants	p	25
Figure I-4	Répartition géographique de *Gammarus fossarum* en Europe	p	31
Figure I-5	Vue latérale d'un *Gammaridae*	p	32
Figure I-6	Clé de détermination de *G. fossarum*	p	34
Figure I-7	Illustration d'un précopula de *Gammarus fossarum*	p	35
Figure I-8	Caractérisation du cycle de mue chez la femelle *G. fossarum*	p	37
Figure I-9	Caractérisation du développement embryonnaire en corrélation avec le cycle de mue de la femelle *G. fossarum*	p	37
Figure I-10	Schéma simplifié du cycle de vie de *C. riparius*	p	39
Figure I-11	Masse d'œufs de *Chironomus sp.*	p	40
Figure I-12	Morphologie simplifiée des larves de chironome	p	41
Figure I-13	Morphologie simplifiée des nymphes de chironome	p	41
Figure I-14	Morphologie simplifiée des imagos mâles de chironome	p	42
Figure I-15	Vue générale de *P. antipodarum*	p	45
Figure I-16	Anatomie générale d'une femelle *P. antipodarum*	p	46
Chapitre 2			
Figure II-1	Prélèvement de sédiment à la benne et tamisage	p	58
Figure II-2	Coulter LS-100	p	59
Figure II-3	Dopage du sédiment de référence en Cd	p	63
Figure II-4	Prélèvement au troubleau et tamisage des gammares	p	64
Figure II-5	Système de stabulation des gammares au laboratoire	p	65
Figure II-6	Système d'élevage des chironomes au laboratoire	p	66
Figure II-7	Matériel d'exposition et de renouvellement de l'eau	p	68
Figure II-8	Exemple de surfaces folliaires numérisées	p	73
Figure II-9	Embryons *P. antipodarum* sortis de la poche embryonnaire d'une femelle	p	77
Figure II-10	Méthode de vérification de l'influence des caractéristiques géochimiques des sédiments sur les réponses les critères de mesure biologiques	p	81
Figure II-11	Méthodes de calcul des seuils référentiels de réponse (SR) en conditions de référence	p	83
Figure II-12	Démarche statistique employée pour la définition des seuils de référence en conditions de référence auxquels seront confrontées les réponses obtenues sur sédiments contaminés	p	86
Chapitre 3			

Figure III-1	Méthode d'évaluation de la qualité des sédiments	p 93
Figure III-2	Localisation géographique des sites de prélèvement selon l'occupation des sols en France	p 95
Figure III-3	Représentation par une ACP des principales caractéristiques géochimiques (texture, AVS, LOI, C/N et carbonates) des deux catégories de sédiments	p 108
Figure III-4	Représentation par une ACP des principales caractéristiques géochimiques (texture, AVS, LOI, C/N et carbonates) et de la contamination (métaux, PCB et HAP).des sédiments de références et contaminés	p 109
Figure III-5	Schéma organisationnel des cinq séries d'expérimentation	p 119
Chapitre 5		
Figure V-1	Résultats des tests de reproduction des adultes *G. fossarum* exposés aux sédiments contaminés positionnés par rapport à la moyenne et aux seuils de référence minimum et maximum	p 162
Figure V-2	Résultats des tests d'alimentation des mâles adultes *G. fossarum* exposés aux sédiments contaminés positionnés par rapport à la moyenne et aux seuils de référence minimum et maximum	p 164
Figure V-3	Résultats des tests de croissance des juvéniles *G. fossarum* exposés aux sédiments contaminés positionnés par rapport à la moyenne et aux seuils de référence minimum et maximum	p 166
Figure V-4	Résultats des tests de croissance des larves *C. riparius* exposés aux sédiments contaminés positionnés par rapport à la moyenne et aux seuils de référence minimum et maximum	p 172
Figure V-5	Résultats des tests d'émergence des larves *C. riparius* exposés aux sédiments contaminés positionnés par rapport à la moyenne et aux seuils de référence minimum et maximum	p 173
Figure V-6	Résultats des tests de reproduction des adultes *P. antipodarum* exposés aux sédiments contaminés positionnés par rapport à la moyenne et aux seuils de référence minimum et maximum	p 179
Figure V-7	Résultats des tests de croissance des juvéniles P. antipodarum exposés aux sédiments contaminés positionnés par rapport à la moyenne et aux seuils de référence minimum et maximum	p 181
Figure V-8	Concentrations de dopage en cadmium par rapport à la distribution des concentrations en Cd dans les sédiments français	p 187
Figure V-9	Rendements des dopages en Cd	p 188
Figure V-10	Résultats des tests de reproduction des adultes *G. fossarum* exposés aux sédiments dopés positionnés par rapport à la moyenne et aux seuils de référence minimum et maximum	p 195
Figure V-11	Résultats des tests d'alimentation des mâles adultes *G. fossarum* exposés aux sédiments dopés positionnés par rapport à la moyenne et aux seuils de référence minimum et maximum	p 196

Figure V-12 Résultats des tests de croissance des juvéniles *G. fossarum* exposés aux sédiments dopés positionnés par rapport à la moyenne et aux seuils de référence minimum et maximum p 197

Figure V-13 Résultats des tests de croissance des larves *C. riparius* exposés aux sédiments dopés positionnés par rapport à la moyenne et aux seuils de référence minimum et maximum p 198

Figure V-14 Résultats des tests d'émergence des larves *C. riparius* exposés aux sédiments dopés positionnés par rapport à la moyenne et aux seuils de référence minimum et maximum p 199

Figure V-15 Résultats des tests de reproduction des adultes *P. antipodarum* exposés aux sédiments dopés positionnés par rapport à la moyenne et aux seuils de référence minimum et maximum p 200

Figure V-16 Résultats des tests de croissance des juvéniles P. antipodarum exposés aux sédiments dopés positionnés par rapport à la moyenne et aux seuils de référence minimum et maximum p 201

Chapitre 6

Figure VI-1 Effet des contaminants à travers les différents niveaux d'organisation biologique p 220

Liste des tableaux

Chapitre 1		
Tableau I-1	Systématique de *G. fossarum*	p 30
Tableau I-2	Systématique de *C. riparius*	p 38
Tableau I-3	Systématique de *P. antipodarum*	p 43
Tableau I-4	Revue non exhaustive de lôutilisation de *G. fossarum*, et dôautres espèces de crustacés amphipodes, en écotoxicologie appliquée à lôévaluation de toxicité des sédiments	p 48
Tableau I-5	Utilisation de *C. riparius* en écotoxicologie appliquée à lôévaluation de toxicité des sédiments	p 50
Tableau I-6	Utilisation de *P. antipodarum* en écotoxicologie appliquée à lôévaluation de toxicité des sédiments	p 52
Chapitre 2		
Tableau II-1	Récapitulatif des conditions de test	p 79
Chapitre 3		
Tableau III-1	Présentation des huit sédiments de référence	p 96
Tableau III-2	Notes obtenues pour cinq indices hydrobiologiques sur les stations de la banque hydro France les plus proches des points de prélèvement des sédiments	p 98
Tableau III-3	Provenance des sédiments contaminés	p 101
Tableau III-4	Caractérisation géochimique des sédiments de référence pour leur contenu en MO (perte au feu ; C/N), leur taux dôhumidité, leur texture, leur contenu en carbonates de calcium, leur pH, leur Eh et leur contenu en AVS	p 103
Tableau III-5	Statistiques descriptives pour la granulométre des sédiments en France	p 104
Tableau III-6	Caractérisation géochimique des sédiments contaminés pour leur contenu en MO (perte au feu ; C/N), leur taux dôhumidité, leur texture, leur contenu en carbonates de calcium, leur pH, leur Eh et leur contenu en AVS	p 106
Tableau III-7	Contenu en métaux, PCB et HAP des sédiments sélectionnés comme référence	p 110
Tableau III-8	Contenu en métaux, PCB et HAP des sédiments sélectionnés comme contaminés	p 111
Tableau III-9	Statistiques descriptives pour les contaminants organiques et les métaux dans les sédiments en France	p 112
Tableau III-10	Exemple de situation des niveaux de contamination de deux sédiments échantillonnés lôun en tant que référence et lôautre en tant que contaminé, par rapport aux sédiments français	p 113

Tableau III-11	Grille des valeurs attribuées à un sédiment suivant sa position dans le contexte français pour un contaminant donné	p 11
Tableau III-12	Couleur attribuée aux sédiments échantillonnés en fonction de leur position par rapport aux sédiments français et légende du code couleur	p 114
Tableau III-13	TEC et PEC disponibles	p 115
Tableau III-14	Couleur attribuée aux sédiments échantillonnés en fonction de leur $Q_{PEC}m$ et légende du code couleurs	p 116
Chapitre 4		
Tableau IV-1	Résultats obtenus pour chaque trait testé sur le crustacé *G. fossarum* et SR obtenus	p 131
Tableau IV-2	Résultats obtenus pour chaque trait suivi chez lôinsecte *C. riparius* et SR obtenus	p 139
Tableau IV-3	Résultats obtenus pour chaque trait suivi chez le mollusque *P. antipodarum* et SR obtenus	p 147
Tableau IV-4	Fécondité moyenne au début des tests des lots de *P.antipodarum* utilisés lors des tests sur sédiments de référence	p 145
Chapitre 5		
Tableau V-1	Résultats des tests de reproduction, alimentation et croissance de *G. fossarum* lors des expositions aux sédiments naturels contaminés	p 159
Tableau V-2	Résultats des tests de croissance et émergence de *C. riparius* lors des expositions aux sédiments naturels contaminés	p 169
Tableau V-3	Résultats des tests de reproduction et croissance de *P. antipodarum* lors des expositions aux sédiments naturels contaminés	p 176
Tableau V-4	Bilan des tests effectués, critère par critère, pour les trois espèces	p 185
Tableau V-5	Concentrations en Cd dosées dans les sédiments dopés ainsi que dans les eaux superficielles et interstitielles	p 188
Tableau V-6	Résultats des tests de reproduction, alimentation et croissance de *G. fossarum* lors des expositions aux sédiments dopés	p 190
Tableau V-7	Résultats des tests de croissance et émergence de *C. riparius* lors des expositions aux sédiments dopés	p 190
Tableau V-8	Résultats des tests de reproduction et croissance de *P. antipodarum* lors des expositions aux sédiments dopés	p 191
Tableau V-9	Résultats des tests statistiques effectués pour vérifier lôexistence de relations dose-réponse pour les tests sur sédiments dopés en cadmium	p 193
Tableau V-10	Tests sélectionnés pour constituer la batterie parmi ceux développés au cours de ce travail de thèse	p 205
Tableau V-11	Notes obtenues pour les sédiments naturellement contaminés testés pour au moins un trait de chacune des trois espèces	p 206
Tableau V-12	Classement des sédiments du plus toxique au moins toxique	p 207

Chapitre 6

Tableau VI-1 Synthèse des travaux de thèse, moyens mis en î uvre, résultats et conclusions p 222

Introduction

1 Contexte

Les écosystèmes aquatiques continentaux sont une ressource précieuse et constituent donc logiquement lôune des cibles essentielles des politiques nationales et européennes de protection et de gestion des ressources, notamment au travers de la Directive Cadre sur lôEau : DCE (European Community, 2000). Lôadoption de la DCE par les états membres européens vise à atteindre le bon état chimique et écologique des masses dôeau dôici 2015.

Lôaugmentation permanente des activités anthropiques (urbanisation, industrialisation, pratiques agricoles intensives) est associée à une forte expansion des rejets de substances chimiques dans lôenvironnement. Plus de 100000 molécules chimiques sont ainsi retrouvées dans lôenvironnement (Depledge et Galloway, 2005). Le milieu aquatique est le réceptacle final dôun grand nombre de ces composés, et en particulier le compartiment sédimentaire (Karickhoff et al., 1979; Jain et Ram, 1997; Wen et al., 1998). Les sédiments sont un élément essentiel car ils constituent des sites privilégiés pour l'accumulation des éléments polluants, *via* les dépôts des matières en suspension (MES). Les MES se comportent comme de véritables "pièges" au sein de la colonne d'eau. Par ailleurs, les sédiments abritent une faune qui assure des fonctions essentielles (ex : décomposeurs) au bon fonctionnement écologique des milieux aquatiques. Pour ces organismes les sédiments représentent une source dôexposition aux contaminants et jouent un rôle important dans leur intoxication. Il est donc important de surveiller, évaluer et protéger le compartiment sédimentaire.

Les sédiments en place représentent aujourdôhui une vraie question pour les gestionnaires de cours dôeau ou de retenues. Par exemple, une forte accumulation devant un ouvrage hydro-électrique, peut devenir un obstacle à son bon fonctionnement. Il devient nécessaire dôévacuer les sédiments. Pour cela il est notamment possible dôeffectuer un lâcher de sédiment, mais en cas de toxicité du sédiment, la remise en suspension des particules et des contaminants peut-avoir un effet dévastateur pour les communautés à lôaval. Le sédiment peut également être curé mécaniquement (évacuation à la pelleteuse) et éventuellement traité, mais ces méthodes ont un coût non négligeable. Il est donc nécessaire dôêtre capable dôévaluer le risque (éco)toxique lié à ces sédiments.

Ainsi, le compartiment sédimentaire fait lôobjet de nombreuses études visant à caractériser le risque toxique que représente un sédiment brut en place ou remis en suspension.

Les premières études ont été axées sur lôanalyse physico-chimique des sédiments, afin de détecter la présence de contaminants et leurs concentrations (Karickhoff et al., 1979; Santschi, 1988; Förstner, 1990). Dans un second temps des biomarqueurs et bioindicateurs de terrain ainsi que des bioessais de laboratoire ont été développés pour évaluer la biodisponibilité des contaminants (EPA, 2000; Bervoets et al., 2004; Gaskell et al., 2007) ainsi que leur potentiel toxique vis-à-vis dôorganismes pouvant être affectés par une contamination sédimentaire (Milani et al., 2003; Antunes et al., 2007; Mazurova et al., 2008; AFNOR, 2010).
Cependant, les méthodes disponibles actuellement ne prennent pas ou peu en compte lôimpact des propriétés géochimiques des sédiments sur la biologie des organismes.

2 Problématique

La réponse biologique des organismes exposés à des sédiments, est la conséquence des effets conjoints entre la géochimie du sédiment et les concentrations en toxiques. Ces interactions seront à la fois dôordre chimique, en terme de biodisponibilité des contaminants, mais également dôordre biologique, puisque lôhabitat est un facteur important du développement des organismes. En effet, les traits de vie des organismes sont sensibles aux caractéristiques bio-géochimiques de leur milieu, telles que la granulométrie (Suedel et Rodgers Jr, 1994; Naylor et Rodrigues, 1995; Ristola et al., 1999), la quantité et la qualité de la matière organique présente (Vos et al., 2000; Dorgelo et Leonards, 2001; Pery et al., 2003) qui sont susceptibles de modifier lôexpression de certains traits de vie des espèces (chironomidés, gastéropodes).

Pour évaluer la toxicité dôun sédiment vis-à-vis dôorganismes il est nécessaire dôavoir un sédiment de référence, aux caractéristiques comparables à celles du sédiment testé pour pouvoir comparer les réponses obtenues. Deux types de témoins sont couramment utilisés lors des tests sur sédiments. Il sôagit soit de sédiments naturels peu contaminés, soit de sédiments reconstitués en laboratoire (Roman et al., 2007; Tuikka et al., 2011).

Lôutilisation de sédiments reconstitués présente lôavantage dôêtre reproductible pour chaque expérimentation, mais un tel sédiment est géochimiquement très différent dôun sédiment naturel (Forster, 1996; Ciutat et Boudou, 2003).

Toutefois, un sédiment contrôle naturel est différent dôun test à lôautre (nouveau prélèvement) et donc non reproductible mais il peut présenter lôavantage dôêtre géochimiquement plus proche des caractéristiques du sédiment naturel à tester. Cependant lôhétérogénéité très importante des caractéristiques géochimiques, même à petite échelle (par exemple sur une station de prélèvement de quelques m²) rend délicate, voire impossible la mise en î uvre dôun système expérimental permettant de comparer sédiment témoin / sédiment contaminé. Il est en effet souvent impossible de disposer dôun sédiment de référence, naturel (station amont dôune contamination par exemple) ou reconstitué, aux caractéristiques strictement comparables à celles du sédiment contaminé que lôon souhaite tester.

Ainsi une différence de réponse dôun organisme observée entre un sédiment contrôle et le sédiment contaminé testé, géochimiquement différents, même à un faible degré, ne peut pas être strictement associée à la présence de contaminants dans le sédiment testé.

Différentes méthodes pour évaluer la toxicité des sédiments sont proposées dans la littérature. Le plus souvent elles concernent la mesure dôeffet sur des organismes sélectionnés, au moyen de tests eau-sédiment mono spécifiques (EPA, 2000; ASTM, 2002). Cependant chaque espèce présente des caractéristiques biologiques et écologiques qui lui sont propres, impliquant des sensibilités variées aux contaminants (Ducrot et al., 2006; Roman et al., 2007). La diversité faunistique ne peut donc pas être représentée par une seule espèce. Ainsi, la nécessité de développer des batteries de biotests a été mise en avant dans plusieurs études (Milani et al., 2003; Roman et al., 2007). Si les organismes sont choisis pour représenter la diversité naturelle dôune communauté benthique de manière aussi exhaustive que possible (espèces avec différents niveaux trophiques ou habitats etc.) (Cairns et al., 1996; Sànchez et Tarazona, 2002; Milani et al., 2003; Tuikka et al., 2011), cela permet de couvrir les différentes voies dôexposition possibles, et diverses sensibilités aux composés chimiques (Ducrot et al., 2006).

Des tests plus complexes ont été proposés comme par exemple des essais plurispécifiques en microcosmes (Triffault-Bouchet et al., 2005). Lôutilisation simultanée de plusieurs organismes (crustacés, algues, insectes etc.) permet dôintégrer les possibles interactions entre eux. Cependant ces mêmes interactions peuvent être une source de biais pour lôinterprétation des résultats qui peut donc sôavérer délicate. Une option intermédiaire consiste donc à utiliser une batterie de tests mono-spécifiques qui permet de prendre en compte les différences de

sensibilité entre taxa et dôobserver les effets directs du toxique sur chaque espèce en simplifiant lôinterprétation des résultats (pas dôinteraction inter-spécifique).

Une évaluation du risque passe par des biotests utilisant à la fois des mesures de mortalité et des mesures dôeffets sub-létaux sur des traits de vie importants pour les dynamiques des populations (comme la reproduction ou la croissance). En effet, un toxique peut avoir des effets variables sur un organisme, pouvant aller jusquôà la mort. Cependant même si le toxique nôest pas létal, ses effets peuvent sôavérer délétères pour une population, par exemple, en diminuant significativement le taux de reproduction des adultes. Côest dôailleurs sur des critères sub-létaux que sont calculées les valeurs seuils dôeffet toxique de type TEC et PEC (MacDonald et al., 2000).

Malgré lôexistence de nombreuses méthodes standardisées et utilisant des espèces variées comme des insectes : *Hexagenia spp.* (ASTM, 2005), *Chironomus sp.* (ASTM, 2005; AFNOR, 2010) ; des crustacés *Daphnia magna* (ASTM, 2005), *Ceriodaphnia dubia* (ASTM, 2005), *Diporeia spp*. (ASTM, 2005), *Hyallela azteca* (EPA, 2000; ASTM, 2003; ASTM, 2005) ; et des annélides : *Tubifex tubifex* (ASTM, 2005), aucune ne prend en compte à la fois la variabilité naturelle des réponses liée aux propriétés géochimiques des sédiments et la nécessité dôêtre représentative de la diversité biologique des macroinvertébrés dôeau douce. Par exemple il nôexiste aucun test normalisé sur mollusque ou amphipode européen.

Lôobjectif de ce travail de thèse est de fournir un outil de diagnostic fiable pour lôévaluation du risque toxique associé aux sédiments contaminés. Il sôagit donc de développer et dôadapter des biotests prenant en compte à la fois la diversité faunistique et la diversité des caractéristiques intrinsèques des sédiments.

3 Démarche mise en œuvre

Afin de répondre à lôobjectif précédemment défini, une batterie de tests monospécifiques représentant au mieux la diversité faunistique européenne a été mise en place.
Trois espèces de macroinvertébrés communément trouvés dans les eaux douces européennes ont été sélectionnées. Les espèces ont été choisies pour leur différences biologiques et écologiques (Tachet et al., 2000; Usseglio-Polatera et al., 2000) ainsi que pour leur appartenance à différents phylla : *Chironomus riparius* (insecte chironomidé), *Potamopyrgus*

antipodarum (mollusque gastropode) et *Gammarus fossarum* (crustacé amphipode). Ces espèces sont également connues pour leurs différences de sensibilité aux contaminants (Triffault-Bouchet et al., 2005; Roman et al., 2007). Les traits de vie testés ont été sélectionnés pour être en relation avec la dynamique des populations et sont les suivants :

- Croissance et émergence de *C. riparius*,
- Croissance et reproduction de *P. antipodarum*
- Croissance, alimentation et reproduction de *G. fossarum*

L'élaboration de la batterie s'est ensuite déroulée en deux étapes, pour tenter d'aboutir à la proposition d'une batterie réduite de tests et de mesures les plus appropriées à l'évaluation de la toxicité des sédiments.

1) La première étape a consisté au développement des biotests et à la définition des référentiels de réponses pour chaque critère sélectionné pour les trois organismes. Pour cela nous avons défini la variabilité de réponse naturelle des traits en conditions de références. Il s'agit d'une alternative à l'utilisation de sédiments contrôles naturels ou reconstitués. Cette méthode consiste à caractériser la plasticité naturelle des traits de vie des organismes lorsqu'ils sont exposés à un panel de sédiments pas ou peu contaminés et présentant des caractéristiques géochimiques variées. La caractérisation de l'amplitude des réponses biologiques associées aux caractéristiques biogéochimiques variables des sédiments permettra par la suite, l'interprétation des réponses sur des sédiments contaminés en s'affranchissant d'un contrôle.

   Ainsi, la gamme de réponse en condition pas ou peu contaminée a été déterminée pour chaque espèce et chaque trait de vie sélectionné. Pour cela un panel de huit sédiments contrôle, présentant des propriétés géochimiques très différentes, ont été testés. Les expérimentations ont été menées sur les trois espèces en parallèle.

2) La seconde étape a consisté à appliquer la batterie de biotests sur des sédiments contaminés pour évaluer la capacité de chaque trait à discriminer les sédiments contaminés des sédiments contrôles. Ceci permet de distinguer un effet toxique inhérent à une pollution de l'adaptation naturelle des organismes à leur habitat (Höss et al., 2010), telle que caractérisée lors de l'étape précédente.

Dans un second temps, notre méthodologie multi-espèces et multi-traits a été appliquée à un nouveau panel de sédiments présentant une typologie de contamination variée. L'objectif de cette étape était de tester les capacités discriminantes de notre batterie de tests, et de caractériser la dangerosité de sédiments plus ou moins contaminés, pour un panel de macroinvertébrés benthiques.

Ce document se structure en 6 chapitres. Le chapitre 1 constitue un état des lieux des connaissances relatives aux sédiments et à l'étude de leur toxicité. Ce chapitre présente également les trois espèces sélectionnées pour développer la batterie de bioessais. Le chapitre 2 détaille les matériels et méthodes mis en î uvre pour la réalisation des expérimentations nécessaires pour atteindre les objectifs précédemment décrits. Le chapitre 3 présente les sédiments testés. Les résultats obtenus lors des expérimentations sur sédiments de référence pour la définition des référentiels de réponse sont présentés et discutés dans le chapitre 4, organisme par organisme et trait de vie par trait de vie. Le chapitre 5 présente les résultats obtenus lors de l'application de la batterie de biotests à des sédiments contaminés. Il s'accompagne d'une discussion spécifique à chaque test. Enfin le chapitre 6 discute plus généralement des résultats de la batterie de tests mise en place dans son ensemble et propose une sélection des tests les plus appropriés à l'évaluation de la toxicité des sédiments.

Chapitre 1

Etat de l’Art

Ce chapitre a pour objectif dôétablir un bilan des connaissances actuelles concernant les sédiments et les méthodes dôévaluation de leur toxicité.

Dans un premier temps, nous allons traiter des caractéristiques géochimiques des matrices sédimentaires telles que leur contenu en matière organique ou leur granulométrie, ainsi que leur contamination. Dans un second temps nous ferons un bilan des méthodes existantes pour lôévaluation de la toxicité des sédiments. Enfin, le troisième volet fera un résumé des connaissances concernant le matériel biologique utilisé dans ce travail de thèse.

I Les caractéristiques sédimentaires

1 Définition et rôle

Un sédiment se constitue par le dépôt de matières en suspension (MES) minérales et organiques contenues dans la colonne dôeau. Les dépôts sont issus des phénomènes dôérosion des berges, sols, des roches ainsi que des matériaux détritiques organiques, par des agents dynamiques externes comme lôeau ou le vent. Ils peuvent également provenir de remise en suspension des sédiments des rivières suite à des variations dôécoulement (Taylor et Owens, 2009). Leur composition est donc principalement liée à la constitution des sols et aux caractéristiques du couvert végétal. Les dépôts sont dits dôorigine autochtone quand ils sont apportés par la précipitation de composés minéraux (carbonates, phosphatesé) et organiques (débris végétaux, algues planctoniques mortesé) (Ramade, 1998). Ces particules peuvent être de taille variable. Dans le cadre de ce travail de thèse nous retiendrons la définition du groupe de travail sur lôanalyse et le suivi des substances prioritaires (AMPS) de la Directive Cadre européenne sur lôEau (DCE), côest-à-dire : « matériel particulaire tel que le sable, le limon, les argiles ou la matière organique (MO) qui a été déposé sur le fond des masses dôeau et qui est susceptible dôêtre transporté par lôeau » (Stronkhorst et al., 2004).

Le compartiment sédimentaire abrite une large diversité dôorganismes estimée dans les sédiments de la surface du globe à plus de 100 000 espèces dôinvertébrés benthiques, 10 000 espèces dôalgues et 20 000 espèces de protozoaires et de bactéries (Palmer et al., 2000). Ils ont ainsi un rôle majeur associé au maintien de la qualité de lôeau, au processus de décomposition de la MO et à la production primaire. La macrofaune bioturbatrice favorise la minéralisation de la MO accumulée dans les sédiments et permet notamment un bon fonctionnement des cycles du carbone, de lôazote et du phosphore. En plus de leur rôle fondamental dans le fonctionnement hydrologique et géomorphologique des cours dôeau, en périodes de crues, les sédiments constituent des apports en limons fertilisants essentiels au fonctionnement des plaines alluviales (Förstner et Salomons, 2010).

2 Composition et structure

Les sédiments peuvent être caractérisés par leur structure granulométrique et leur composition. Un sédiment est une matrice hétérogène, principalement composée de matériaux détritiques organiques et minéraux et dôeau (Power et Chapman, 1992; Simpson et al., 2005).

- La phase minérale ou inorganique est constituée par des particules issues de lôérosion de lôécorce terrestre ainsi que de débris minéraux issus dôorganismes vivants (tels que des coquilles). Ses composés principaux sont les carbonates, les silicates (et argiles), les oxydes de fer, les phosphates et les sulfures (Hakanson et Jansson, 1983; Ramade, 1998).
- La phase organique ne représente que quelques pourcents du sédiment mais est un élément essentiel de par son rôle trophique. De plus, les différentes molécules (acides humiques et fulviques, protéines, polysaccharides et lipides) qui constituent la MO possèdent à la fois des sites hydrophiles et hydrophobes qui leur permettent de sôadsorber sur les particules minérales et de complexer plusieurs types de contaminants (Santshi et al., 1999). La MO est donc un facteur de régulation de la mobilité et donc de la biodisponibilité des contaminants (Kukkonen et Landrum, 1996; Razak et al., 1996). Selon sa taille, la MO est classée en carbone organique dissous (COD < 1 kDa), colloïdal (1 kDa < COC < 0,22 µm) et particulaire (COP > 0,22 µm) (Santshi et al., 1999).
- Lôeau interstitielle occupe les espaces entre les particules. Elle représente entre 20 et 90 % du volume dôun sédiment avec une teneur en eau dôautant plus importante que la texture de la matrice sédimentaire est fine (Campy et Meybeck, 1995).

La texture dôun sédiment peut impacter la biologie des organismes qui y vivent (Suedel et Rodgers Jr, 1994; Naylor et Rodrigues, 1995; Ristola et al., 1999). Ainsi, lôanalyse granulométrique des particules est un élément important de la caractérisation dôun sédiment. Les particules sont classées selon leur taille comme argiles (< 2 µm), limons (2 à 63 µm), et sables (> 63 µm). Cela permet de catégoriser les sédiments selon leurs proportions respectives des trois classes de taille des particules (Figure I-1).

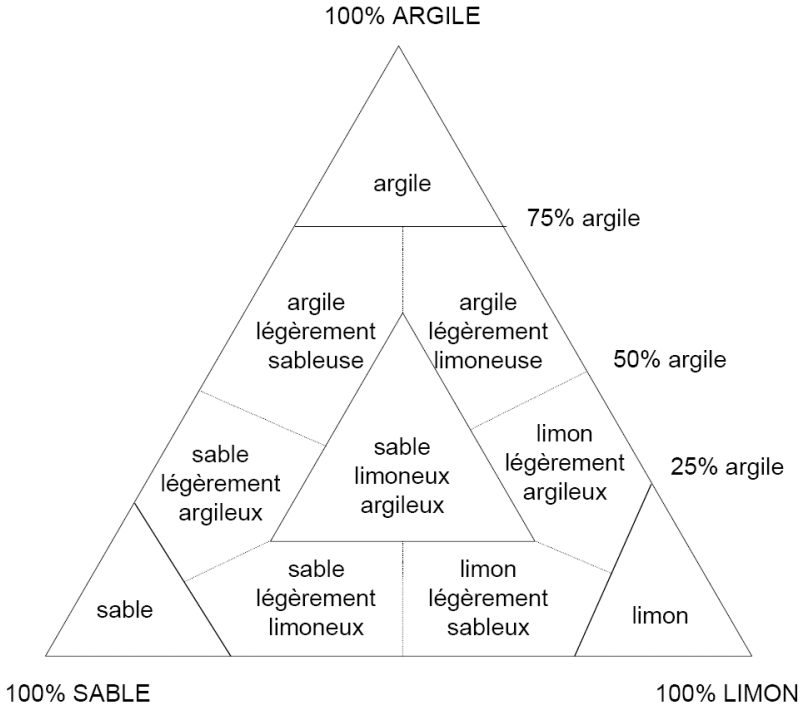


Figure I-1 : Diagramme triangulaire de classification des sédiments en fonction de leur texture, dôaprès Campy et Meybeck (1995).

Plusieurs autres critères permettent de caractériser les sédiments comme leur pH, leur potentiel dôoxydo-réduction (redox), leur teneur en oxygène et en sulfures. Ces paramètres peuvent impacter la répartition des contaminants entre les différentes phases du sédiment ainsi que leur biodisponibilité (Geffard, 2001).

3 Les contaminants

Le sédiment est un important compartiment des écosystèmes aquatiques. Il sert dôhabitat et de source de nourriture pour de nombreuses espèces écologiquement et économiquement importantes. Suivant sa composition et sa structure, ce compartiment peut fixer de nombreux contaminants (voir § précédent). Les sédiments ont, entre autres, une forte capacité dôadsorption des métaux et des hydrocarbures (Cairns et al., 1984) qui se lient préférentiellement aux particules fines (Estebe et al., 1997). La présence de xénobiotiques persistants dans les dépôts sédimentaires peut avoir des effets létaux immédiats ou à long terme pour les organismes en contact avec les sédiments. Si certains contaminants peuvent être naturellement présents dans lôenvironnement, un grand nombre sont dôorigine

anthropique (rejets industriels, domestiques). Parmi la multitude de composés retrouvés dans lôenvironnement, les métaux et les composés organiques que sont les polychlorobiphényles (PCB) et les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP), sont des contaminants majeurs dans lôenvironnement. Les concentrations en contaminants des sédiments sont souvent plus fortes que celles de lôensemble de la colonne dôeau (Chapman, 1992; Piol et al., 2006). En général, le stockage des contaminants dans les sédiments se produit dans les zones lentiques, le chenal des rivières et dans les plaines alluviales (Taylor et Owens, 2009). En outre, les réservoirs (barrages, retenues au fil de lôeau) sont des zones privilégiées dôaccumulation de contaminants et reflètent lôhistorique des pollutions issues des bassins versants. En France, en plus des 700 barrages supérieurs à 5 mètres, 60 000 seuils et petits barrages (inférieurs à 5 mètres) ont été référencés, dont seulement 30 % auraient un usage économique avéré (Malavoi et al., 2011). En interrompant la continuité écologique et donc le transport des sédiments, la présence de barrages induit un excès de sédiment à lôamont, mais aussi un déficit en aval. Le déficit en sédiment altère également le fonctionnement hydromorphologique et écologique des rivières en entrainant une incision du chenal, lôérosion des berges et une modification de la composition granulométrique du lit (Kondolf, 1997).
Ces sédiments constituent un danger latent, à une échelle locale (site dôaccumulation), mais aussi en aval. En effet, les contaminants stockés peuvent être remobilisés dans la colonne dôeau à diverses occasions et entrainés en aval (par exemple à lôoccasion de vidange ou dôeffacement de barrages), ce qui provoque des perturbations physiques et chimiques (Larsson, 1985; Asare et al., 2000; Coulthard et Macklin, 2003).

a. Les métaux

Lôorigine des métaux et métalloïdes présents dans les sédiments peut être naturelle (érosion du socle rocheux et des sols) mais est majoritairement anthropique (industrie). Parmi eux, 17 ont un caractère essentiel pour les organismes. Il sôagit de As, Ca, Cr, Co, Cu, Fe, K, Mg, Mn, Mo, Na, Ni, Se, Si, Sn, V et Zn (Mason et Jenkins, 1995). Cependant une augmentation des concentrations en métaux biodisponibles, même essentiels, peut aboutir à des effets toxiques. La biodisponibilité des métaux est conditionnée par leur répartition entre les différentes fractions des sédiments (spéciation) ainsi que par leur forme physico-chimique, libres ou complexés avec les ligands inorganiques comme les carbonates, ou organiques (COD ,COC, COP), comme les acides humiques et fulviques. Ils peuvent aussi être adsorbés sur les

hydroxydes de fer et de manganèse ou avec les ions sulfures, en particulier sulfures volatiles acides (AVS) (Di Toro et al., 1990; Geffard, 2001). Les formes libres ou ioniques sont souvent les plus toxiques (Campbell, 1995).

Parmi les métaux, le cadmium (Cd) est un des contaminants les plus problématiques dans lôenvironnement. De nombreux cas de pollution au Cd sont connus, comme par exemple sur la rivière du Lot (France). Il nôa pas de rôle biologique connu (Mason et Jenkins, 1995). Le Cd est considéré comme faisant partie des 10 métaux les plus préoccupants pour lôenvironnement (Islam et Tanaka, 2004). Ce métal est par ailleurs classé comme CMR (Cancérogène de catégorie 2 ; Mutagène de catégorie 3 et Reprotoxique de catégorie 3) selon la directive 67/548/CEE de lôunion européenne. Chez lôhomme, une intoxication au Cd peut également conduire à de graves insuffisances rénales (INERIS, 2011). Nous lôutiliserons comme contaminant modèle lors dôune expérimentation de dopage ayant pour objectif la comparaison de sensibilité des espèces modèles sélectionnées.

b. Les composés organiques

Les composés organiques sont nombreux et de nature variée (ex : hydrocarbures ; pesticides ; phénols ; perfluorés ; pharmaceutiquesé). Un grand nombre est synthétisé par lôhomme. Ces composés se répartissent entre lôeau et les particules. Dans la majorité des cas, le comportement de ces composés peut être correctement décrit par des coefficients de partage qui permettent dôévaluer leur répartition entre eau et particules.

Le coefficient de partage octanol / eau, ou K_{ow}, décrit la lipophilie des composés. Le coefficient K_{ow} est un rapport de concentration dôun composé (i) dissous à lôéquilibre dans le sovant n-octanol et lôeau. Il diminue quand la solubilité dans lôeau du composé augmente (Chiou et al., 1977). Plus le K_{ow} est grand, plus la capacité du composé à se solubiliser dans les lipides (et son adsorption sur la MO) est importante.

$$Kow = \frac{[\,]\,i\,/\,octanol}{[\,]\,i\,/\,eau}$$

Le coefficient de partage des produits organiques, mais également métalliques, mesurés entre l'eau et les particules est appelé K_p (Karickhoff et al., 1979). Le K_p du composé est d'autant plus grand que sa polarité est faible.

$$Kp\ (L / kg) = \frac{[\,]\,i\ /\ \text{sédiment}}{[\,]\,i\ /\ \text{eau}}$$

Les composés non polaires se lient principalement à la matière organique. Un coefficient de partage, le K_{oc}, normalisé par le carbone organique a donc été proposé (Karickhoff, 1984).

$$Koc\ (L / kg\ \text{de CO}) = \frac{[\,]\,i\ \text{sediment} / CO\ \text{sédiment}}{[\,]\,i\ /\ \text{eau}}$$

Etant donné la grande diversité des composés organiques, leurs cibles et leurs effets sont également très diversifiés. Ces molécules peuvent par exemple être génotoxiques (certains HAP) ou neurotoxiques (insecticides).

4 Interactions entre les sédiments et les contaminants

De par sa composition (phase organique ; phase minérale ; eau interstitielle), sa structure, sa fonction d'habitat et / ou de ressource alimentaire pour de nombreuses espèces, le sédiment est une matrice très complexe. Cette complexité combinée à l'extrême diversité des contaminants résulte en de nombreuses interactions entre la matrice sédimentaire, les organismes qui y vivent et les composés chimiques. Dans ce paragraphe, nous allons donc nous attacher à décrire les principales interactions entre sédiments et contaminants.

a. Répartition et mobilité des contaminants dans les sédiments

La répartition des contaminants entre les différentes composantes d'un sédiment est contrôlée par des processus physiques, chimiques et biologiques (Figure I-2).

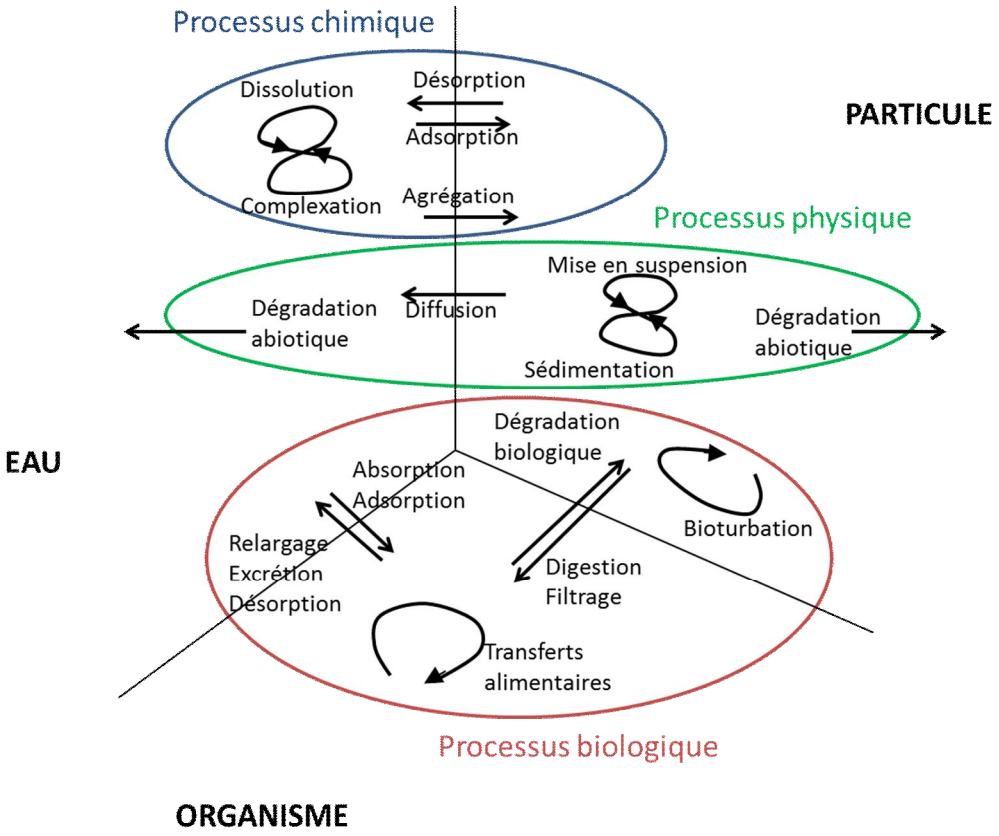


Figure I-2 : Principaux processus de contrôle de la répartition des contaminants dans un sédiment, dâaprès Förstner (1989) et Bonnet (2000).

Dans la phase aqueuse, les contaminants se trouvent sous forme dissoute ou complexée. Ces composés peuvent sâagréger et sédimenter ou sâadsorber à des particules, passant ainsi de la phase aqueuse à la phase particulaire. Le phénomène inverse peut également se produire grâce à des phénomènes de diffusion, de désorption ou de remise en suspension des particules qui modifient leur association avec les contaminants.

Les organismes vivants jouent également un rôle important dans la répartition des contaminants en modifiant leur environnement (bioturbation et dégradation). Ils peuvent également accumuler les contaminants par voie dâadsorption et absorption puis les relarguer dans le milieu (excrétion) ou les transmettre dans la chaîne alimentaire par voie trophique.

b. Mobilité des contaminants

Le passage des contaminants dâune forme à lâautre (dissous, complexé, adsorbéé) et dâun compartiment à lâautre (eau, particule, organisme) est contrôlé par des phénomènes

physiques, chimiques et biologiques. Nous allons détailler les principaux facteurs de contrôle physico-chimiques dans ce paragraphe :

- Le pH, qui dépend à la fois des activités biologiques et de la capacité du système à réagir comme un tampon. La réduction des sulfates (SO_4^{2-}) en sulfure (S^{2-}) conduit à une augmentation du pH. Inversement une réduction des nitrates (NO_3) en azote (N_2) conduit à une diminution du pH (Meyer et al., 1994). L'impact du pH sur les contaminants peut être illustré par l'exemple des métaux cationiques qui passent d'une forme dissoute à pH acide à une forme adsorbée ou précipitée lors d'une augmentation de pH (Bourg et Loch, 1995).
- Le potentiel d'oxydo-réduction, ou redox, (Eh) mesure la capacité d'oxydation ou de réduction d'une solution. Cela permet de déterminer la possibilité de mise en solution ou de précipitation de composés minéraux dans les sédiments (Ramade, 1998). C'est un facteur important de la mobilité des métaux. En effet, l'augmentation du potentiel redox entraine une oxydation des sulfures (AVS), qui ont un rôle important dans le piégeage des métaux, et leur libération dans l'eau interstitielle et surnageante (Perterson et al., 1996; Chapman et al., 1998; Zoumis et al., 2001).
- La dureté totale, c'est-à-dire la concentration en ions calcium (Ca^{2+}) et magnésium (Mg^{2+}), peut avoir une influence sur la disponibilité des contaminants par exemple via des phénomènes de co-précipitation d'ions métalliques (Gauss et al., 1985).
- De même, une augmentation de la conductivité entraine une mobilisation des métaux sédimentaires par compétition des ions magnésium et calcium avec les autres métaux sur les sites de fixation (Förstner et Wittmann, 1979; Lau et Chu, 1999; Rasmussen et Andersen, 1999).
- La proportion des phases minérales ou organiques dans un sédiment et les affinités des contaminants pour ces phases, conditionnent la répartition des contaminants en leur offrant un ensemble plus ou moins important de ligands.
- La granulométrie peut également impacter la répartition des contaminants. Par exemple, certains HAP s'associent préférentiellement aux particules fines. Leur mobilité et leur disponibilité diminue donc lorsque la fraction fine est importante (Geffard, 2001).
- La quantité de colloïdes joue également un rôle dans la répartition des contaminants. Par exemple, la concentration en PCB est corrélée à la teneur en colloïdes dans l'eau interstitielle (Brownawell et Farrington, 1986).

c. Interactions avec les organismes vivants

Les sédiments sont à la fois un abri, une source de nourriture ou encore des sites de pontes pour de nombreuses espèces. Leur qualité a donc un impact direct sur la faune. La fraction biodisponible des contaminants contenus dans les sédiments, est représentée par les composés qui peuvent entrer directement en contact avec les organismes et être absorbés. La biodisponibilité dôun composé chimique dépend non seulement des caractéristiques du sédiment (granulométrie, teneur en MO, etc..), des propriétés physico-chimiques du composé (spéciation), mais aussi de lôorganisme lui-même (habitat, mode alimentaire) (Förstner et Wittmann, 1979; Landrum et Robbins, 1990). Si les sédiments impactent la faune, elle aussi impacte les sédiments à travers divers processus. La bioturbation est définie comme un remaniement du sédiment par les organismes lorsquôils se déplacent, mangent, fabriquent leurs tubes et excrètent (Tessier et al., 1994; Perterson et al., 1996; Ciarelli et al., 1999; Ciarelli et Van Straalen, 2000). Lôactivité de la faune bioturbatrice influence la distribution verticale et la minéralisation de la MO, lôoxygénation du sédiment, les mouvements de solutés et les flux de composés dissous à lôinterface eau / sédiment (Welsh, 2003; Waldbusser et al., 2004), y compris les polluants. Lôimportance des modifications de ces flux a été montrée en milieu marin, où les phénomènes de bioturbation augmentaient de 2 à 25 fois lôimportance des flux à lôinterface eau-sédiment (Pratihary et al., 2009). Plusieurs études se sont intéressées aux flux de métaux. Il a été montré que leur répartition verticale dans les sédiments (Petersen et al., 1998; Banta et Andersen, 2003), ainsi que leurs coefficients de partition entre les phases solides et dissoutes (Vale et Sundby, 1998) sont étroitement liée à la bioturbation. Lôactivité de la macrofaune influence également la croissance et lôactivité des communautés microbiennes des sédiments en favorisant lôapprovisionnement en substrats, en oxygène et en nitrates (Van de Bund et al., 1994).

Les organismes benthiques, via leur rôle dans le remaniement sédimentaire, sont des acteurs indispensables des cycles géochimiques globaux et du fonctionnement des systèmes quôils composent (Gilbert, 2003).

d. Remise en suspension des sédiments

Le compartiment sédimentaire nôest pas stable. Outre les modifications de répartition des contaminants à petite échelle (bioturbationé) des modifications à plus grande échelle

peuvent avoir lieu. En effet des évènements tels quôune crue ou un dragage peuvent conduire à une remise en suspension des sédiments. Cela se traduit par un apport de particules sédimentaires et dôeau interstitielle dans la colonne dôeau surnageante. Ces apports en particules augmentent la turbidité de lôeau, réduisent la production primaire et la perception visuelle des prédateurs (Davies-Colley et al., 1992; Davies-Colley et Smith, 2001).

Suite aux modifications physico-chimiques du milieu, les contaminants peuvent être relargués dans la colonne dôeau et en détériorer la qualité. En conséquence, des effets néfastes sur le biota peuvent survenir : par exemple, une augmentation des taux de dérive (Rosenberg et Wiens, 1978) ou une réduction de la diversité des populations (Nuttall et Bielby, 1973; Gray et Ward, 1982; Quinn et al., 1992; Shaw et Richardson, 2001; Bilotta et Brazier, 2008). Il a été rapporté chez les poissons une augmentation de mortalité (Newcomb et Flagg, 1983; Reynolds et al., 1988), une réduction de croissance (Shaw et Richardson, 2001) et des dommages physiques sur les branchies (Lake et Hinch, 1999). Un fort contenu organique des sédiments remis en suspension peut également réduire les niveaux en oxygène dissous dans lôeau et provoquer des conditions dôanoxie délétères pour la faune aquatique (Ryan, 1991).

5 Enjeux réglementaires et sociétaux

a. Enjeux réglementaires

La Directive Cadre Européenne sur lôeau (DCE) impose à lôensemble des états membres de lôUnion Européenne dôatteindre le « bon état écologique » pour au moins les deux tiers des masses dôeau dôici 2015. Le bon état écologique dôune masse dôeau est défini par des éléments de qualité biologiques (diatomées, macroinvertébrés, macrophytes, poissons), chimiques et hydromorphologiques. Pour répondre à cet objectif, la DCE impose donc la mise en place de méthodologies de diagnostic, de suivi et de restauration. Sôil est évident que la qualité des sédiments peut être un obstacle à la réalisation des objectifs communautaires, la DCE ne traite pas spécifiquement de ce compartiment. Le Parlement Européen a récemment suggéré dôopter pour lôapplication de normes de qualité environnementale (NQE) basées sur les concentrations en polluants dans les sédiments et/ou dans le biota plutôt que dans lôeau (amendement de 2008). Malgré tout, cette recommandation nôest pas suffisante pour permettre une vue dôensemble de la qualité des sédiments en Europe. En effet, chaque pays développe ses propres lignes directrices quant à la qualité des sédiments (Sediment Quality Guideline) et ses propres stratégies de suivi (Ahlf et al., 2002) conduisant à un manque dôuniformité des méthodes de suivi de la qualité des sédiments, des techniques analytiques et dans la définition des seuils de qualité, entre pays, mais aussi parfois au sein dôun même pays (Flück et al., 2012).

A lôéchelle de la France, la loi Grenelle (Grenelle de lôenvironnement ï loi du 2 juillet 2010) sôest engagée à restaurer la continuité écologique à travers la constitution dôune trame bleue. Les barrages présents sur les cours dôeau constituent des sites privilégiés dôaccumulation de sédiments. Lôeffacement de ces barrages est une méthode efficace de restauration de la continuité écologique des rivières. Pourtant, elle peut conduire au relargage des sédiments stockés, contaminés ou non. Le retrait des barrages représente donc un risque écotoxique potentiel pour les écosystèmes en aval. Cependant, peu de barrages sont susceptibles dôêtre retirés, du fait de leur usage économique. Il est donc important de développer des politiques de gestion des retenues favorisant la récupération dans les écosystèmes en aval, suite aux impacts physiques associés à la présence dôun barrage.

b. Enjeux sociétaux

Lôimpact des sédiments contaminés sur les organismes aquatiques est largement étudié. Malgré le lien entre la contamination des sédiments et la santé humaine via leur rôle dans la chaîne alimentaire (Owens et Xu, 2011), peu dôétudes se sont penchées sur les risques potentiels sur la santé humaine. La gestion de la ressource en eau potable, des denrées alimentaires comme certains mollusques et poissons, lôépuration de lôeau ou les services récréatifs, peuvent pourtant être profondément affectés par la contamination des sédiments.
De plus, dôautres types dôenjeux sociétaux et économiques sont concrets. En effet, si la qualité des sédiments en termes de contamination est importante, la quantité de sédiments a également un rôle fondamental dans la régulation du régime hydrique, la maintenance de la navigabilité ou la protection des côtes (Apitz, 2012).

Il apparaît donc fondamental dôaborder la gestion des sédiments suivant une approche durable, ce qui nôest pas le cas pour la plupart des projets de gestion actuels (Apitz, 2012).
Ces enjeux écologiques, réglementaires, sociétaux et économiques imposent le développement de méthodologies robustes dôévaluation des risques environnementaux associés aux sédiments contaminés.

II Les méthodes dôévaluation de la qualité des sédiments

Lôévaluation du risque associé aux sédiments contaminés est une problématique dôactualité. Cela se traduit par un grand nombre dôétudes qui se penchent sur le sujet, en effet la combinaison de mots clés « sediment + risk assessment » dans un moteur de recherche (http://www.sciencedirect.com/) se traduit par 34883 résultats le 12/12/2011 et avec une évolution très rapide, avec 35452 résultats le 30/01/2012.

1 Les critères de qualité des sédiments

Lôévaluation de la qualité des cours dôeau, ainsi que du compartiment sédimentaire fait fréquemment appel à lôutilisation de critères de qualité. Un critère de qualité de sédiment est une valeur de référence servant de point de comparaison avec les mesures de concentrations effectives prises pour chaque substance individuellement, dans un échantillon de sédiment. Ces critères se veulent protecteurs des ressources biologiques et / ou prédicteurs dôeffets délétères sur ces ressources (Wenning et al., 2005; Flück et al., 2012). Ces critères ont vocation à définir des concentrations problématiques en contaminants, classer des échantillons de sédiments selon leur potentiel toxique, prioriser les sites à protéger/dépolluer. Leur efficacité pour la prédiction du risque a été plusieurs fois montrée (MacDonald et al., 2000; Burton, 2002; Desrosiers et al., 2010). Cependant plusieurs méthodes existent pour déterminer ces critères de qualité, dont les 4 principales sont détaillées ci-après. Ainsi, il est possible de trouver pour une même substance plusieurs valeurs seuils.

1- Lôapproche (géo) chimique prend en compte les concentrations des fonds géochimiques régionaux pour les métaux comme seuils de qualité. Aucune considération nôest prise pour lôaspect biologie ni la notion de biodisponibilité des contaminants, pour la définition de ces critères de qualité chimique.
2- Pour lôapproche théorique, les valeurs sont dérivées des critères de qualités calculés pour lôeau en appliquant lôhypothèse de lôéquilibre de partition selon laquelle les contaminants se répartissent entre lôeau interstitielle, les particules (sédiment et MES) et le biote (Di Toro et al., 1991). Ces critères sont des valeurs théoriques qui sont calculées lorsque les données de toxicité font défaut ou sont très limitées (OCDE, 1992).

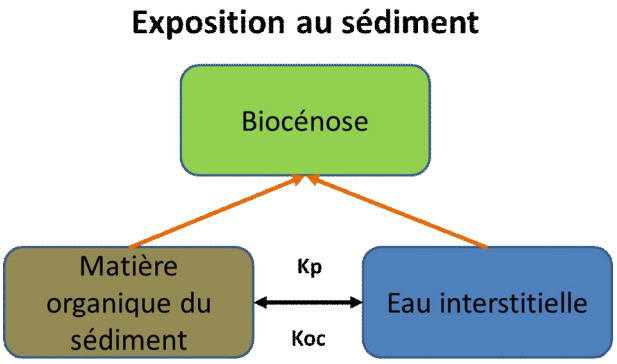


Figure I-3 : Equilibre de partition des contaminants, dôaprès Di Toro et al. (1991).

3- Lôapproche écotoxicologique consiste à obtenir des relations, entre la dose dôun contaminant mélangé à du sédiment naturel, et les effets observés sur les organismes. Des concentrations produisant un effet (délétère ou inducteur) sur les organismes de test peuvent ainsi être déterminées. La plupart de ces études sont basées sur des bioessais (microbiotests et / ou macrobiotests), le plus souvent effectués en laboratoire.

4- Enfin, lôapproche consensuelle nécessite de calculer des valeurs seuils consensuelles à partir des valeurs obtenues à lôaide des autres approches qui doivent donc avoir été effectuées au préalable. Par exemple, MacDonald et al. (2000) ont développés des seuils TEC (threshold effect concentration) au-dessous duquel aucun effet toxique nôest attendu, et PEC (probable effect concentration) au-dessus duquel il est très probable dôobserver un effet toxique.

La détermination de valeurs seuils ne prend pas en compte les possibles interactions entre contaminants, souvent présents en mélanges dans les sédiments naturels. De plus les valeurs seuils déterminées sur un type de sédiment ne sont pas nécessairement valables pour un autre sédiment. En effet, Dabrin et al. (2012) ont montré que le Cd à très forte concentration (dépassant largement la valeur PEC déterminée par MacDonald et al. (2000)) dans un sédiment très carbonaté se fixe aux carbonates et nôest que peu disponible pour les organismes testés (pas dôeffet écotoxicologique). La détermination de seuils chimiques est donc un facteur limitant de cette approche.

Lôapproche écotoxicologique a été choisie comme base de départ pour le développement de nouveaux outils pour lôévaluation du risque associé aux sédiments contaminés puisquôelle rejoint au plus près les objectifs de détermination des valeurs seuils visant à protéger la ressource biologique car elle prend en compte à la fois lôaspect biodisponibilité des contaminants et sensibilité biologique. Elle peut être abordée à plusieurs niveaux

d'organisation biologique de la cellule à la population (Chapman et al., 1987; Woodhead et al., 1999; Geffard, 2001). Les tests peuvent être conduits avec chaque espèce prise individuellement, ou avec plusieurs espèces à la fois afin de mimer la population d'un écosystème (mésocosme).

L'approche triadique a été proposée comme méthode d'évaluation des risques associés aux sédiments contaminés (Long et Chapman, 1985; Chapman, 1996). Elle combine l'étude de la composition chimique des sédiments, des tests d'écotoxicité en laboratoire et le suivi *in situ* des macroinvertébrés benthiques.

2 Les tests écotoxicologiques standardisés disponibles

Il existe plusieurs propositions de biotests en conditions contrôlées de laboratoire, et diverses revues bibliographiques, déjà anciennes en proposent une liste (Giesy et Hoke 1989, Burton 1991, Reynoldson et Day 1992, Ingersoll et al., 1995). Keddy et al. (1995) avaient évalué l'intérêt de plusieurs bioessais sur différentes espèces d'organismes aquatiques invertébrés et végétaux, ainsi que sur différents critères de toxicité (survie, croissance, reproduction), et soulevé l'importance d'une méthodologie bien définie (critères de validité), de la sensibilité et de la reproductibilité des méthodes.

Actuellement des protocoles de tests sont proposés pour plusieurs espèces benthiques, épibenthiques ou même de pleine eau, adaptées au sédiment :

Insectes

- *Hexagenia spp.* (ASTM, 2005) : critères d'effet : croissance, survie et fréquence de mue des nymphes (21 jours).
- *Chironomus dilutus* (ASTM, 2005) : critères d'effet : survie, poids sec, émergence des mâles et femelles, mortalité des adultes, nombre de masses produites, nombre d'œufs par masse et éclosion (40 à 50 jours).
- *Chironomus tentans* (OCDE 218, 2004; OCDE 233, 2010) : critères d'effet : survie (10 jours), croissance et émergence (28 à 65 jours).
- *Chironomus yoshimatsui* (OCDE 218, 2004) : critères d'effet : survie (10 jours), croissance et émergence (20 à 28 jours).
- *Chironomus riparius* (OCDE 218, 2004 ; OCDE 233, 2010 ; AFNOR, 2010 ; ASTM, 2005) : critères d'effet : survie (10 jours), croissance et émergence (20 à 28 jours).

Crustacés

- *Daphnia magna* et *Ceriodaphnia dubia* (ASTM 2005) : critères d'effet : survie, croissance, reproduction (7 jours).
- *Diporeia spp.* (ASTM, 2005) : critères d'effet : survie et comportement (28 jours).
- *Hyalella azteca* (ASTM, 2003, 2005 ; EPA, 2000) : critères d'effet : survie et croissance (28, 35 et 42 jours), reproduction et nombres d'adultes mâles et femelles (42 jours).

Annélides

- *Tubifex tubifex* (ASTM, 2005) : critères d'effet : survie et reproduction (28 jours).

Poissons

- *Danio rerio* (ISO, 2007) : critères d'effet : développement embryo-larvaire (48 heures) et viabilité des larves.

Plantes

- *Myriophyllum aquaticum* (ISO, en cours de validation) : critères d'effet : croissance et gain de poids (10 jours).

Les seuils d'effet obtenus par l'approche écotoxicologique (Chapitre 1 § II-1) sont dépendants des espèces utilisées. En effet, chaque organisme présente des sensibilités différentes aux contaminants expliquées par leur biologie et leur écologie différentes (Ducrot et al., 2006; Roman et al., 2007). De nombreuses études mettent en avant la nécessité d'utiliser des

batteries dôespèces afin dôêtre plus représentatif de la diversité spécifique des écosystèmes aquatiques, et donc des sensibilités différentes de chaque espèce (Milani et al., 2003; Roman et al., 2007; Narracci et al., 2009). Cette approche nécessite donc de choisir des organismes appropriés. Ainsi nous avons choisi de tester trois macro-invertébrés appartenant à différents phylla (insecte, mollusque et crustacé) et largement représentés dans les cours dôeau européens.

Les espèces *C. riparius, G. fossarum* et *P. antipodarum* représentent 3 espèces dôinvertébrés présentes dans la plupart de nos milieux dôeau douce. Elles présentent des traits biologiques (mode respiratoire, mode de nutrition, taille, mode de reproductioné) et écologiques (type de substrat, température é) différents, ce qui permet dôespérer une meilleure représentation de la gamme de sensibilité des organismes dôune communauté. Lôexposition aux sédiments est également différente pour les 3 espèces. Le mollusque est susceptible de sôy enfouir tout au long de son cycle de vie (cette espèce est qualifiée de ómudsnailô côest à dire éescargot de boueô), il peut cependant aussi être trouvé sur dôautres types de substrats (contact non permanent). Le gammare vit principalement dans la colonne dôeau mais entre lui aussi en contact avec le sédiment de manière plus occasionnelle. Enfin le chironome passe lôensemble de son développement larvaire en contact permanent avec le sédiment, dont il ingère des particules, alors que lôadulte est aérien. En plus de leurs différences, ces organismes sont sensibles et de nombreuses études réalisées ont permis de générer des connaissances utiles pour lôinterprétation de nos résultats.

Ces trois espèces ont donc été sélectionnées comme organismes de test pour le développement dôune batterie de biotests pour lôévaluation du risque associé aux sédiments contaminés.

Il existe dôores et déjà des normes française et européenne (AFNOR, 2010; OCDE 233, 2010) définissant les réponses de traits de vie de lôinsecte *Chironomus riparius* (chironomide séxué) lors de lôexposition à un sédiment contrôle. Cependant, ces normes ont été établies sur un unique substrat artificiel (silice). Elles ne prennent donc pas en compte la variabilité biologique de ses réponses liée à la variabilité des propriétés géochimiques des sédiments.

La sensibilité aux contaminants de plusieurs espèces de crustacés a été montré dans de nombreuses études (Ford et al., 2003; Mann et al., 2009; Geffard et al., 2010). Dôailleurs des tests standardisés sur crustacés existent, mais seulement pour des espèces non européennes (Environmental Protection Agency, 2000; ASTM, 2003; ASTM, 2005). Pourtant des espèces couramment présentes dans les cours dôeau français ont elles aussi montré leur sensibilité aux

contaminants, en particulier plusieurs espèces de gammares (Roman et al., 2007; Dedourge-Geffard et al., 2009; Geffard et al., 2010). Lôorganisme *Gammarus fossarum* (amphipode sexué), est de plus très étudié et des connaissances sur son cycle de reproduction (Geffard et al., 2010) et son alimentation (Coulaud et al., 2011) ont été acquises.

En ce qui concerne les mollusques, aucun test nôest standardisé mais lôorganisme *Potamopyrgus antipodarum* (gastéropode parthénogénétique) a été proposé à la normalisation de par sa sensibilité aux contaminants de type perturbateurs endocriniens, constatée dans plusieurs études (Duft et al., 2007; Matthiessen, 2008; OCDE 233, 2010).

III Matériel biologique

1 *Gammarus fossarum*

a. Classification

Lôespèce *Gammarus fossarum* est autrement connue sous les noms *Gammarus delebecquei* ou *Gammarus pulex fossarum* (Pacaud, 1945; Pacaud, 1952), sa systématique est détaillée dans le tableau I-1.

Embranchement	Arthropode
Super-classe	Crustacé
Classe	Malacostracé
Sous-classe	Eumalacostracé
Super-ordre	Péracaride
Ordre	Amphipode
Sous-ordre	*Gammaridae*
Genre	*Gammarus*
espèce	*fossarum* (Koch, 1836)

Tableau I-1 : Systématique de *G. fossarum* (Martin et Davis, 2001).

b. Ecologie et biologie

Les crustacés amphipodes Gammaridae sont représentés par plus de 4500 espèces. Le genre *Gammarus*, est très largement présent dans tout lôhémisphère nord, avec plus dôune centaine dôespèces dont la plupart sont dulçaquicoles (Barnard et Barnard, 1983; Karaman et Pinkster, 1987; Ţivić et Marković, 2007). Lôespèce *G. fossarum* (Koch, 1836) est elle-même largement représentée sur une large partie du continent européen, dont une large part du territoire français (Figure I-4).

Figure I-4 : Répartition géographique de *G. fossarum* en Europe (Barnard et Barnard, 1983).

Les gammares vivent en populations de forte densité pouvant atteindre plusieurs milliers dôorganismes au m² (Felten, 2003). Ils vivent sur des substrats grossiers (galets, graviers) et les substrats organiques (bryophytes, les végétaux rivulaires et végétation morte). Ils sont souvent associés aux amas de matière organique, aux mousses ou aux racines, où ils peuvent trouver de la nourriture, se cacher et sôaccrocher, ce qui constituent leur habitat préférentiel. Ils sont herbivores, détritivores et carnivores. Leur régime alimentaire est composé de feuilles mortes, de biofilms, de chironomidés ou encore de petits isopodes (Macneil et al., 1997). De plus, le cannibalisme nôest pas rare chez les amphipodes. *G. fossarum* peut sôadapter à des conditions environnementales très variées (ruisseaux de plaine ou de montagne), mais on le retrouve typiquement dans des sources et des ruisseaux de montagne peu profonds, très oxygénés, oligotrophes et à fort courant (Roux, 1982; Barnard et Barnard, 1983; Pöckl, 1995). La température de lôeau doit être comprise entre 0 et 25°C, elle devient létale entre 28 et 32°C (Wijnhoven et al., 2003). Une concentration relativement élevée en oxygène est nécessaire pour sa survie (Maltby et al., 1995), ainsi quôune teneur de lôeau correcte en calcium, élément indispensable à sa croissance (Pacaud, 1945; Peeters et Gardeniers, 1998).

Les gammares sont une importante source de nourriture pour différentes espèces de poissons, de macroinvertébrés, dôoiseaux et dôamphibiens puisque plus de 60% de la production annuelle de *G. pulex* peut être consommée par les poissons (Welton, 1979; MacNeil et al., 2000). De plus, ils jouent un rôle clef dans lôincorporation et la décomposition du matériel organique et dans la redistribution de la matière et de lôénergie (Maltby et Crane, 1994;

Forrow et Maltby, 2000). Le gammare est donc un organisme essentiel au bon fonctionnement écologique des rivières.

Croissance

La croissance du gammare se fait par mues successives et sa durée de vie semble se limiter à 2 ans (Tachet et al., 2000). Les nouveaux nés deviennent matures après un nombre déterminé de mues (10 mues pour *G. pulex*). Le temps de mue est température-dépendant et sexe-dépendant, les mâles ayant des phases inter-mues plus longues que les femelles.

Eléments dâanatomie et de morphologie

Le corps des gammares peut atteindre environ 20 mm à lâétat adulte et est caractérisé par une convexité dorsale régulière. Il est possible de distinguer 4 régions distinctes (Figure I-5), de lâavant vers lâarrière, le prosoma (tête), le mésosoma (thorax), ainsi que le métasoma et lâurosoma (abdomen) (Chevreux et Fage, 1970; Roux, 1970).

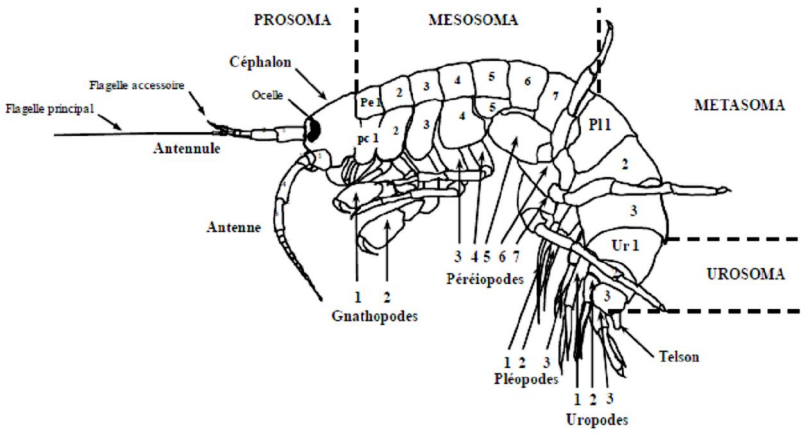


Figure I-5 : Vue latérale dâun *Gammaridae* (Xuereb et al., 2009). pc : plaques coxales ; Pe : périomères ; Pl : pléomères ; Ur : uropomères.

Gammarus fossarum se distingue des autres espèces du genre par : (i) une cuticule non carénée ; lâabsence de rayures sur le corps ; de petites ocelles de formes ovales ; un rapport endopodite / exopodite (parties interne et externe de lâuropode 3) de lâuropode 3, compris entre 0,4 et 0,6 ; et des antennes portant un article 4 plus court que le 5, munies de longues soies insérées en 6, 7 ou 8 points (Roux, 1970; Xuereb et al., 2009; Lacaze et al., 2011).

Une clé de détermination des différentes espèces couramment représentées sur le territoire français a été établie par Felten (2003) et est présentée Figure I-6.

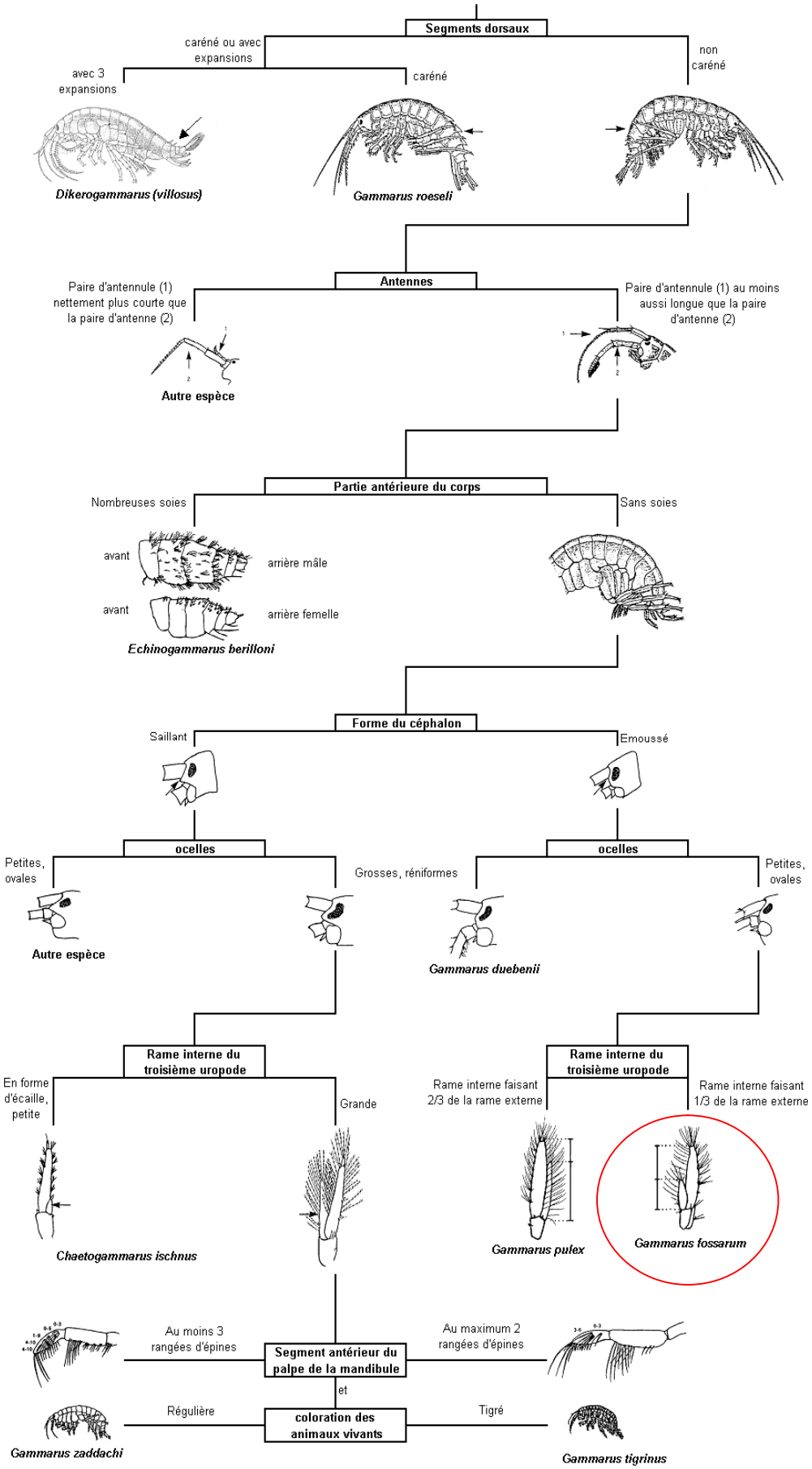


Figure I-6 : Clé de détermination de *G. fossarum*, dôaprès Felten (2003).

Reproduction

G. fossarum est une espèce itéropare, sa reproduction ayant lieu plusieurs fois dans lôannée. La reproduction est continue, avec un maximum en avril-mai et un fort ralentissement en période hivernale. La température optimum de fécondité pour *G. fossarum* est de 12,1°C (Pockl et Humpesch, 1990). Lorsque la femelle est prête à se reproduire, le mâle sôagrippe alors sur son dos au moyen de ses gnathopodes. Le couple forme alors une figure appelée amplexus précopulatoire (ou precopula) (Figure I-7).

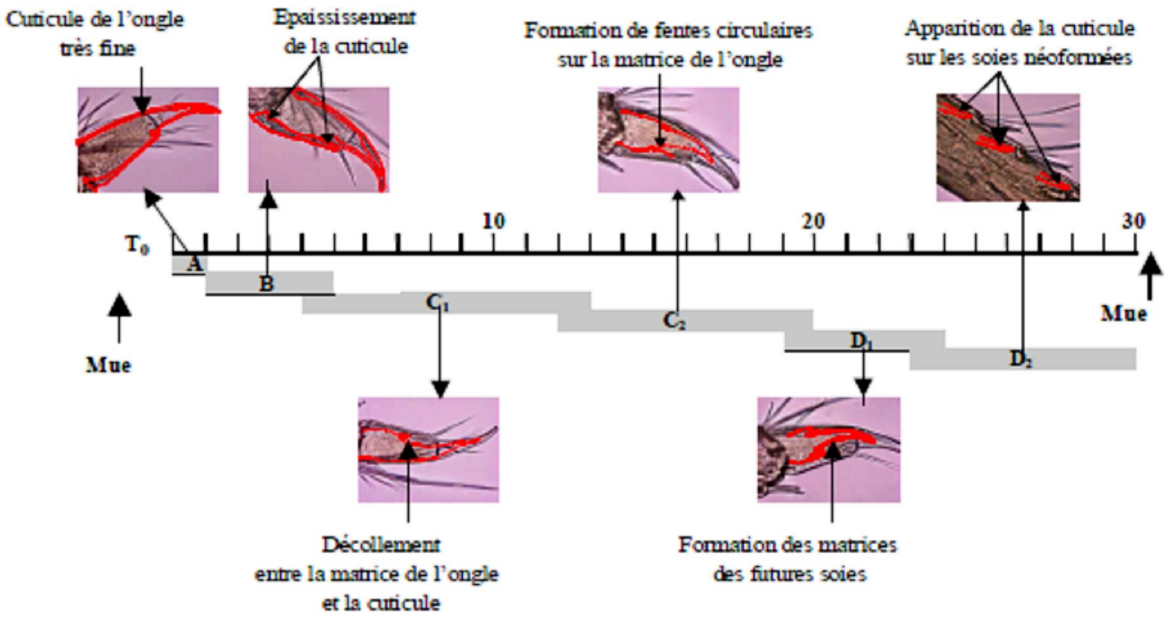
Figure I-7 : Illustration dôun précopula de *G. fossarum*. (photo : laboratoire dôécotoxicologie, Irstea Lyon)

Cette position permet au mâle de continuer se déplacer et se nourrir tout en maintenant la femelle sous son corps. Cette phase peut durer de quelques jours à une semaine (Bollache et Cezilly, 2004).

Lôappareil génital mâle sôouvre dans la partie ventrale du péréiomère 7 et forme la papille génitale (il en existe 2). Chez la femelle, les ovaires occupent le même emplacement que les testicules chez les mâles. Ovaires et testicules sont assez difficilement identifiables, cependant on distingue facilement les femelles adultes par la présence dôoostégites et les mâles par la présence de gnathopodes II plus robustes que chez les femelles, ainsi que par lôexistence des papilles génitales (Chevreux et Fage, 1970; Schmitz, 1992). Les oostégites sont les extentions lobiformes formées par la face interne des coxopodites des gnatopodes 2 et des 3 paires de périopodes suivantes.
Lôovulation, suivie immédiatement de la fécondation se produit une fois la mue de la femelle effectuée : lôexpulsion des î ufs vers le marsupium, formé par les oostégites, est alors rendue possible par la présence dôun oviducte relativement flexible. Les î ufs vont se développer et éclorent dans le marsupium.

Une fois lôexuvie de la femelle éjectée, le sperme est déposé via les papilles génitales mâles dans la poche marsupiale de la femelle où plusieurs fécondations sont effectuées en quelques heures. Chez la femelle *G. fossarum*, les cycles de mue et de reproduction sont fortement synchronisés, la femelle se reproduisant à la fin de chaque cycle de mue (Geffard et al., 2010). Chez les femelles sexuellement actives, la vitellogenèse et le développement des embryons dans le marsupium sont synchrones, à chaque cycle dôintermue. Les juvéniles éclos sortent du marsupium peu de temps avant lôexuviation de leur mère. Suite à cette exuviation, la femelle pond une nouvelle portée dôovocytes matures qui seront aussitôt fécondés par un mâle. Parallèlement, dans la gonade, un nouveau lot dôovocytes primaires entre en vitellogenèse. Lôexuviation peut ainsi être considérée comme le point de départ et dôaboutissement de la maturation gonadique ainsi que du développement embryo-larvaire dans le marsupium. Le cycle de mue dure environ 30 jours, à 12°C chez la femelle adulte, et se découpe en 5 stades dont la détermination se base sur lôobservation microscopique du développement de la nouvelle cuticule et du décollement de lôancienne au niveau de la griffe des péréiopodes 3 et 4 (Figure I-8). La détermination des différents stades de mue a été effectuée sur la base des critères développés par Blanchet-Tournier (1980) chez lôamphipode marin *Orchestia gammarelus* puis adaptés chez *G. fossarum* par Geffard et al. (2010).

Les stades embryonnaires sont déterminés sur la base des critères définis chez *G. pulex* (Mc Cahon et Pascoe, 1988) et adaptés chez *G. fossarum* par Geffard et al. (2010) (Figure I-9).



FigureI-8 : Caractérisation du cycle de mue chez la femelle *G. fossarum* (Geffard et al., 2010).

A 12°C, le cycle de mue dure environ 30 jours chez la femelle adulte, et se découpe en 6 stades dont la détermination se base sur lôobservation microscopique du développement de la nouvelle cuticule et du décollement de lôancienne cuticule au niveau de la griffe des péreiopodes 3 et 4. Les stades A et B sont des stades post mue, les stades C1 et C2 des stades inter mue et les stades D1 et D2 des stades de pré mue.

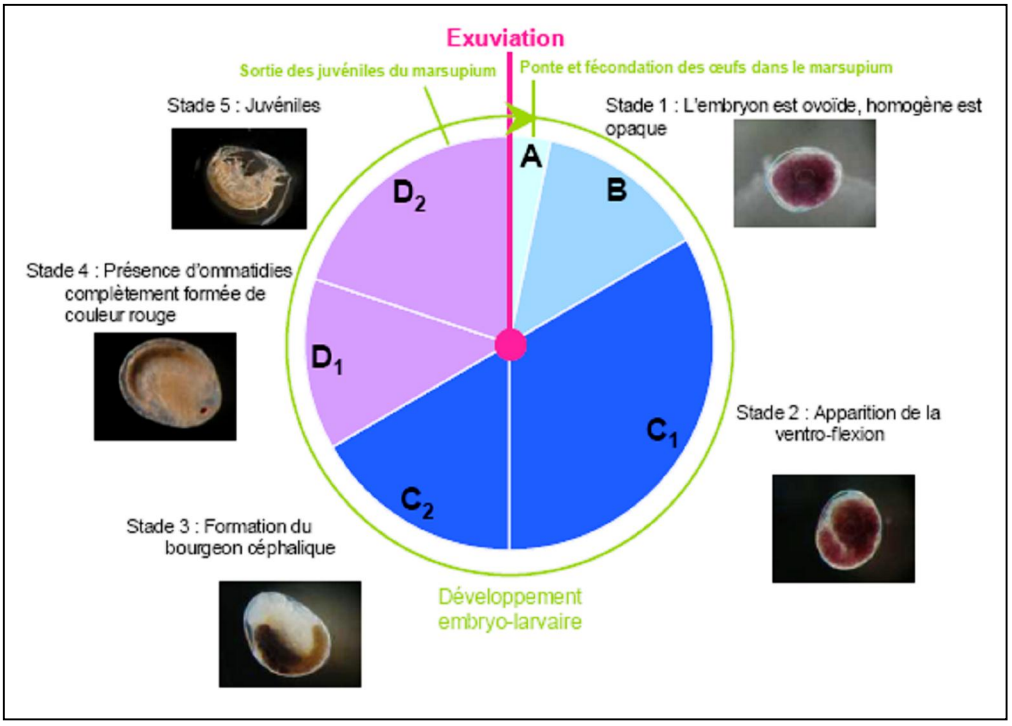


Figure I-9 : Caractérisation du développement embryonnaire en corrélation avec le cycle de mue de la femelle *G. fossarum* (Xuereb, 2009).

2 *Chironomus riparius*

a. Classification

Lôespèce Chironomus riparius appartient à lôordre des diptères (vraies mouches). Il sôagit dôun chironomidé non piqueur présentant deux stades aquatiques lors de son développement (larve et nymphe) et un stade adulte aérien de courte durée.
Dans la littérature, on retrouve également cette espèce sous le nom de *Chironomus thummi* (Credland, 1973) Sa systématique est présentée dans le tableau I-2.

Embranchement	Arthropode
Sous-embranchement	Hexapode
Classe	Insecte
Sous-classe	Pterygota
Ordre	Diptère
Sous-ordre	*Nématocera*
Famille	*Chironomidae*
Genre	*Chironomus*
espèce	*riparius* (Meigen, 1854)

Tableau I-2 : Systématique de *C. riparius*

b. Ecologie et biologie

Chironomus riparius est une espèce holarctique que lôon retrouve en Amérique du Nord (Canada et Etats-unis), en Argentine ainsi que dans de nombreux pays européens dont lôAutriche, la Belgique, la France, lôAllemagne ou lôItalie (Townes, 1945; Curry, 1962; Credland, 1973; Rasmussen, 1984). Les larves tubicoles se trouvent fréquemment dans les lacs, les étangs et les cours dôeau eutrophes. Ils vivent également dans les habitats littoraux à fonds boueux jusquôà 1 m de profondeur (Rasmussen, 1984). Principalement limivores, les larves étendent leurs extrémités antérieures à lôextérieur des tubes pour se nourrir de la couche superficielle du sédiment (Rasmussen, 1984). Cette espèce est tolérante à lôeutrophisation et

est considérée comme une indicateur ubiquiste de la pollution organique (Townes, 1945; Gower et Buckland, 1978). Elle semble posséder une grande tolérance à la granulométrie des sédiments et cette espèce a été observée dans la nature à des températures variant de 0 à 33°C, au pH de 5 à 9 et à des concentrations en oxygène dissous dôà peine 1 mg / L (ASTM, 1991; ASTM, 1995).

Le cycle biologique est principalement rythmé par les variations saisonnières de température et par la disponibilité des éléments nutritifs (Ristola et al., 1999). En lien avec ces variables locales et son aire de répartition géographique, cette espèce est univoltine (une génération par an) ou multivoltine (plusieurs générations par an). En laboratoire, sous conditions contrôlées, la durée des différentes phases du cycle de vie est bien maitrisée (AFNOR, 2010).
Le cycle de vie (Figure I-10) se déroule en 4 étapes : lôœuf, la larve, la nymphe et lôimago. Les 3 premiers stades sont aquatiques et lôimago est aérien.

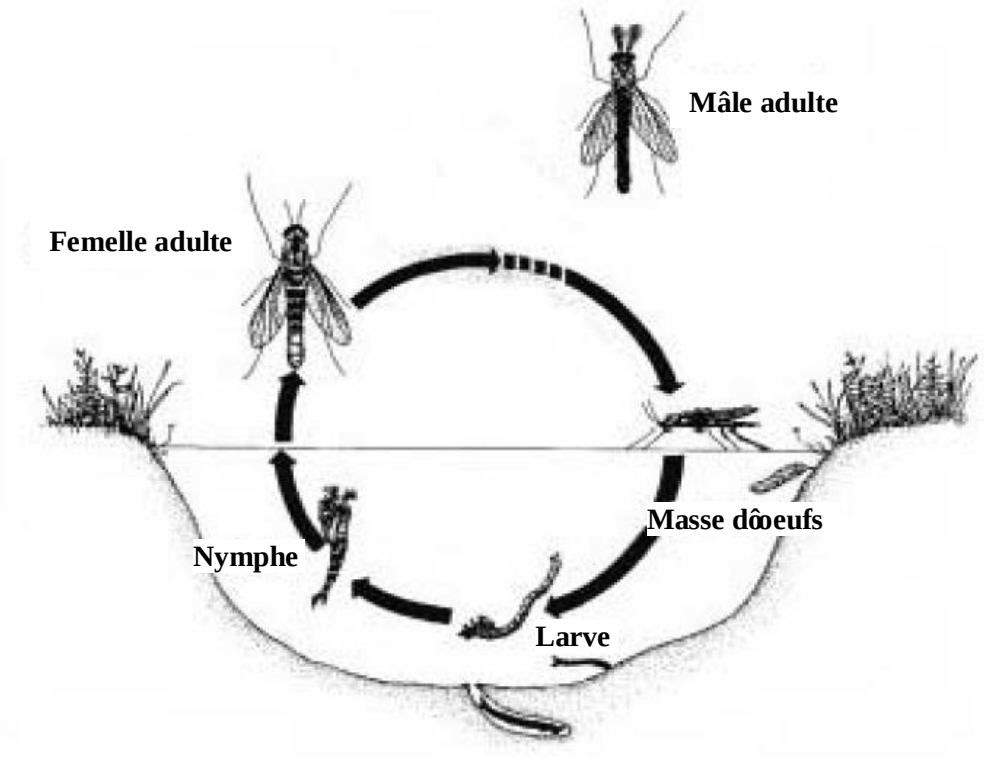


Figure I-10 : Schéma simplifié du cycle de vie de *C. riparius*, dôaprès Ducrot (2005).

Les î ufs

Les î ufs sont pondus en eaux douces. Ils forment des masses gélatineuses (Figure I-11) de 150 à 600 î ufs fixées aux macrophytes. Lôéclosion survient 2 à 6 jours après la ponte (variable selon la température du milieu) (Curry, 1962; ASTM, 1991; ASTM, 1995).

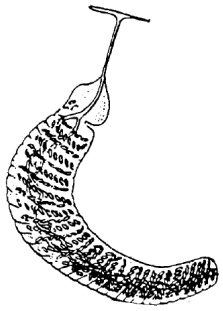


Figure I-11 : Masse dôî ufs de *Chironomus sp.*, dôaprès AFNOR (2010).

La larve

La phase larvaire se déroule en 4 stades distincts, différenciables par la taille de la capsule céphalique comme suit : stade 1 : 0,07 à 0,12 mm ; stade 2 : 0,13 à 0,24 mm ; stade 3 : 0,26 à 0,40 mm et stade 4 : 0,43 à 0,60 mm (Day et al., 1994). Cette capsule grandit rapidement lors de la mue larvaire, mais cesse de grandir en période dôinter-mues. La couleur du corps permet aussi de distinguer les stades larvaires en évoluant de blanc laiteux à rouge vif avec lôacquisition progressive dôhémoglobine. Les antennes, les mandibules, 3 segments thoraciques et 9 segments abdominaux sont observables dès le premier stade larvaire (Figure I-12). Le dimorphisme sexuel est visible à partir du quatrième stade larvaire, les mâles pesant en moyenne 30 % de moins que les femelles. A ce stade, lôobservation des disques imaginaux permet de les différencier (Wülker et Götz, 1968).

Les larves de premier stade sont planctoniques et se nourrissent de la masse nutritive qui entourait les î ufs. Les larves des stades 2 à 4 vivent dans la couche superficielle des sédiments, à lôintérieur de fourreaux formés de sédiments fins et de détritus (Rasmussen, 1984). Ces fourreaux les protègent des prédateurs (Baker et Bradnam, 1976). Les larves sôobservent dôavril à octobre, date à laquelle elles entrent en diapause hivernale (Goddeeris et al., 2001). La diapause permet de synchroniser le cycle de vie des organismes nés durant lôété.

La croissance larvaire terminée, les chironomes se métamorphosent à la surface de lôeau (Benoit et al., 1997).

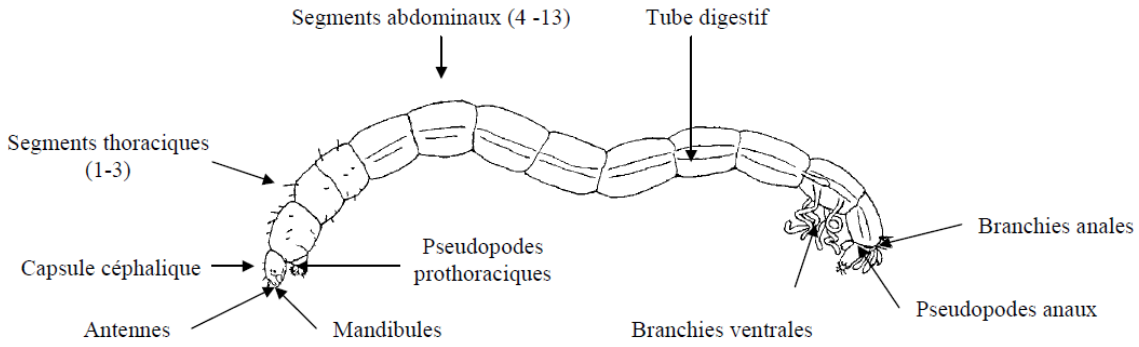


Figure I-12 : Morphologie simplifiée des larves de chironome, dôaprès Tachet et al. (2000).

La nymphe

La nymphe (Figure I-13) possède des organes respiratoires thoraciques qui apparaissent comme une touffe de filaments blancs, situés derrière la tête. Des organes natatoires ainsi que des étuis pour les futures ailes, pattes et yeux sont nettement observables (Townsend et al., 1981).

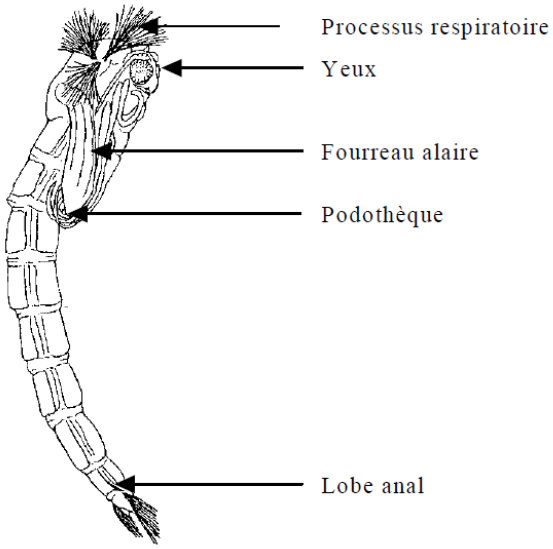


Figure I-13 : Morphologie simplifiée des nymphes de chironome, dôaprès Tachet et al. (2000).

Lôimago

Lôémergence des nymphes en imagos est bimodale, plus précoce chez les mâles que chez les femelles. Les imagos survivent 4 à 11 jours, pendant lesquels ils se dispersent et se reproduisent. Contrairement aux mâles, chaque femelle ne se reproduit quôune seule fois puis meurt (Downe, 1973).

Lôimago ressemble aux moustiques en taille et apparence, mais est dépourvu dôappareil piqueur (Figure I-14). Un fort dimorphisme sexuel est observable. Les mâles se distinguent des femelles par leurs antennes plumeuses et leur abdomen mince, qui porte à son extrémité postérieure une paire de pinces génitales (Townsend et al., 1981). La femelle, plus foncée, est environ 2 fois plus grosse que le mâle. Ses î ufs représentent environ 30 % de sa masse.

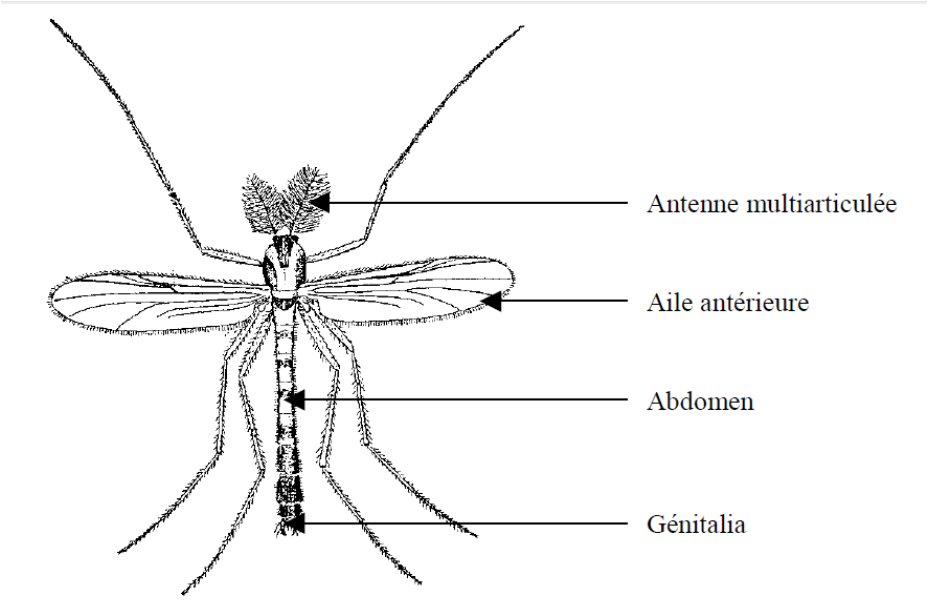


Figure I-14 : Morphologie simplifiée des imagos mâles de chironome, dôaprès Tachet et al. (2000).

3 *Potamopyrgus antipodarum*

a. Classification

Lôespèce *Potamopyrgus antipodarum* (Gray, 1843) se retrouve aussi sous le nom de *Potamopyrgus jenkinsi*. Jusquôau milieu des années 1990, *P. antipodarum* faisait partie de la sous-classe des Prosobranches. Cependant, des études moléculaires ont conduit à modifier la phylogénie des gastéropodes (Ponder et Lindberg, 1997). A lôheure actuelle, la phylogénie des Gastropodes est encore en pleine évolution et des modifications sont régulièrement observées. Sa systématique détaillée est synthétisée dans le Tableau I-3.

Embranchement	Mollusque
Classe	Gastéropode
Sous-classe	Caenogastropoda
Super-ordre	Péracaride
Ordre	Littorinimorpha
Super-famille	Rissooidea
Famille	Hydrobiidae
Genre	*Potamopyrgus*
espèce	*antipodarum* (Gray, 1843)

Tableau I-3 : Systématique de *P. antipodarum* (Ponder et Lindberg, 1997; Gust, 2010)

b. Ecologie et biologie

P. antipodarum est une espèce invasive, originaire de Nouvelle-Zélande (Alonso et Castro-Diez, 2008). Elle a colonisée lôEurope (Winterbourn, 1970; Roth, 1987), lôAustralie (Ponder, 1988) ou encore lôAmérique du Nord (Jacobsen et Forbes, 1997; Zaranko et al., 1997; Gangloff, 1998) et est présente maintenant sur une grande partie du globe. Une fois introduite, les populations connaissent généralement un important accroissement et colonisent rapidement les rivières et plans dôeau avoisinants (Ponder, 1988).

P. antipodarum se retrouve généralement dans les fonds vaseux, les substrats sableux ou pierreux ou encore dans la végétation aquatique (Michaut, 1968). Environ 70% des individus se retrouvent dans la vase et 30% sur les végétaux (Heywood et Edwards, 1962) bien que ces proportions doivent fortement varier entre les populations et au cours de lôannée. *P. antipodarum* a été retrouvé dans les rivières de plaine, les ruisseaux rocheux, les criques, les fossés, les estuaires, les lacs ou étangs. Cependant, il nôest pas capable de coloniser des masses dôeau temporaires (Winterbourn, 1970). Il est généralement enfoui dans la couche superficielle du sédiment (Michaut, 1968; Dorgelo, 1987). Les densités des populations peuvent être très importantes, jusquôà plusieurs centaines de milliers dôindividus au mètre carré (Mouthon, 1982; Schreiber et al., 1998; Kerans et al., 2005). La présence de végétation favorise des densités plus importantes (Schreiber et al., 1998).

P. antipodarum présente un régime alimentaire large. Il est principalement détritivore, mais se nourrit également dôalgues et de débris de macrophytes (Mouthon, 1982). Côest un brouteur racleur de dépôts organiques fins, et qui affectionne les diatomées (Dorgelo et Leonards, 2001).

Cette espèce de mollusque peut sôadapter à une salinité de 12 à 32 ă (Winterbourn, 1970; Mouthon, 1982), mais une augmentation de la mortalité est observée avec l'augmentation de la salinité contrairement à beaucoup dôautres espèces de la même famille (Hylleberg et Siegismund, 1987). *P. antipodarum* sôadapte également aux températures les plus hautes allant jusquôà 28 ou 32 °C (Roth, 1987; Dorgelo, 1988). En revanche, il supporte mal les très basses températures comparativement aux autres Hydrobidae. Certains auteurs le considèrent très tolérant aux pollutions biodégradables (Mouthon et Dubois, 2001).

Il est positivement rhéotactique, c'est-à-dire quôil se déplace généralement diagonalement dans le sens du courant (Haynes et al., 1985), à une vitesse dôenviron 3 cm / minute. Il est la proie de nombreuses espèces de poissons (truite, brème, gardon) et certains oiseaux aquatiques plongeants (Mouthon, 1982; Dorgelo, 1987). Il se disperse généralement par lôintermédiaire de ses prédateurs ou par dérive (Mouthon, 1982). Il est particulièrement adapté à la dispersion passive par les oiseaux (Zaranko et al., 1997). Il survit également relativement bien au passage dans le tube digestif des poissons (Haynes et al., 1985).

Eléments dôanatomie et de morphologie

P. antipodarum est facilement identifiable par sa coquille dextrale, fine et solide (Zaranko et al., 1997). Elle est conique, de couleur brun / jaune, formée de tours convexes ou arrondis (Michaut, 1968). Lôouverture est elliptique et large, avec une marge concave et collumnaire. Elle mesure de 0,5 à 12 mm de longueur maximale et comporte jusquôà 8 tours chez les individus de grande taille (Figure I-15).

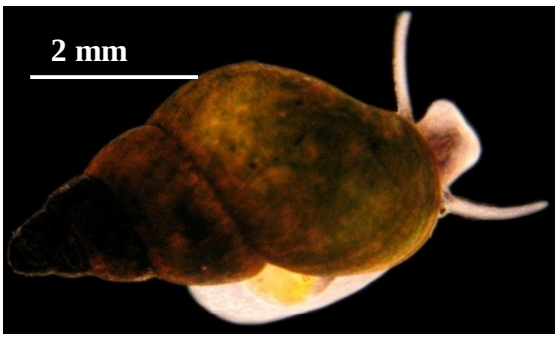


Figure I-15 : Vue générale de *P. antipodarum.* (photo laboratoire dôécotoxicologie, Irstea Lyon)

Il semble y avoir une importante variabilité de taille entre populations (OECD, 2010). La coquille possède chez les adultes des ornements divers principalement lisses ou carénés qui pourraient avoir un rapport avec la composition du milieu (Michaut, 1968). Chez les juvéniles, la coquille est semi-transparente et ne possède aucune ornementation.

Reproduction

P. antipodarum est une espèce itéropare (Calow, 1978), sa reproduction ayant lieu plusieurs fois dans lôannée. Elle est sous lôétroite dépendance des facteurs environnementaux comme la photopériode ou la température (Sternberg et al., 2010; Gust et al., 2011). Elle est ovovivipare et parthénogénétique, lui conférant un atout essentiel pour son caractère invasif (Robson, 1926). En effet, dans les zones où il est invasif, les populations sont constituées quasi exclusivement de femelles (Ponder, 1988; Schreiber et al., 1998; Gerard et Dussart, 2003). En Nouvelle-Zélande, la présence de mâles permet une reproduction sexuée. Il semble que la persistance de mâles soit due à la coévolution entre *P. antipodarum* et ses parasites Trématodes (Schreiber et al., 1998).

La ponte est continue, mais le cycle de reproduction de lôespèce présente un pic de juillet à novembre (Gust et al., 2011).

En Europe, cette espèce est parthénogénétique, mais sa reproduction peut être sexuée en Nouvelle-Zélande. Etant donné lôabsence de mâles dans nos populations, nous ne nous intéresserons quôà lôanatomie des femelles, et en particulier à leur appareil reproducteur (Figure I-16).

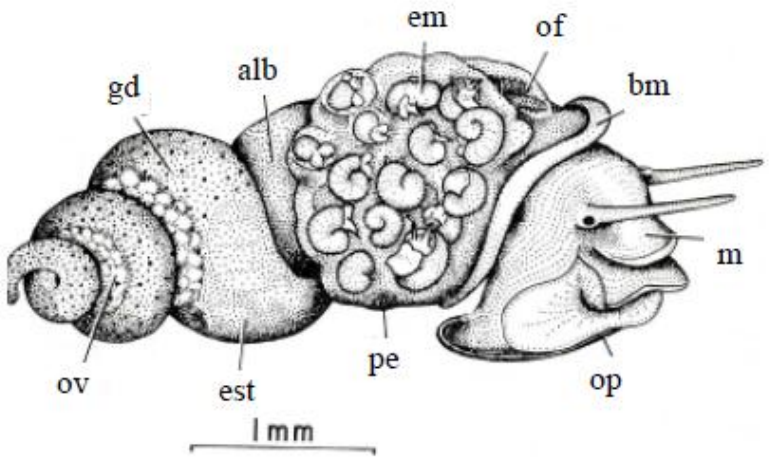


Figure I-16 : Anatomie générale dôune femelle *P. antipodarum*, dôaprès Fretter et Graham (1994). alb : glande à albumen ; bm : bord du manteau ; em : embryons ; est : estomac ; gd : glande digestive ; m : museau ; op : opercule ; ov :ovaire ; pe : poche embryonnaire.

La partie inférieure de lôoviducte forme une poche embryonnaire. Chez les femelles matures (ayant atteint une taille dôenviron 3 mm pour la population qui nous concerne (Gust et al., 2010), la poche embryonnaire contient les embryons en développement. On en distingue deux types selon leur degré de maturité : les embryons nouvellement formés, sans coquille et les embryons coquillés, prêts à être expulsés de la poche.

Croissance

La croissance, est sous lôinfluence de facteurs environnementaux tels que la qualité de la nourriture disponible. En effet, la quantité et la qualité de la nourriture disponible impactent directement les taux de croissance (Dorgelo et al., 1995; Dorgelo et Leonards, 2001) qui varient entre 0,010 et 0,047 mm / jour à 15°C. Le ratio C/N optimal pour la croissance est de 15,9 (Dorgelo et al., 1995). Au-dessus de ce ratio, le taux de croissance diminue fortement.

Par contre, il augmente rapidement pour de faibles augmentations de C/N lorsque ce dernier est faible (Dorgelo et Leonards, 2001).

4 Utilisation des trois espèces modèles en écotoxicologie appliquée à l'évaluation de toxicité des sédiments

Les gammares, dont *G. fossarum*, sont considérés comme de bons indicateurs de la qualité des milieux aquatiques dulçaquicoles en raison de leur grande sensibilité à une large gamme de contaminants. A ce titre, ils ont dôores et déjà été utilisés pour lôévaluation de la qualité des milieux aquatiques lors dôexpérimentation *in situ* ou en laboratoire (Xuereb et al., 2007; Coulaud et al., 2011). Le genre *Gammarus* est utilisé aussi bien pour le développement de biomarqueurs qui mesurent lôimpact des contaminants au niveau sub-individuel, de bioessais au niveau individuel (test dôalimentation, test de reprotoxicité, test de croissance par exemple), dôétudes populationnelles (modification des densités, structures en tailleé) ou des mesures de bioaccumulation, notamment de métaux ou composés organiques (Plénet, 1999; Fialkowski et al., 2003; Ashauer et al., 2010).

Cependant, la grande majorité de ces études se focalise sur lôévaluation de qualité de lôeau, et très peu sôintéressent au compartiment sédimentaire. Quelques études sont disponibles pour *G. pulex*, une espèce très proche de *G. fossarum* (De Lange et al., 2006; Roman et al., 2007). Pour lôespèce *G. fossarum* à laquelle nous nous sommes intéressés, la seule étude concernant lôévaluation de toxicité des sédiments est celle de Dabrin et al. (2012), en lien direct avec ce travail de thèse. Pourtant plusieurs espèces de crustacés, et surtout des amphipodes, ont été utilisées, voire recommandées pour une application à lôévaluation de toxicité des sédiments (tableau I-4). Il sôagit majoritairement de bioessais au niveau individuel. Les traits les plus suivis concernent la reproduction et la croissance.

Référence	type de sédiment testé	critères suivis
Dabrin et al. (2012)	naturel dopé en cadmium	*Gammarus fossarum* Survie juvéniles et adultes Taux de croissance des juvéniles Taux d'alimentation des mâles Reproduction (nombre et surface des ovocytes ; nombre d'embryons)
AFNOR (2002)	naturel ou artificiel	*Hyalella azteca* (juvéniles) Survie Croissance
ASTM (2005)	naturel ou artificiel	*Hyalella azteca* Survie Croissance Reproduction
Costa et al. (2005)	naturel	*Gammarus locusta* Survie Sexe ratio Croissance Reproduction
De Lange et al. (2006)	naturel dopé en HAP	*Gammarus pulex* Comportement d'évitement
EPA (2000)	naturel ou artificiel	*Hyalella azteca* Survie Croissance Reproduction
EPA (2001)	naturel	*Leptocheirus plumulosus* Survie Croissance (poids) Reproduction (nombre de pontes) Comportement d'évitement
Gale et al. (2006)	naturel brut et naturel dopé en cadmium, cuivre ou zinc	*Melita plumulosa* Survie Croissance Fertilité Fecondité
Mann et al. (2009)	naturel brut et naturel dopé en zinc, plomb, et / ou cuivre	*Melita plumulosa* Reproduction (fertilité fécondité)
Neuparth et al. (2005)	naturel	*Gammarus locusta* Peroxydation des lipides Dommages à l'ADN Bioaccumulation
Ringenary et al. (2007)	naturel dopé en plomb	*Elasmopus laevis* Survie Fécondité
Roman et al. (2007)	artificiel dopé en cuivre	*Gammarus pulex* Croissance
Scarlett et al. (2007)	naturel ou artificiel	*Corophium volutator* Survie Croissance Reproduction

Tableau I-4 : Revue non exhaustive de l'utilisation de *G. fossarum*, et d'autres espèces, d'eau douce ou marines, de crustacés amphipodes, en écotoxicologie appliquée à l'évaluation de toxicité des sédiments.

Les espèces *C. riparius* et *P. antipodarum* ont au moins une partie de leur cycle de vie inféodée aux sédiments. Il existe d'ailleurs des méthodes standardisées utilisant *C. riparius* (AFNOR, 2010; OCDE 233, 2010), et *P. antipodarum* a été proposé à la normalisation (OCDE 233, 2010). La majeure partie des études disponibles portant sur *C. riparius* et *P. antipodarum* pour l'évaluation de la toxicité des sédiments utilisent ces méthodes (AFNOR, 2010; OCDE 233, 2010; OCDE, 2010) pour déterminer la toxicité de sédiments naturels, ou de contaminants particuliers lors de dopages de sédiments (naturels ou artificiels). Les traits de vie suivis concernent principalement la croissance et la reproduction pour *P. antipodarum*. Pour *C. riparius* la croissance des larves, l'émergence des adultes (taux d'émergence et vitesse de développement) sont les paramètres les plus étudiés. Le suivi de reproduction est également recommandé et est récemment venu compléter les méthodes standardisées existantes.

Une revue non exhaustive des études portants sur l'évaluation de la toxicité de sédiments contaminés, utilisant *C. riparius* et *P. antipodarum* est présentée respectivement dans les tableaux I-5 et I-6.

Ces deux espèces présentent également l'intérêt de pouvoir être utilisées aussi bien pour des expérimentations au laboratoire qu'*in situ* par des encagements.

Tableau I-5 : Utilisation de *C. riparius* en écotoxicologie appliquée à lôévaluation de toxicité des sédiments.

Référence	type de sédiment testé	critères suivis
AFNOR (2010)	artificiel ou naturel	Survie Croissance Émergence Sexe
Akerblom et Goedkoop (2003)	artificiel	Alimentation
Dabrin et al. (2012)	naturel dopé en cadmium	Survie Taux de croissance des larves Taux d'émergence Vitesse de développement des mâles et femelles
De Lange et al. (2005)	naturel brut (in situ)	Survie Croissance (poids)
Faria et al. (2006)	in situ sites référence et contaminés	Longueur et stade de développement des larves (largeur capsule céphalique)
Kaiser et al. (2012)	artificiel adopé en écrans UV	oecd 2004 Mortalité Nombre de pontes Nombre d'î ufs par masse Temps d'émergence moyen Sexe ratio
Milani et al. (2003)	naturel dopé en cadmium / nickel / cuivre	Survie Croissance Reproduction
Naylor et Rodrigues (1995)	artificiel	Croissance (poids et longueur)
Oetken et al. (2005)	naturel brut (post crue) + contrôle artificiel	Taux d'émergence
OCDE (2010)	artificiel ou naturel	Survie Croissance Émergence Sexe Reproduction (nombre de masses, fertilité, nombre d'î ufs par masse)
Péry et al. (2002)	artificiel	Croissance Émergence Reproduction
Péry et al. (2003)	artificiel dopé en cuivre	Croissance Émergence
Péry et al. (2003)	naturel brut	Croissance Émergence Reproduction
Péry et al. (2008)	naturel brut / artificiel dopé cuivre cdamium zinc	Croissance Bioaccumulation Survie

Tableau I-5 (suite)

Référence	type de sédiment testé	critères suivis
Ristola et al. (1999)	naturel	Taux d'émergence Sexe ratio Mortalité Stade de développement (longueur larve et largeur capsule céphalique) Poids sec
Roman et al. (2007)	artificiel dopé en cuivre	Croissance Emergence
Tassou et Schulz (2009)	artificiel dopé en pyriproxifene	Temps de développement Taux d'émergence Sexe Fécondité et fertilité
Triffault-Bouchet et al. (2005)	naturel brut + contrôle artificiel	Survie Croissance Taux d'émergence
Tuikka et al. (2011)	naturel brut contaminé et contrôle + contrôle artificiel	Survie Stade de développement (largeur de la capsule céphalique) Poids sec

Tableau I-6 : Utilisation de *P. antipodarum* en écotoxicologie appliquée à lôévaluation de toxicité des sédiments.

Référence	type de sédiment testé	critères suivis
Broekhuizen et al. (2001)	naturel brut	Taux de nutrition Taux de croissance
Dabrin et al. (2012)	naturel dopé en cadmium	Survie adulte et juvéniles Reproduction Croissance des juvéniles
Duft et al. (2003)	artificiel dopé en TPT TBT	Reproduction Nombre de cellules î ufs dans l'oviducte Maturité de l'oviducte Mortalité
Duft et al. (2003)	artificiel dopé en BPA OP NP	Reproduction Nombre de cellules î ufs dans l'oviducte Maturité de l'oviducte Mortalité
Duft et al. (2007)	naturels et artificiels non contrôles + contrôle artificiel	Taille coquille (longueur totale et largeur ouverture) Reproduction Nombre de cellules î ufs dans l'oviducte Maturité de l'oviducte Mortalité
Galluba et Oehlmann (2012)	naturel brut	Mortalité Reproduction
Jensen et Forbes (2001)	naturel dopé en cadmium	Taux de croissance Survie juvéniles et adultes Age et taille à la première reproduction Reproduction des adultes Taux d'alimentation Bioaccumulation
Kaiser et al. (2012)	artificiel dopé en écrans UV	Taille coquille (longueur totale et largeur ouverture) Reproduction Nombre de cellules î ufs dans l'oviducte Maturité de l'oviducte Mortalité
Mazurova et al. (2008)	naturel brut + artificiel dopé en extraits de sédiments naturels	Reproduction Survie
OCDE (2010)	artificiel recommandé ou naturel après congélation	Reproduction (fécondité) Taille coquille (longueur totale et largeur ouverture)
Oetken et al. (2005)	naturel brut + contrôle artificiel	Mortalité adultes Reproduction
Pang et al. (2012)	naturel dopé en cuivre	Taux de croissance Mortalité Reproduction Taux d'alimentation Bioaccumulation
Pedersen et al. (2009)	naturel dopé en HHCB	Croissance juvéniles et adultes Survie juvéniles et adultes Age et taille à la première reproduction Taux de reproduction des adultes Taux de nutrition des adultes

Tableau I-6 (suite)

Référence	type de sédiment testé	critères suivis
Schmitt et al. (2008)	artificiel dopé en écrans UV	Mortalité Croissance Reproduction
Schmitt et al. (2010)	naturel brut + contrôle artificiel	Mortalité Reproduction
Schmitt et al. (2011)	artificiel dopé en extraits de sédiments naturels	Croissance Taille coquille (longueur totale et largeur ouverture) Reproduction Nombre de cellules î ufs dans l'oviducte Maturité de l'oviducte Mortalité
Schmitt et al. (2011)	artificiel dopé en extraits de sédiments naturels	Mortalité Croissance Reproduction
Tuikka et al. (2011)	naturel brut contaminé et contrôle + contrôle artificiel	Reproduction Taille

Chapitre 2

Matériels et méthodes

Ce chapitre présente les matériels et les méthodes utilisées pour mener à bien les expérimentations nécessaires au développement et à lôapplication des biotests pour la mesure de la toxicité des sédiments. Il sôagit dans un premier temps de définir les variabilités des traits de vie sélectionnés pour chaque organisme, dans des conditions pas ou peu contaminées (panel sédiments de référence). Dans un second temps, ces mêmes traits sont testés sur des sédiments aux typologies de contaminations variées, et les réponses sont comparées aux réponses obtenues sur sédiments de référence, afin dôévaluer le potentiel de chaque traits à discriminer une contamination. Les organismes ont également été exposés à un sédiment naturel dopé en cadmium dans lôobjectif de comparer les sensibilités des traits de vie des trois espèces.

I Collecte, analyse et préparation des échantillons

1 Collecte, stockage et analyse des sédiments

a. Collecte et stockage des sédiments

La couche superficielle des dépôts sédimentaires (10 premiers cm environ) a été récoltée par prélèvements multiples à la benne Van Veen, jusquà un maximum de 10 jours avant le début des tests. Pour chaque site et chaque date de prélèvement, lœnsemble du sédiment récolté a été tamisé à 2 mm sur site, homogénéisé puis conservé dans des bidons en plastique (figure II-1). Le retour au laboratoire a été effectué dans les 48 heures suivantes. Les bidons de sédiments ont ensuite été conservés en chambre froide (4 °C +/- 1 °C), pour une durée maximum de huit semaines (ASTM 2003). Avant chaque utilisation (analyses chimiques ou bioessais) chaque bidon de sédiment a été homogénéisé mécaniquement.

Figure II-1 : Prélèvement de sédiment à la benne et tamisage (Photos : source C. Durand)

Les sédiments ainsi prélevés sont présentés dans le chapitre 3.

b. Analyse physicochimique des sédiments et dosages des métaux et des micropolluants organiques

Les caractéristiques physico-chimiques des sédiments, ainsi que les contaminants quôils peuvent contenir, peuvent impacter les traits de vie des organismes exposés. En conséquence il est nécessaire de bien caractériser les sédiments échantillonnés pour les tests. Les principales caractéristiques géochimiques (granulométrie, contenu en MO, AVS, pH, Eh, taux dôhumidité, $CaCO_3$), ont été analysées. Le contenu en contaminants majeurs (métaux, PCB et HAP) a été mesuré.

Les analyses ont été effectuées sur tous les sédiments à lôexception de deux (PIZ1 et JEAN1, cf. chapitre 3). Ces deux sédiments ayant été ajoutés au dernier moment pour compléter le panel de sédiments, ils nôont pu être analysés que pour la granulométrie et la matière organique (C/N).

Ganulométrie

La granulométrie a été analysée sur un aliquot de sédiment brut humide, tamisé à 1 mm avant lôanalyse, à lôaide dôun Coulter LS-100 (Loizeau et al., 1994) mis à notre disposition par lôInstitut Forel en Suisse (Figure II-2). La mesure se fait par diffraction dôun faisceau laser par les particules en suspension.

Figure II-2 : Coulter LS-100 (Photo : institut Forel)

Acides volatiles sulfides (AVS)

Les AVS ont été mesurés par le laboratoire de chimie du Cemagref de Lyon, sur sédiments humides suivant la méthode développée par Allen et al. (1993).

pH et potentiel d'oxydoréduction (Eh)

Ces mesures ont été réalisées par le laboratoire de chimie du Cemagref de Lyon, sur un aliquote de sédiment humide fraichement ramené au laboratoire. La mesure de pH a été réalisée à l'aide d'un pH-mètre (Ponselle PVRT-CE). La mesure de Eh a été réalisée avec une électrode Pt-Ag/AgCl (Ponselle PVRT-CE). Les sondes sont positionnées à une profondeur de 5 cm dans le sédiment. La mesure est effectuée en triplicat après 10 minutes d'équilibration. Les résultats Eh sont ajustés à l'aide d'une électrode hydrogène standard (SHE).

Taux d'humidité

Un aliquote de 100g pour chacun des sédiments ont été mis à sécher à l'étuve pendant 48 heures à 50 °C. Le contenu en eau des sédiments est obtenu par soustraction du poids sec, relevé après séchage et refroidissement en dessiccateur de l'aliquote, au poids frais.

Le sédiment ainsi séché a ensuite été finement broyé par un broyeur à agate en vue des dosages de carbonates, de matière organique par perte au feu, d'azote et de carbone organique.

Carbonates de calcium ($CaCO_3$)

Le $CaCO_3$ a été dosé suivant la méthode du calcimètre BERNARD (CTGREF, 1980), par le laboratoire de chimie du Cemagref de Lyon.

Analyse quantitative et qualitative du contenu en matière organique (MO)

La quantité totale de matière organique est mesurée par perte au feu. Un gramme de sédiment sec et broyé est placé dans un four à 550 °C pendant 30 minutes. Après refroidissement des échantillons, une nouvelle pesée est effectuée. La perte de poids correspond approximativement à la MO qui a brulée.

La qualité de MO contenue dans le sédiment est mesurée par dosage du contenu en azote (N) et en carbone (C), qui permet de calculer un rapport C/N. Ces dosages ont été réalisés à l'INRA de Thonon (J. Lazzarotto). L'échantillon subit une combustion éclair à 1000°C puis plusieurs catalyses afin de le réduire en gaz (N_2, CO_2, H_2O) qui sont alors séparés par chromatographie gazeuse et quantifiés (INRA, 2006).

Dosage des métaux et métalloïdes

Le dosage des métaux se fait sur sédiments secs et broyés. Les dosages de 11 métaux et métalloïdes (As, Cd, Co, Cr, Cu, Fe, Hg Mn, Ni, Pb et Zn) ont été réalisés par le laboratoire de chimie du Cemagref de Lyon.

Avant dosage, les échantillons sont minéralisés à l'eau régale (HCl/HNO_3-3/1) au four micro-ondes (MARS-5, CEM). Le mercure est ensuite analysé par un analyseur Hg automatisé (AMA-254) en suivant la procédure standardisée de l'Environmental Protection Agency (1998). Les concentrations des autres métaux sont déterminées par spectrométrie de masse à plasma couplé par induction (ICP-MS, Thermo X7 série II) selon une méthode standardisée ISO (2005). La précision des méthodes de mesure est vérifiée en routine avec des matériaux sédimentaires de référence certifiés (IAEA-433, IAEA-158). Les intervalles de confiance autour de ces mesures varient typiquement de 8 à 20 % selon l'élément.

En parallèle aux dosages des éléments métalliques effectués dans les sédiments, des mesures d'accumulation de huit métaux (Cr, Co, Ni, Cu, Zn, As, Cd, Pb) ont été effectuées pour les trois espèces exposées aux sédiments naturels. Seul le cadmium a été dosé sur les organismes exposés au sédiment dopé. Les organismes des trois espèces ont été congelés, lyophilisés puis minéralisés avec 2 ml d'acide nitrique (HNO_3 Suprapur, 65 %) au four à micro-ondes (MARS-5, CEM). Les concentrations métalliques ont ensuite été déterminées par spectrométrie de masse à plasma couplé par induction (ICP-MS, Thermo X7 série II) selon une méthode standardisée ISO (2005). La précision des méthodes de mesure est vérifiée en routine avec des blancs et des mesures sur matériaux de référence certifiés (hépatopancréas de homard 231 NRCC, TORT-2).

Dosage des micopolluants organiques : hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP) et polychlorobiphényles (PCB)

Les dosages des HAP et des PCB ont été réalisés par le LDA (laboratoire d'analyse accrédité Cofrac, Valence, 26). Les dosages ont été réalisés sur un aliquote de sédiment humide, suivant une procédure normalisée XP-X33012 (AFNOR, 2000).

2. Préparation des sédiments avant les tests

a. Les sédiments bruts

Avant le début des essais les sédiments sont homogénéisés puis 100 ml sont placés dans chaque bécher de 600 ml en polypropylène. Ils sont recouverts de 400 mL d'eau de FOS. Cette eau est un mélange d'une eau naturelle de forage avec de l'eau osmosée, afin d'obtenir une conductivité de 300 µS / cm^{-1}, son pH se situe entre 7,5 et 8,0. Les béchers sont ensuite mis à équilibrer pendant une semaine dans des bains marie à la température qui sera utilisée lors des tests (12 °C pour les tests sur gammares et 21 °C pour les autres espèces). Après cette semaine d'équilibration, le renouvellement continu d'eau de FOS préalablement aérée (4 fois par jour) est mis en place avant l'ajout des organismes.

b. Dopage d'un sédiment de référence en cadmium (Cd)

Pour l'expérimentation de dopage, un sédiment de référence a été prélevé puis dopé en Cd. Il s'agit du sédiment prélevé sur le site de Port Galland sur l'Ain (PG3), présenté dans le chapitre 3.

La contamination artificielle d'un sédiment, appelée « dopage » consiste à mettre le sédiment en présence de la substance que l'on souhaite étudier. Pour cela le composé est préalablement dissous dans un solvant adéquat, l'eau dans le cas d'un dopage en Cd (solution mère à 1 g / L). La quantité de sédiment nécessaire aux tests biologiques et aux analyses chimiques est ensuite mise en bouteille avec de l'eau de FOS suivant un ratio 60 / 40. La quantité de Cd nécessaire pour atteindre les concentrations nominales choisies est ajoutée à partir d'une solution concentrée. Les bouteilles sont ensuite agitées mécaniquement pendant six heures afin de permettre au contaminant de se fixer sur les particules sédimentaires. Les concentrations nominales en Cd ont été choisies pour être représentatives des contaminations environnementales et être réparties autour des valeurs seuils TEC / PEC (MacDonald et al., 2000). Les concentrations nominales suivent une raison de 2,5 et sont les suivantes : 0 ; 0,5 ; 1,3 ; 3,1 ; 7,8 ; 15,5 mg / kg de poids sec (Figure II-3).

Les sédiments ainsi dopés et homogénéisés ont ensuite été placés en béchers suivant le même protocole que pour les sédiments bruts (voir paragraphe précédent).

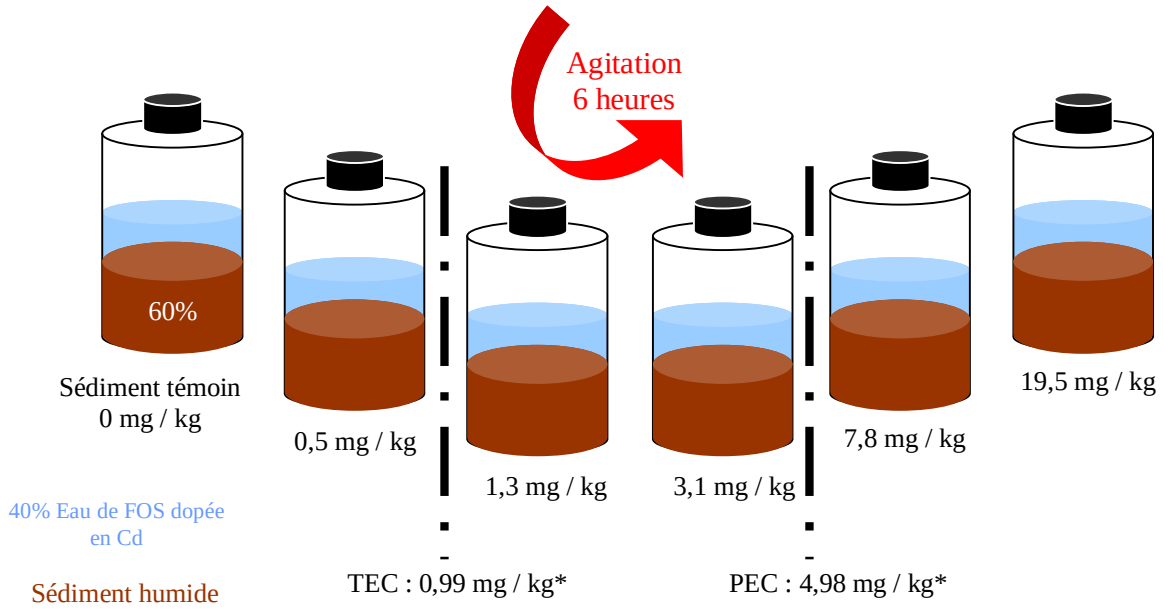


Figure II-3 : Dopage du sédiment de référence en Cd. (*MacDonald et al., 2000)

Après une agitation mécanique par roulage pendant 6 heures, les six bouteilles (une par concentration de dopage) ont été laissées décanter à température ambiante pendant 48 heures, puis lôeau surnageante a été retirée à lôaide dôune pompe. Le contenu de chaque bouteille a ensuite été homogénéisé puis un aliquote a été prélevé pour doser sont contenu en Cd et vérifier lôefficacité du dopage (cf protocole de dosage des métaux). Des extractions séquentielles ont été réalisées par le laboratoire de chimie du Cemagref le Lyon afin de déterminer la spéciation du Cd dans les sédiments. La méthode employée permet de différencier les métaux associés aux carbonates, aux hydroxydes de fer et de manganèse, à la matière organique et aux sulfures (Roulier et al., 2010).

II Origine des organismes, prélèvement, élevage et maintien au laboratoire

1. *Gammarus fossarum*

Les crustacés *G. fossarum* sont collectés dans la rivière Bourbre (France). Les organismes sont prélevés par agitation de la litière et du substrat de la rivière. Lôagitation provoque la fuite des organismes qui sont alors entraînés par le courant dans un troubleau placé à lôaval (maille de 630 µm). Le prélèvement est ensuite tamisé et les individus passés entre les tamis de 2 à 2,5 mm sont récupérés (Figure II-4). Les organismes sont triés (remise à lôeau des espèces protégées et rares). Les gammares sont ensuite transférés dans les bidons en plastique puis transportés au laboratoire dans des glacières pour limiter les variations thermiques.

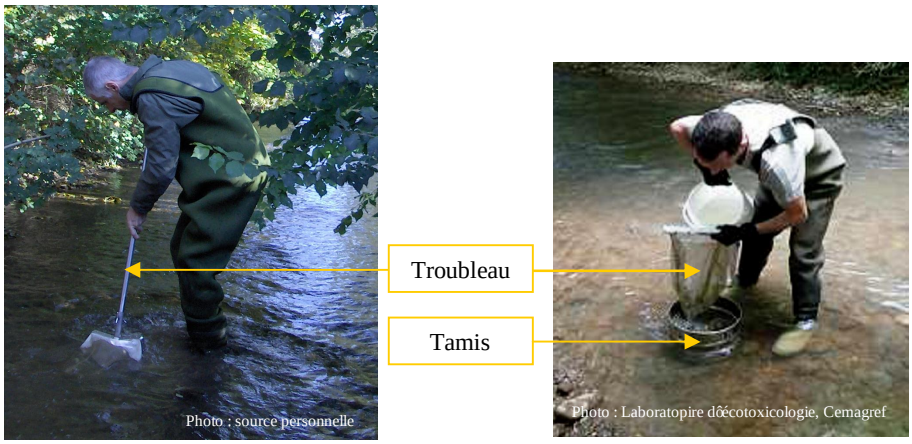


Figure II-4 : Prélèvement au troubleau et tamisage des gammares

Une fois au laboratoire, les bidons sont triés afin de ne conserver que lôespèce dôintérêt. Les gammares adultes sont ensuite placés dans des aquariums de 25 L contenant de lôeau du site de prélèvement. Le tout est maintenu dans un bain-marie thermorégulé à 12 ± 1 °C. Un système de goutte-à-goutte permet de remplacer progressivement lôeau du site par lôeau de FOS à 300 µS / cm. Un système de bullage dans chaque aquarium permet de maintenir le taux

dôoxygène dissous à saturation (figure II-5). La photopériode est contrôlée avec 16 heures de lumière dôune intensité dôenviron 750 lux, pour huit heures dôobscurité.

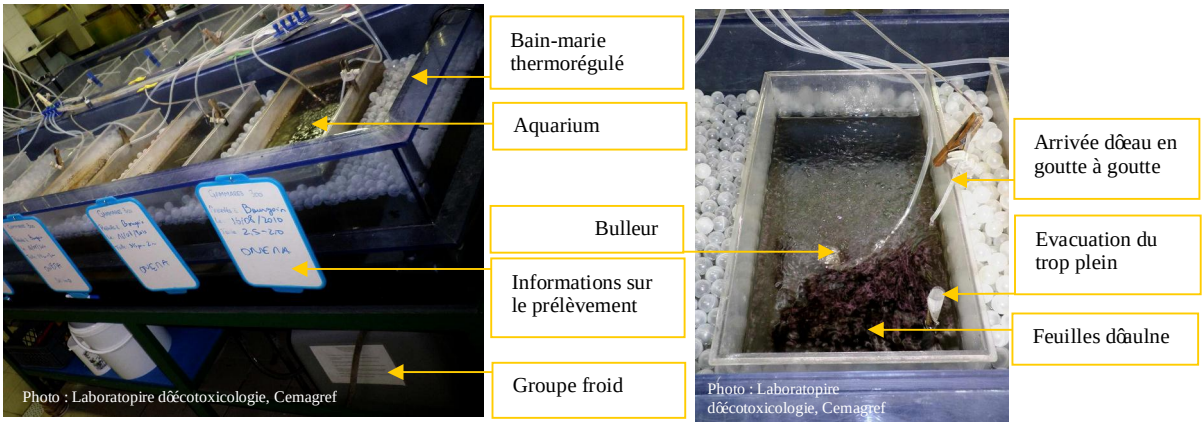


Figure II-5 : Système de stabulation des gammares au laboratoire

Les gammares prélevés sont acclimatés au minimum pendant deux semaines au laboratoire avant leur utilisation pour les bioessais. Pendant cette période ils sont nourris *ad libitum* avec des feuilles dôaulne (*Alnus glutinosa*) et des oligochètes séchés comme complément alimentaire (*Tubifex tubifex*). Les feuilles dôaulne sont récoltées en automne dans une région forestière en amont du cours dôeau peu anthropisée (Ardillats, 69) puis séchées. Avant chaque utilisation elles sont conditionnées pendant une semaine dans lôeau de FOS afin de les réhydrater et de permettre le développement dôun biofilm qui augmente leur appétence.
Dans ces conditions, et après 2 semaines au laboratoire, les femelles porteuses dôembryons prêts à éclore lors du prélèvement, ont relâché des juvéniles dans les aquariums.

2. *Chironomus riparius*

Les insectes *C. riparius* proviennent des cultures du laboratoire dont le protocole dôélevage est décrit dans la norme (AFNOR, 2010). Les animaux sont élevés dans des aquariums de 25 L contenant de lôeau de FOS à 300 µS / cm à 21 ± 1 °C renouvelée en permanence par un système de goutte-à-goutte. Un système de bullage permet de maintenir le taux dôoxygène dissous à saturation. Au fond des aquariums, une couche dôenviron deux centimètres de sable de Fontainebleau® propre (Ø 120 ï 250 µm) permet aux larves de construire leurs fourreaux (figure II-6). La photopériode est contrôlée et permet 16 heures de lumière dôune intensité dôenviron 750 lux, pour 8 heures dôobscurité. Les organismes sont nourris *ad libitum* avec une

solution de Tetramin® (Tetrawerke, Melle, Germany). Le cycle de vie complet et multi-générationnel se déroule sous ces conditions.

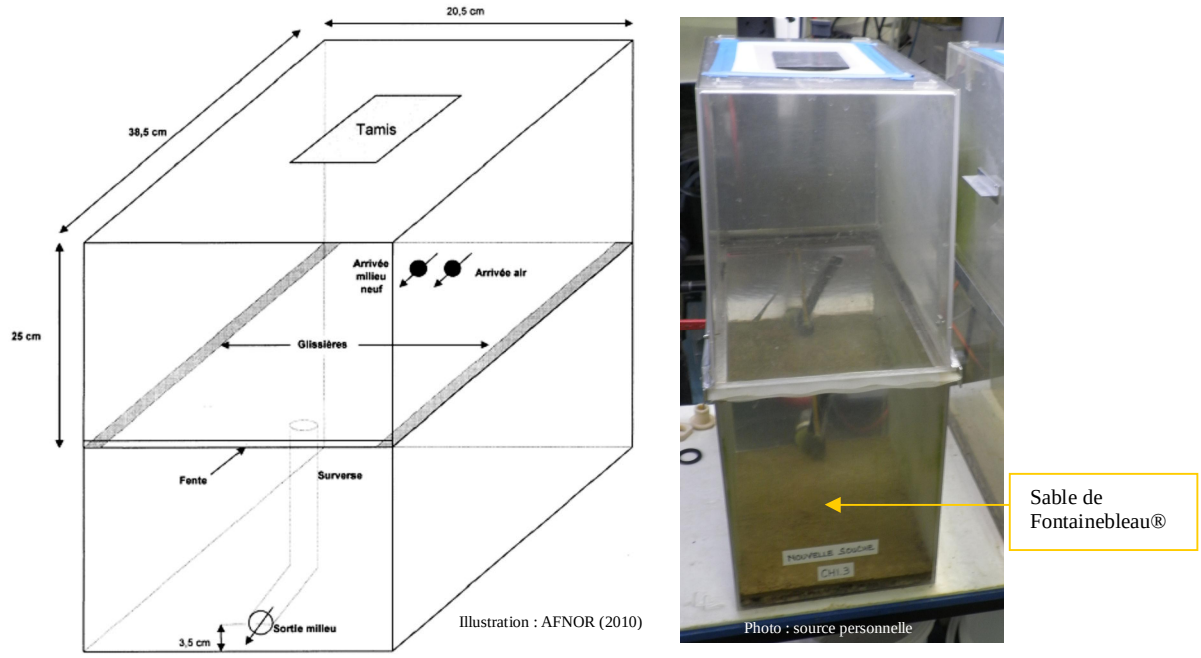


Figure II-6 : Système d'élevage des chironomes au laboratoire

3. *Potamopyrgus antipodarum*

Les mollusques *P. antipodarum* sont collectés dans la rivière Rhône (France). De nombreuses espèces de mollusques vivent sur ce site situé entre deux barrages, la zone forme une étendue lentique ayant permis le dépôt d'un substrat sédimentaire idéal pour ces organismes dont certaines populations sont suivies depuis plusieurs années (Mouthon, 2001; Mouthon, 2011). Le sédiment du Rhône est prélevé avec un troubleau (maille de 630 µm), puis tamisé à 0,5 mm afin d'extraire les organismes. Un premier tri grossier permet d'éliminer du prélèvement les organismes protégés, les débris végétaux et minéraux. Le prélèvement est ensuite transféré dans des bidons en plastique puis ramené au laboratoire. Un nouveau tri est fait afin de ne conserver que l'espèce d'intérêt. Les escargots sont ensuite placés dans des aquariums de 25 L contenant de l'eau du site remplacée progressivement par l'eau de FOS à 300 µS / cm grâce à un système de goutte-à-goutte. Les aquariums sont maintenus à 16 ± 1 °C par un bain-marie thermo-régulé. Un système de bullage permet de maintenir le taux d'oxygène dissous à saturation. La photopériode artificielle est de 16 heures de lumière (750 lux), pour 8 heures

dôobscurité. Les organismes sont nourris *ad libitum* avec une solution à 4 g / L de Tetramin® (Tetrawerke, Melle, Germany), complétée par des épinards.

III Les bioessais

1 Conditions générales d'exposition

Une quantité de 100 ml de sédiment a été déposée au fond de chaque bécher avec 400 ml dôeau de FOS surnageante. Les béchers de sédiments ont été préparés une semaine au préalable (voir § I-3) et laissés à équilibrer dans des bains-marie thermo-régulés à la température de test. Les expérimentations sur les mollusques et les insectes sont conduites à 21 °C. La température dôexposition des gammares est de 12 °C. Après une semaine, des systèmes de renouvellement par pompe péristaltiques dôeau de FOS, préalablement aérée afin de la saturer en oxygène dissous, ont été mis en route (figure II-7). Le taux de renouvellement de lôeau a été fixé à 4 fois par jour.

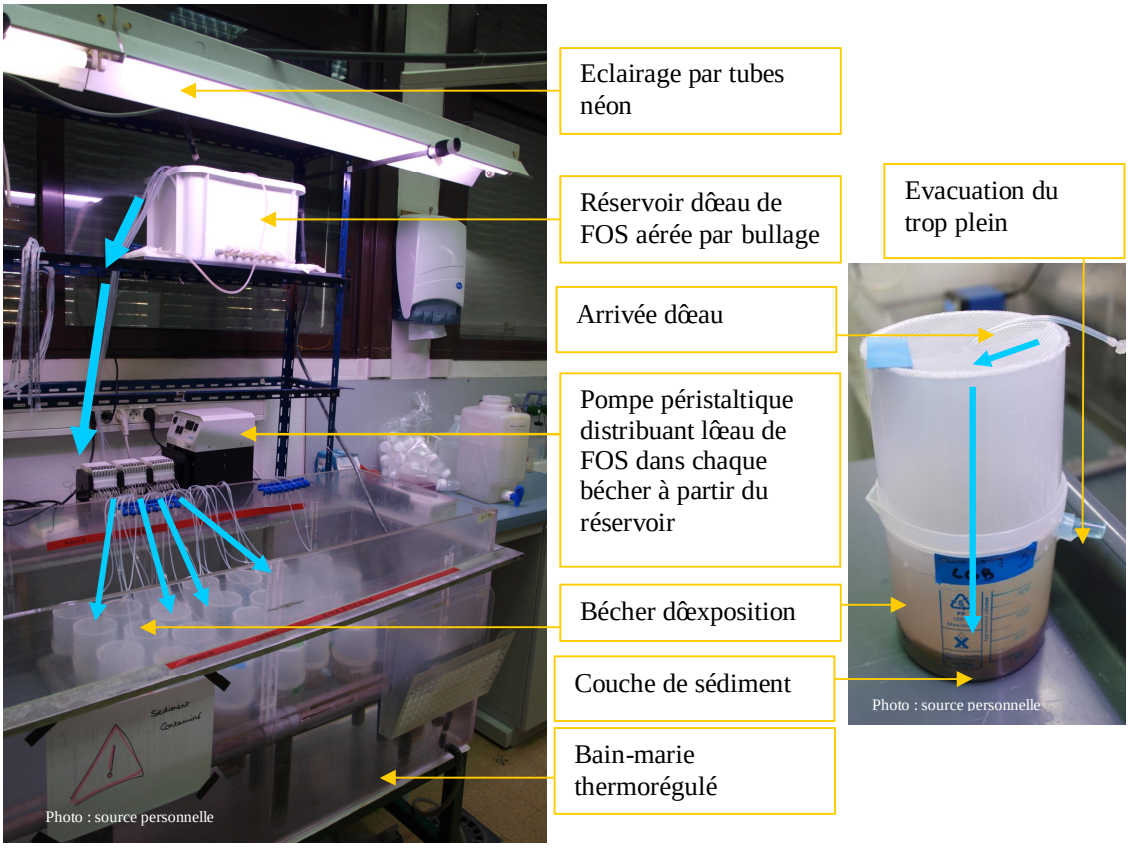


Figure II-7: Matériel dôexposition et de renouvellement de lôeau (le parcours de lôeau est schématisé par les flèches bleues).

Les systèmes d'exposition sont maintenus sous une photopériode identique à celle des élevages avec un cycle jour / nuit de 16 h / 8 h.
Les organismes sont ensuite ajoutés (le nombre de réplicats par sédiment et le nombre d'organismes par réplicat seront détaillés ensuite). Ils sont nourris tout au long des expérimentations suivant des protocoles résumés dans le tableau II-1.

Lors des tests sur chironomes, un couvercle (non étanche pour que l'air circule) a été placé au-dessus de chaque bécher afin de servir de cage pour les adultes émergents. Les béchers utilisés pour les autres espèces n'étaient pas couverts.
Pour les tests sur gammares, un rectangle de 6 * 5 cm de toile à bluter en polyamide, visant à fournir une surface d'accroche aux organismes, a été placée dans chaque bécher. La présence d'une surface d'accroche pour les gammares sert à diminuer leur stress et ainsi minimiser les agressions entre organismes.

Un grand nombre de sédiments ayant été testé (8 références, 11 contaminés naturellement et un sédiment dopé à 5 concentrations, cf chapitre 3), 5 séries d'expérimentations, numérotée S1 à S5, ont été nécessaires.

2 Mesures biologiques sur *Gammarus fossarum*

Des mesures de reproduction sur les femelles adultes (nombre d'embryons, nombre et surface des ovocytes), de taux d'alimentation sur les mâles adultes, de taux de croissance des juvéniles ainsi que des taux de survie des juvéniles et adultes des deux sexes ont été réalisées chez *G. fossarum*.

a. La reproduction des adultes

La méthode utilisée lors de ces tests est dérivée de celle décrite par Geffard et al. (2010). La principale différence de protocole réside dans l'exposition des organismes qui se fait par la phase aqueuse et non par le sédiment comme dans ce travail de thèse.

Afin dôévaluer lôimpact des sédiments sur la reproduction des gammares, des femelles en précopula et se situant en fin de leur cycle de reproduction sont sélectionnées, prêtes à muer et à pondre.

Les organismes sont exposés aux sédiments pendant 3 semaines dans les systèmes précédemment décrits. Durant cette période, ils sont nourris *ad libitum* avec des feuilles dôaulne (*A. glutinosa*) conditionnées comme décrit § II-1, et des larves de *T. tubifex* séchées deux fois par semaine en complément.

A la fin de lôexposition, au moins 10 femelles ayant atteint le stade de reproduction C2 (normalement après 21 jours à 12 °C (Geffard et al. (2010), cf chapitre 1) sont sélectionnées au hasard et analysées pour leur fertilité, leur fécondité, ainsi que la surface de leurs ovocytes.

Le stade de mue est déterminé au microscope optique, par lôobservation des tissus de lôextrémité des périopodes (chapitre 1). Pour cela les périopodes sont coupés aux ciseaux de dissection puis montés dans une goutte dôeau entre lame et lamelle et immédiatement observés.

La fertilité sôévalue par le dénombrement des embryons après leur retrait manuel du marsupium. Ils sont placés dans une goutte dôeau sur une lame de verre puis comptés à lôaide dôune loupe binoculaire (x 30).

Afin dôestimer la fécondité des femelles, le nombre dôovocytes présent dans chaque gonade est compté *in vivo*. Lôobservation se fait au travers de la cuticule transparente, au moyen dôune loupe binoculaire (x 30).

Les femelles sont ensuite positionnées latéralement entre deux lames de verre. Les ovocytes sont photographiés grâce au système de prise dôimage Visilog 6®, monté sur microscope (x 50). Les mesures de surfaces ovocytaires sont réalisées sur ordinateur avec le logiciel dôanalyse dôimage Sigma scan pro 5®, à partir des photos.

Les femelles sont prises en photo dans leur intégralité à lôaide dôune loupe binoculaire équipée dôun appareil photo numérique. Les mesures sont ensuite réalisées sur ordinateur avec Sigma scan pro 5® à partir des photos réalisées. La taille des organismes était mesurée entre le début du prosoma (base de lôantenne) et lôextrémité de lôuromère. En effet, leur taille peut influencer les critères de reproduction tels que le nombre dôembryon par femelle (Sutcliffe, 1993). Le nombre dôovocytes, ainsi que le nombre dôembryons de chaque femelle sont donc pondérés par sa taille à laquelle la taille des femelles à maturité est soustraite (soit 6,5 mm selon Pöckl (1995))[1].

[1] Le calcul de la pondération est le suivant : Variable pondérée = (valeur observée pour la variable) / (taille de la femelle / 6,5)

Pour chaque sédiment des séries de test S1 et S3, 7 adultes en précopula ont été répartis aléatoirement dans chacun des 3 réplicats. Pour S2, seulement 5 adultes en précopula ont été ajoutés dans les 3 béchers par manque de femelles. La mesure de reproduction des gammares pour la série S5 nôa pas pu être effectuée par manque dôorganismes.

b. La croissance des juvéniles

Pour effectuer les mesures de taux de croissance, des juvéniles fraîchement libérés par les femelles sont récupérés dans les aquariums, sur les lots dôadultes ramenés du terrain deux semaines auparavant. Les jeunes sont tous âgés de moins de deux semaines. Leur taille est donc assez homogène. Ils mesurent 2,2 ± 0,1 mm pour S1 et S2 ; 2,3 ± 0,2 mm pour S3 et 2,4 ± 0,2 mm pour S5. Les individus ont été répartis aléatoirement dans les cinq béchers à raison dôau minimum 13 individus par réplicat. Ils sont nourris pendant tout la durée des tests, *ad libitum* avec des petits morceaux de feuilles dôaulne conditionnées (§ II-1), complété une fois par semaine par des fèces dôadultes. Ceux-ci ont été récoltés au préalable au fond des aquariums dôadultes à lôaide dôune pipette, puis congelés afin de sôassurer de lôabsence de gammares vivants dans les fèces qui seront distribués dans les béchers.

Après 4 semaines dôexposition, les jeunes sont à nouveau mesurés. Les données ainsi obtenues permettent dôavoir une estimation de la croissance journalière des individus (C_{jour}), en fonction du sédiment à lôaide de la formule suivante :

C_{jour} = (taille T_{final} ï taille T_0) / nombre de jours dôexposition

Les mesures de taille se font suivant la même méthode que celle décrite auparavant pour la mesure de taille des femelles du test de reproduction (mesure sur photo avec Sigma scan pro 5® de lôantenne à lôextrémité de lôuromère).

Le nombre dôorganisme mis par bécher en début de test est variable dôune série à lôautre en fonction du nombre de jeunes disponibles. Ainsi, respectivement 15, 15, 25 et 13 individus ont été mis dans chacun des cinq béchers des séries S1, S2, S3 et S5.

c. Lôalimentation des mâles adultes

Les protocoles de tests sont dérivés de ceux utilisés par Dedourge-Geffard et al. (2009) et Coulaud et al. (2011). Les individus utilisés sont uniquement des mâles de taille homogène, comprise entre 11 et 12 mm en moyenne, afin dôécarter tout biais lié à une différence de taille, ou au stade de reproduction des femelles qui pourrait influencer leur consommation de feuilles (Coulaud et al., 2011). Au minimum 10 individus sont répartis aléatoirement dans chacun des six réplicats. Sôagissant dôun test portant sur lôalimentation, la quantité de nourriture (*ad libitum*) distribuée a été quantifiée. Ainsi, 15 disques de feuilles dôaulne conditionnées (§ II-1), coupés à lôemporte-pièce à un diamètre de deux centimètres ont été distribués aléatoirement dans chaque bécher. Les individus ont été exposés une semaine dans ces conditions.

Lôestimation de la consommation individuelle journalière (CO_{jour}) est obtenue en faisant la différence entre la surface foliaire (S) en début et fin de test rapportée au nombre de jours dôexposition :

$CO_{jour} = (S_{T0} - S_{Tfinal})$ / nombre de jours dôexposition / nombre dôindividus

La méthodologie employée ici présente un certain nombre dôavantages en comparaison des techniques reposant sur la mesure du poids sec de feuille consommée par poids sec de gammares (Dangles et Guérold, 2000). La mesure de surface offre la possibilité de réaliser une cinétique de mesure à partir dôun même lot de disques de feuilles, et permet dôécarter les biais dans les pesées induits par la formation de biofilm, lôaccumulation de matière organique (notamment dans le cadre de test *in situ*) et lôaccumulation de particules de sédiments sur les disques qui peuvent fausser la mesure de poids sec.

Trois lots de feuilles ont donc été mesurés en début de test et les restes des disques sont récupérés après 7 jours pour être à nouveau mesurés. Pour cela, chaque lot de disque est photocopié puis numérisé (scanner EPSON® perfection 3490 PHOTO®) avant dôêtre analysé sur ordinateur avec le logiciel Sigma Scan Pro 5® (figure II-8). Pour ramener la mesure de consommation totale journalière à une mesure individuelle, le nombre de gammares survivants a été dénombré dans chaque réplicat en fin de test afin de calculer le nombre moyen dôorganismes vivants par réplicat pendant la durée des tests.

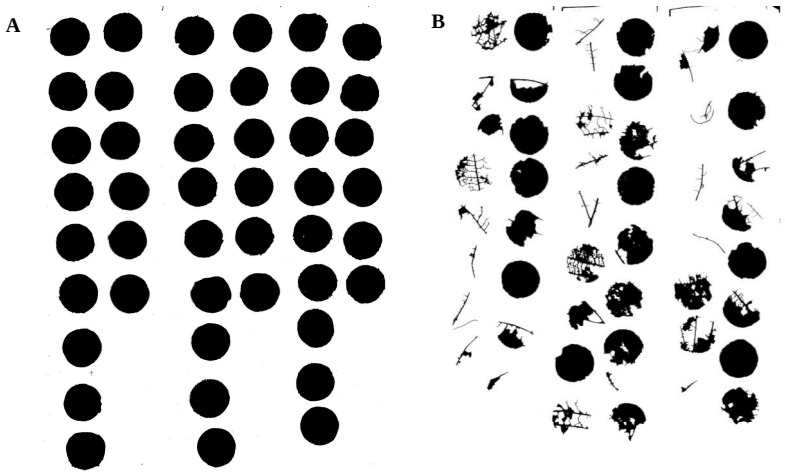


Figure II-8 : Exemple de surfaces folliaires numérisées _ A_ Lots de disques dôaulne avant consommation _B_ Lots de disques dôaulne après consommation.

Pour la première série de tests, 15 individus ont été répartis aléatoirement dans chacun des 6 réplicats par sédiment. Cependant une forte densité dôindividus mâles uniquement dans un faible volume peut conduire à des comportements agressifs entre individus. Pour les séries de test suivantes, le nombre dôindividus par réplicat a donc été diminué à 10 dans chacun des 6 réplicats par sédiment. La taille moyenne des organismes sélectionnés pour chaque série de test est de 11,0 ± 0,8 mm pour S1 ; 11,1 ± 1,1 mm pour S2 ; 12,1 ± 1,3 mm pour S3 et 12,1 ± 1,1 mm pour S5.

d. Les taux de survie

Lors de chaque test, le nombre de survivants a été compté en fin dôexposition. Ainsi les taux de survie ont été calculés pour les adultes mâles et femelles après 3 semaines lors du test de reproduction, pour les mâles adultes après 1 semaine dôexposition lors du test dôalimentation et pour les juvéniles après 4 semaines dôexposition lors du test de croissance.

3 Mesures biologiques sur *Chironomus riparius*

Chez *C. riparius* les traits de vie de croissance (taux de croissance journalier) et d'émergence (taux d'émergence, vitesse de développement des larves) ont été suivis lors des expositions aux sédiments naturels. Les taux de survie lors de ces expositions ont également été mesurés.

Pour les deux traits de vie de croissance et d'émergence, les protocoles de mise en bécher et les conditions d'exposition sont strictement identiques. Les tests suivent les recommandations de la méthode standard NF T90-339-1 (AFNOR, 2010).
Après récupération, les masses d'œufs, fraichement pondues dans les aquariums d'élevage, sont mises à éclore à l'étuve à 22 °C. Après 24 heures, les masses non écloses sont éliminées. Après 48 heures, les jeunes larves sont placées dans des récipients avec un peu de silice leur permettant de faire un fourreau, et de la nourriture à poissons Tetramin® à raison de 50 mg par masse. Les larves sont laissées ainsi à grandir pendant 48 heures afin qu'elles atteignent une taille minimum de 1,5 mm. Les tailles moyennes des larves mises en bécher au début des tests sont les suivantes de 1,5 ± 0,1 mm pour S1 ; 1,6 ± 0,1 mm pour S2 et S5 ; 1,9 ± 0,1 mm pour S3 et 2,5 ± 0,2 mm pour S4. Les larves, au nombre de 15 pour S1 et de 10 pour les autres séries, ont été placées dans chacun des huit réplicats par sédiment des séries S1, S3, S4 et S5 et les six réplicats par sédiment de la série S2.
Les larves sont prises en photo grâce à un appareil numérique monté sur loupe binoculaire. Les mesures sont ensuite effectuées sur ordinateur avec le logiciel d'analyse d'image JmicroVision 1.2.7®. Au moins 10 larves sont ensuite réparties aléatoirement dans les réplicats (au moins 6). Le jour de la mise en bécher, les larves sont nourries à raison de 1,2 mg de Tetramin® par individu puis laissées pendant deux jours. La nourriture est ensuite distribuée quotidiennement avec 0,6 mg de Tetramin® par individu.

e. La croissance des larves

Après 1 semaine d'exposition dans les conditions précédemment décrites, les larves de la moitié des réplicats sont à nouveau mesurées (photo et analyse avec Jmicro Vision®). Les

données ainsi obtenues permettent dôavoir une estimation de la croissance journalière des individus (C_{jour}), en fonction du sédiment :

C_{jour} = (taille T_{final} ï taille T_0) / nombre de jours dôexposition

f. Lôémergence des imagos

Dans la seconde moitié des réplicats, le nombre dôadultes ayant émergé est compté quotidiennement jusquôau dernier jour de test (après quatre semaines) en distinguant les mâles des femelles. Ces données permettent de calculer les taux moyens dôémergence ainsi que les vitesses de développement des mâles et des femelles, respectivement selon les équations 1 et 2 (OCDE, 2010). A la fin des tests les larves vivantes nôayant pas émergées sont également dénombrées.

Equation 1 : $$TE = \frac{n_e}{n_a}$$

Où :

TE = taux dôémergence

n_e = nombre de moucherons vivants émergés par récipient

n_a = nombre de larves introduites par récipient

Equation 2 : $$\bar{x} = \sum_{i=1}^{m} \frac{f_i x_i}{n_e}$$

Où :

$\bar{x}$ = vitesse de développement moyenne par récipient

i = indice de lôintervalle dôobservation

m = nombre maximal dôintervalles dôobservation

f_i = nombre de moucherons émergés durant le temps i

n_e = nombre total de moucherons émergés à la fin de lôexpérience $(= \sum f_i)$

x_i = vitesse de développement des moucherons émergés durant le temps i (Equation 3)

Equation 3 : $$x_i = \frac{1}{\left(jour_i - \frac{l_i}{2}\right)}$$

Où :

$jour_i$ = jour dôobservation (nombre de jours depuis lôintroduction des larves)

l_i = longueur de lôintervalle dôobservation i (exprimée en jours)

g. Les taux de survie

Afin de calculer un taux de survie, le nombre de survivants a été compté en fin d'exposition pour les tests de croissance (7 jours). Pour le test d'émergence, le nombre de survivants correspond au nombre de larves vivantes retrouvées en fin d'exposition dans le sédiment additionné du nombre d'adultes ayant émergé au bout des 28 jours d'exposition.

4 Les mesures biologiques sur *Potamopyrgus antipodarum*

Des mesures de reproduction des adultes (nombre d'embryons par femelle) et de croissance des juvéniles (taux de croissance journalier) ont été effectuées chez *P. antipodarum*. La survie des organismes adultes et juvéniles a également été suivie.

a. La reproduction des adultes

Les protocoles utilisés dans ce travail ont été dérivés d'une méthode décrite par Duft et al. (2003). Une vingtaine d'adultes reproducteurs (d'au moins 3,6 mm) sont répartis aléatoirement dans chacun des réplicats (au moins deux). Pendant les six semaines d'exposition, les animaux ont été nourris *ad libitum* par une solution de nourriture pour poissons (Tetramin®) à raison de 6 mg par adulte et par jour ouvré.
Les mesures de fécondité se font par dénombrement des embryons contenus dans la poche embryonnaire de chaque femelle. Pour cela, la coquille de chaque individu est cassée à l'aide d'une clé à molette plastifiée, la poche embryonnaire ouverte puis le nombre d'embryon compté sous loupe binoculaire. Deux types d'embryons sont distingués : les embryons non coquillés nouvellement formés et les embryons coquillés prêts à être pondus (Figure II-9). Le nombre moyen d'embryons par femelle est ensuite calculé.

Des adultes reproducteurs d'une taille moyenne de 4,3 ± 0,3 ; 4,6 ± 0,3 ; 4,4 ± 0,4 et 4,8 ± 0,3 mm ont été utilisés pour les séries S1, S2, S3 et S5 respectivement. Les organismes ont été répartis aléatoirement dans chacun des 2 (S1 et S2) ou 4 réplicats par sédiment (S3 et S5). En

fonction du nombre dôorganismes disponible, 21 (S3), 25 (S1), 28 (S3) ou 29 (S5) individus ont été répartis dans chaque réplicat.

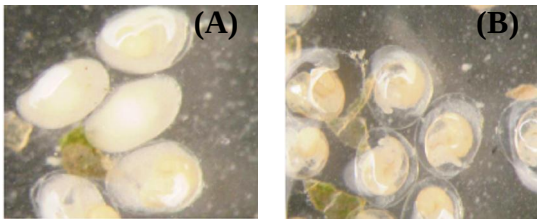


Figure II-9 : Embryons *P. antipodarum* sortis de la poche embryonnaire dôune femelle (A) Embryons sans coquille (B) Embryons avec coquille

b. La croissance des juvéniles

Pour les 3 premières séries de tests, 25 juvéniles ont été répartis aléatoirement dans chacun des 3 réplicats par sédiment. Par manque dôorganismes, seulement 20 individus ont été répartis dans les 3 réplicats par sédiment pour la série S5. La taille des juvéniles sélectionnés est homogène pour les sédiments dôun même test mais des différences existent entre séries. En effet, le nombre dôindividus disponibles par classe de taille a varié selon les séries de tests. Les juvéniles exposés mesuraient 1,7 ± 0,0 mm ; 2,1 ± 0,1 mm ; 2,6 ± 0,2 mm et 2,7 ± 0,2 mm pour les séries S1, S2, S3 et S5 respectivement.

Les organismes ont été nourris *ad libitum* pendant les 6 semaines de test à raison de 4,5 mg de Tetramin® par individu et par jour ouvré.

Les individus sont mesurés sur la plus grande longueur de coquille lorsque celle-ci est positionnée avec lôopercule visible. Ils sont photographiés en début et fin dôessai, et la taille est mesurée sur ordinateur avec le logiciel Sigma scan pro 5®. Les données ainsi obtenues permettent dôavoir une estimation de la croissance par jour des individus (C_{jour}) en fonction du sédiment :

C_{jour} = (taille T_{final} ï taille T_0) / nombre de jours dôexposition

Ces taux de croissance individuels sont ensuite moyennés pour chaque réplicat.

c. Les taux de survie

Les survivants, adultes et juvéniles mobiles, ont été dénombrés en fin d'exposition, après six semaines, lors des tests de croissance et de reproduction.

5 Suivi physico chimique des tests

Des mesures physico-chimiques de température, conductivité, oxygène et pH, sont réalisées quotidiennement (jours ouvrés) dans un bécher de chaque condition à l'aide d'un multimètre multi sondes WTW Multi350i (pH, conductivité et température) et d'un oxymètre. Des mesures de concentrations en nitrite et ammonium (JBL TESTSETS) sont réalisées une fois par semaine dans le même bécher.

6 Dosage des métaux accumulés dans les organismes

Pour les crustacés et les insectes, les organismes utilisés pour les dosages sont ceux issus respectivement de 3 des réplicats de chaque sédiment des tests d'alimentation et de croissance après 7 jours d'exposition. Les mesures des traits de vie lors de ces tests n'étant pas destructives, les organismes ont été récupérés et congelés. Pour les mollusques, les mesures de reproduction effectuées sur les adultes étant destructives, un bécher supplémentaire par sédiment contenant 105 individus adultes a été ajouté lors des tests de reproduction. Pendant l'exposition, les gastéropodes ont été nourris avec la même quantité de Tetramin que pour les adultes des tests de reproduction (0,6 mg par individu et par jour ouvré). Après 10 jours, les organismes ont été comptés puis répartis en trois réplicats de 35 organismes, avant d'être décoquillés.

Pour chaque espèce, les triplicats de pools d'organismes ainsi formés, ont été congelés puis lyophilisés. Les métaux accumulés ont ensuite été dosés. La quantité moyenne de métaux accumulés a ensuite été calculée pour chaque triplicat. Les résultats sont présentés dans l'ANNEXE 1.

	G. fossarum			*P. antipodarum*		*C. riparius*	
Paramètre	**test reproduction**	**test alimentation**	**test croissance**	**test reproduction**	**test croissance**	**croissance**	**émergence**
Milieu	Eau de FOS (mélange dôeau naturelle et dôeau osmosée pour obtenir la conductivité souhaitée)						
Conductivité ε S/cm	300						
pH	7,5 ï 8,0						
Dureté (mg/L CaCO3)	250						
Température (°C)	12 +/- 1			21 +/- 1			
Eclairage	Tubes néon						
Photopériode	16:08						
Récipient dôessai	Béchers 600ml						
Volume dôeau	400 ml						
Renouvellement de lôeau	continu : 4 fois par jour environ						
Aération	Lôeau est oxygénée par bullage avant dôarriver dans les béchers						
Taille des organismes en début de test (mm)	-[2]	11,0 à 12,1	2,2 à 2,4	4,3 à 4,8	1,7 à 2,7	1,5 à 2,5	
Nombre dôorganismes par réplicat (variable selon les séries de test)	5 à 7 couples	10 à 15 mâles adultes	13 à 25 juvéniles	21 à 29 adultes	20 à 25 juvéniles	10 à 15 larves	
Nombre de réplicats par substrat	3	6	5	2 à 4	3	3 à 4	
Nourriture (les quantités distribuées correspondent à des doses *ad libitum*)	feuilles dôaulne conditionnées + larves de tubicicidés deux fois semaine	15 disques feuilles dôaulne conditionnées par bécher	Feuilles dôaulne conditionnées + fèces dôadultes deux fois par semaine	Solution de TetraMin® : 0,6 mg finement broyé par animal et par jour ouvré	Solution de TetraMin® : 0,45 mg finement broyé par animal et par jour ouvré	Solution de TetraMin® : 0,6 mg finement broyé par animal et par jour	
Durée du test (semaines)	3	1	4	6		1	4
Ratio substrat / eau de FOS	1 / 4						

Tableau II-1 : Récapitulatif des conditions de test

[2] Les femelles ne sont pas sélectionnées sur un critère de taille mais sur leur stade du cycle de reproduction (Geffard et al., 2010).

IV Traitement statistique des données

Le développement des biotests pour la mesure de toxicité des sédiments comprend 2 étapes correspondant (i) à la définition des seuils référentiels (SR) de réponse biologique en conditions de référence et (ii) à la comparaison des réponses biologiques en conditions contaminées, avec le référentiel précédemment défini. L'analyse des données récoltées a donc été réalisée en 2 étapes :

- Pour chaque critère de mesure pour les différents traits de vie, les moyennes et les percentiles à 95 % de la distribution des valeurs ont été calculés à partir des réponses biologiques obtenues sur les sédiments de référence. Ces moyennes et percentiles ont permis de proposer un référentiel de réponses en condition pas ou peu contaminées.
- Les réponses obtenues en conditions contaminées ont ensuite été comparées au référentiel précédemment calculé afin de déterminer l'effet de la contamination sur chaque trait. Pour les sédiments dopés en Cd, une étape supplémentaire a été ajoutée. Il s'agit de comparer les 5 concentrations de dopage du sédiment PG3 (de 0,5 à 19,5 mg / kg ps) au témoin non dopé (approche dose-réponse classique).

Le traitement statistique des données a été effectué avec les logiciels Statistica ® 7.1 pour Windows (StatSoft Inc., Tulsa OK, USA) et R (R Development Core Team, 2009).

1 Définition des gammes de réponses en conditions de référence

Pour établir le référentiel de réponse, de chacun des traits, pour chaque espèce, sur sédiments naturels de référence, nous avons commencé par vérifier s'il existait des différences significatives de réponses entre sédiments de référence. Pour cela nous avons vérifié la normalité (tests Shapiro) et l'homoscédasticité (Levene ou Cochran) des données pour chaque critère de mesure.

En cas de non normalité d'un jeu de données, la médiane constitue un indicateur plus représentatif de ces données que la moyenne. En cas de normalité, la moyenne et la médiane sont de bons descripteurs du jeu de données. Pour de nombreux critères de mesure suivis, la distribution des données n'était pas normale. Pour chaque critère de mesure, nous avons donc

décidé dôutiliser la réponse médiane pour chaque sédiment comme descripteur pour la représentation des données recueillies, que le jeu de données soit normal ou non.
Lôexistence (ou lôabsence) de différence de réponse des traits entre sédiments de référence a ensuite été vérifiée à lôaide de tests statistiques appropriés (ANOVA lorsque les conditions de normalité et dôhomoscédasticité étaient remplies ou Kruskal-Wallis si ces conditions ne sont pas remplies). Ces tests ont été réalisés avec le logiciel Statistica ®.

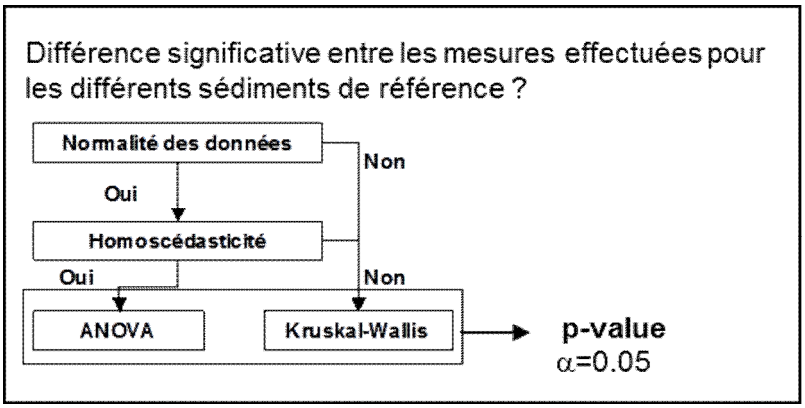


Figure II-10 : Méthode de vérification de lôinfluence des caractéristiques géochimiques des sédiments sur les réponses les critères de mesure biologiques.

Cette étape de caractérisation des données établie, 2 méthodes ont été mises en î uvre pour définir les seuils référentiels de réponse (Figure II-11):

A- Pour un critère de mesure sur un trait donné (ex : trait de vie « reproduction de *G. fossarum* », critère de mesure « nombre dôembryons par femelle »), sôil existe une différence significative des réponses biologiques obtenues entre les différents sédiments de référence, les résultats obtenus pour chaque sédiment doivent être traités de manière indépendante.
1) Pour chaque réplicat de chaque sédiment, la réponse moyenne du critère de mesure est calculée.
2) Puis, pour chaque sédiment la réponse médiane des critères de mesure est calculée (médiane des moyennes des réplicats).
3) Enfin, pour chaque critère de mesure, la distribution des médianes par sédiment, obtenues sur lôensemble des sédiments de référence testés, est analysée. Elle permet de calculer une moyenne (moyenne des médianes par sédiment) et les bornes minimum et maximum du référentiel qui correspondent aux seuils de référence (SR) du trait. Les seuils minimum et maximum, que nous nommerons SR_{min} et SR_{max}, correspondent à lôintervalle dans lequel se trouvent 95 % des réponses obtenues en conditions de référence, basés sur les $2,5^{ième}$ et

97,5^{ième} centiles de la distribution de données pour lœensemble des traits à lœexception des mesures de survie des 3 espèces et des taux dœémergence des chironomes. Pour ces 2 traits, seule une borne inférieure (SR_{min}) correspondant au 5^{ième} centile[3] de la distribution de données a été calculée.

B- Pour un critère de mesure sur un trait donné, sœil nœy a pas de différence significative des résultats obtenus entre les sédiments de référence, il est possible de regrouper lœensemble des valeurs des réplicats, obtenus indépendamment pour chaque sédiment, en un seul jeu de données. Les référentiels de réponse sont ensuite définis comme suit :

1) Pour chaque réplicat de chaque sédiment, la valeur médiane du critère de mesure est calculée.

2) Puis, pour chaque critère de mesure, la réponse moyenne (moyenne de médianes par réplicat) et les seuils de référence (SR_{min} et SR_{max}) associés sont calculés pour tous les sédiments confondus. Ces valeurs seuils sont calculées de la même façon que pour la méthode A.

Il est important de noter que pour un jeu de données, lorsque la méthode B est applicable, la méthode A précédemment décrite lœest aussi.

[3] Le calcul de seuils de réponse (SR) se fait selon la formule suivante : $SR = [\ \bar{x} \pm 1{,}96 * se\ ;\ \bar{x} + 1{,}96 * se\ ]$ ou $\bar{x}$ représente la moyenne et *se* lœécart type du jeu de données. Pour les mesures de survie et le taux dœémergence des chironomes la formule employée est la suivante : $SR = [\ \bar{x} \pm 1{,}645 * se\ ]$

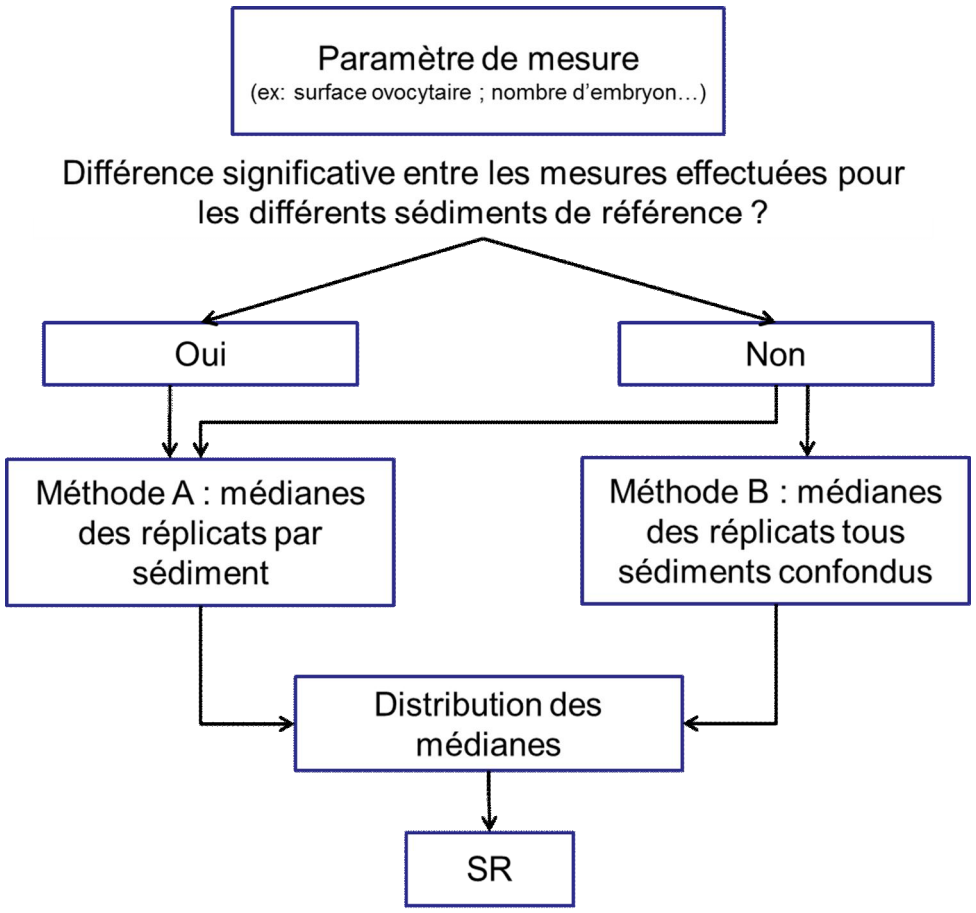


Figure II-11 : Méthodes de calcul des seuils référentiels de réponse (SR) en conditions de référence.

Dans le cadre de notre travail, en fonction du critère de mesure considéré, nous avons observé soit des différences significatives (méthode A applicable seulement) soit non significatives entre les sédiments (méthodes A et B applicables) (Tableaux IV-1 IV-2 et IV-3). Pour lôuniformisation et la simplicité de traitement des données, nous avons utilisé la méthode A uniquement pour lôensemble des critères de mesure.

Pour chaque trait, les coefficients de variation (CV) intra-sédiment et inter-sédiments ont été calculés afin dôestimer respectivement la variabilité de réponse liée à la plasticité naturelle du critère de mesure, et celle liée au sédiment.

2 Impact des sédiments contaminés

a. Comparaison des réponses des critères de mesure obtenues en conditions contaminées avec les référentiels de réponse définis sur sédiments de référence

Une fois les valeurs moyennes et les SR obtenus pour chaque trait, suite aux expositions en conditions de référence, les réponses des mêmes traits en conditions contaminées ont été comparées aux SR précédemment définis. Les sédiments contaminés ayant des caractéristiques géochimiques comparables aux sédiments de référence, des réponses des traits de vie différentes de celles obtenues en conditions de référence, nous postulons que ces différences peuvent être attribuées à la présence de contaminants. En revanche, si la réponse en conditions contaminées se situe dans le référentiel, lœffet des caractéristiques intrinsèques du sédiment et lœffet potentiel des contaminants ne peuvent être dissociés.

Pour chaque trait de vie, les réponses en conditions contaminées ont donc été calculées sédiment par sédiment, suivant la même méthode que celle appliquée en conditions de référence. Les réponses de chaque sédiment ont ensuite été comparées au référentiel défini en conditions de référence (Figure II-12).

b. Sédiment dopé : relation dose réponse

Lors de biotests sur sédiments dopés, la méthode la plus couramment utilisée pour vérifier les effets des contaminants sur les traits de vie consiste en lœétude des relations dose-réponse. Cela permet également de calculer les concentrations non toxiques pour chaque trait de chaque espèce. Nous avons appliqué cette méthode au sédiment dopé en cadmium sur les 5 concentrations allant de 0,5 à 19,5 mg / kg en les comparant aux résultats obtenus sur le témoin non dopé PG3[0].

Pour cela plusieurs tests statistiques ont été effectués :

1) Les conditions de normalité des données pour chaque paramètre de mesure (taille, nombre dœembryoné) et de lœhomogénéité des variances ont été vérifiées.

2) Si ces conditions sont remplies, un test paramétrique dœanalyse des variances (ANOVA) a été réalisé. Si ces conditions ne sont pas remplies, ou en cas de nombre de données trop faible, un test équivalent non paramétrique (Kruskal-Wallis) a été réalisé.

3) En cas de différence statistiquement significative montrée pas les tests précédents, des tests t de Dunnett (dans le cas d'une ANOVA) ou des tests U de Mann-Whitney (dans le cas d'un Kruskal-Wallis) sont réalisés pour la comparaison post-hoc des réponses obtenues pour chaque trait, entre les différentes concentrations afin de déterminer les concentrations induisant un effet significatif sur le critère de mesure concerné.

Les taux de survie des 3 espèces sont analysés à l'aide des tests de proportion (réalisé sous R). Le test d'émergence des chironomes n'a pas été traité suivant cette méthode, mais d'après les recommandations de l'OCDE 233 (2010), via des tests de Cochran-Armitage régressifs, qui permettent de déterminer les concentrations non toxiques.

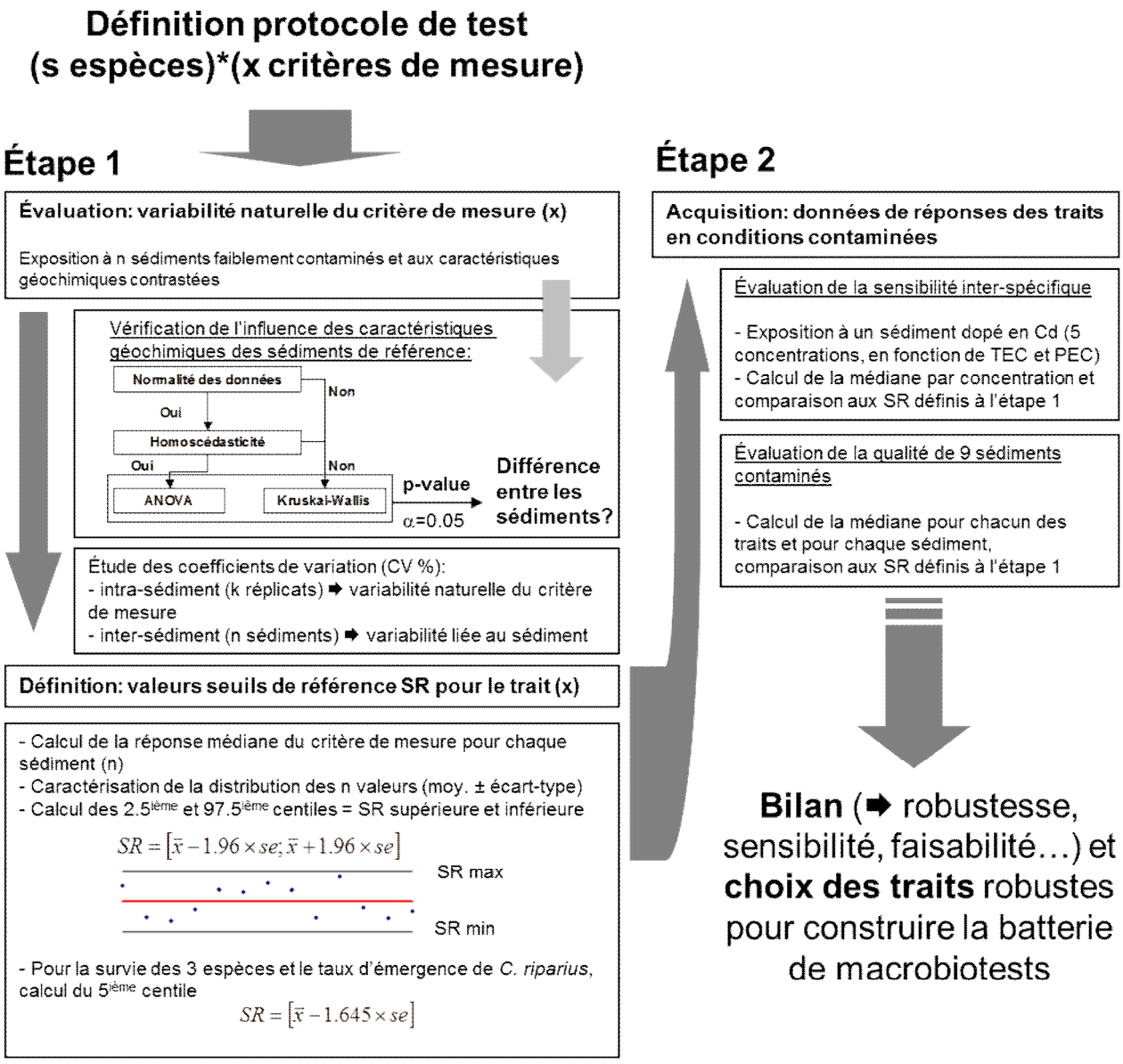


Figure II-12 : Démarche statistique employée (méthode A) pour la définition des seuils de référence (SR) en conditions de référence (étape 1) auxquels seront confrontées les réponses obtenues sur sédiments contaminés (étape 2).

Chapitre 3

Présentation des sédiments testés

Lôobjectif de ce travail de thèse est de développer une batterie de biotests pour lôévaluation du risque associé aux sédiments contaminés. Ces biotests consistent en une série de mesures biologiques telles que lôévaluation de taux de croissance ou de niveaux de reproduction qui peuvent être modifiés par la présence de contaminant. Cependant les caractéristiques intrinsèques des sédiments sont susceptibles elles aussi de moduler ces réponses biologiques, par exemple la quantité de matière organique disponible va conditionner la croissance de certaines espèces (Vos et al., 2000).

Pour mener à bien notre approche, le choix des sédiments de test est fondamental. En effet le panel de sédiments sélectionnés doit répondre à plusieurs critères :

1) Les propriétés géochimiques des sédiments peuvent moduler les traits de vie des organismes. Il est donc nécessaire que les sédiments de référence qui vont servir à déterminer la part de variabilité des traits liée à ces propriétés, **présentent des caractéristiques géochimiques très variées** (granulométrie grossière à fine ; richesse ou pauvreté en matière organique é), et représentatives des sédiments dôeau douce français.
2) Afin de pouvoir comparer les réponses des traits de vie sur sédiments de référence avec les réponses sur sédiments contaminés, il est nécessaire que les **caractéristiques géochimiques**, hors contamination, des deux types de sédiments soient **comparables**.
3) **Les sédiments de référence doivent être le moins contaminés possible** afin que les effets sur les traits de vie qui seront observés lors de la détermination des propriétés intrinsèques des sédiments, ne soient pas liés à la présence de toxique.
4) Inversement, pour évaluer lôimpact des contaminants sur la biologie des organismes, **les sédiments dits contaminés** doivent se différencier des références par leur **contamination plus importante**. De plus, tous les contaminants nôayant pas les mêmes modes dôaction ni les mêmes effets, il est nécessaire de tester **des typologies de contaminations variées**.

Ce chapitre a pour objectif de présenter lôapproche utilisée afin de sélectionner les sédiments utilisés pour construire la batterie de biotests. Les principales caractéristiques géochimiques ainsi que les niveaux de contamination des sédiments sont également détaillés dans ce chapitre.

I Choix des sites de prélèvement

La qualité dôun sédiment peut être mesurée dôun point de vue chimique par dosage des contaminants présents. Cependant la présence de contaminants ne signifie pas que le sédiment en question sera toxique, en particulier si ces contaminants ne sont pas biodisponibles pour les organismes. La biodisponibilité est définie comme la possibilité quôa un contaminant, adsorbé sur des particules sédimentaires ou présent dans lôeau interstitielle, dôatteindre les interfaces des organismes vivants où il peut être absorbé. Le contaminant une fois dans lôorganisme peut sôy accumuler et / ou avoir un effet toxique (Landrum et Robbins, 1990).

De plus, étant donné le nombre de molécules chimiques retrouvées dans lôenvironnement, il nôest pas possible de doser tous les contaminants potentiellement présents (temps / argent). Les dosages chimiques ne sont donc jamais exhaustifs et peuvent ne pas mettre en évidence une contamination pourtant non négligeable.

La qualité dôun sédiment peut aussi être évaluée par diverses mesures biologiques permettant la mesure dôeffets toxiques sur les organismes (diminution de la survie, modification de la reproduction, inhibition de croissanceé). Lôobservation dôeffets toxiques sur des organismes du milieu ou lors de biotests, peut être considérée comme une indication de la présence de contaminants. Cependant cette approche biologique présente des inconvénients. En premier lieu il faut être capable de distinguer un effet toxique lié à la présence de contaminant dôun effet lié aux propriétés intrinsèques des sédiments. En effet, des caractéristiques telles que la quantité de MO ou la granulométrie peuvent impacter les réponses des traits de vie des organismes (Stuijfzand et al., 2000; Vos et al., 2002). Pour permettre cette distinction, il faut avoir au préalable mesuré la variabilité naturelle de réponse des traits de vie face aux différentes caractéristiques sédimentaires. Cette approche ne donne pas dôinformation sur le contaminant ou le mélange de contaminants présent induisant les effets éventuellement observés.

Ces deux approches, chimique et écotoxicologique, sont complémentaires puisque les inconvénients de lôune sont les points forts de lôautre. Cependant, lôobjectif de la thèse est de développer des outils pour évaluer la toxicité des sédiments. Il sôagit de rendre compte de lôimpact des contaminants sur les organismes des écosystèmes aquatiques. Lôaccent a donc été mis sur lôapproche écotoxicologique (figure III-1).

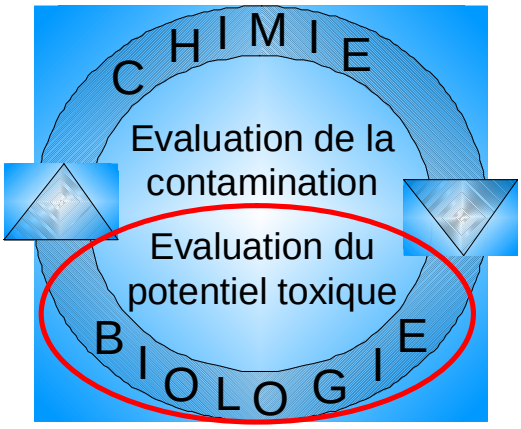


Figure III-1 : Méthode dôévaluation de la qualité des sédiments.

1. Sélection des sites de référence

Pour définir un référentiel de réponse en conditions « de références » nous avons cherché des sédiments aux caractéristiques géochimiques variées et non contaminés, ou à défaut présentant de faibles contaminations. Etant donné le contexte actuel, il est difficile de trouver des sédiments exempts de toute trace de contaminant, ainsi, un sédiment que nous appellerons « de référence » est un sédiment qui ne contient pas ou peu de contaminants. La sélection des sites sôest effectuée suivant une méthode *a priori*, notamment suivant un critère de pression anthropique faible et grâce aux connaissances antérieures du laboratoire.

La qualité des sites a tout dôabord été jugée dôaprès les critères suivants :

- Les données antérieures disponibles au laboratoire : lors dôétudes précédentes des analyses de sédiments avaient été réalisées (dosages ; granulométrieé), côest le cas par exemple des sédiments de Port Galland ou Neyrieux (Tableau III-1). Dôautres sites hébergent des populations pérennes de macro-invertébrés, laissant supposer une bonne qualité du site. Côest le cas du sédiment du chenal du Rhône à Creys-Malville où sont prélevés les mollusques utilisés pour les tests au laboratoire, et du sédiment de la Bourbre, qui est le lieu de prélèvements des gammares (Tableau III-1).

- La localisation géographique des sites : les activités humaines étant la principale source de contamination, les sites sélectionnées comme références sont principalement localisés dans des zones peu anthropisées ou en amont des cours dôeau, comme les sédiments de Neyrieux,

de la Bourbre et les 2 sites de prélèvement sur la Loue dans le Doubs (25) (Tableau III-1 ; Figure III-2).

- La qualité hydrobiologique des sites : nous avons recherché des données hydrobiologiques disponibles sur les stations les plus proches des sites de prélèvement. Des informations ont été trouvées via les réseaux de lôagence de lôeau Rhône Méditerranée Corse (RMC) et la DIrection Régionale de lôENvironnement (DIREN) pour cinq indices biologiques différents que sont lôIndice Biologique Global Normalisé (IBGN), lôIndice Biologique Diatomées (IBD), lôIndice de Polluosensibilité Spécifique (IPS), lôIndice Poisson Rivière (IPR) et lôIndice Biologique Macrophytique en Rivière (IBMR). Les données recueillies sont parfois anciennes (récoltées entre 1992 et 2009) et les stations de mesure les plus proches des sites de prélèvement sont parfois assez éloignées, ou même sur un cours dôeau différent par exemple un affluent. Les données sont présentées dans le Tableau III-2. Pour lôensemble de stations proches des sites de prélèvement pour lesquelles des informations sur la qualité hydrobiologique ont été trouvées, les notes sont globalement bonnes (site du Rhône avec des IPS et IBD entre 14 et 16) à très bonnes (site de la Bourbre avec IBGN de 16 ; site de la Loue avec IBGN de 15 et 17, IDB de 18 et 20 et IPS de 16 et 19 ; et site de lôAin avec IBGN de 14 à19, IDB de 19 à 20, IPS de 16 à20 et IBMR de 10).

- Des critères techniques se sont ajoutés aux critères de qualité. En effet, les sites devaient être accessibles en voiture et permettre une mise à lôeau pour lôembarcation lorsque celle-ci était nécessaire. Les sites ont également été sélectionnés sur des cours dôeau présentant une profondeur dôeau de 30 cm au minimum afin que les prélèvements effectués contiennent des sédiments immergés en permanence.

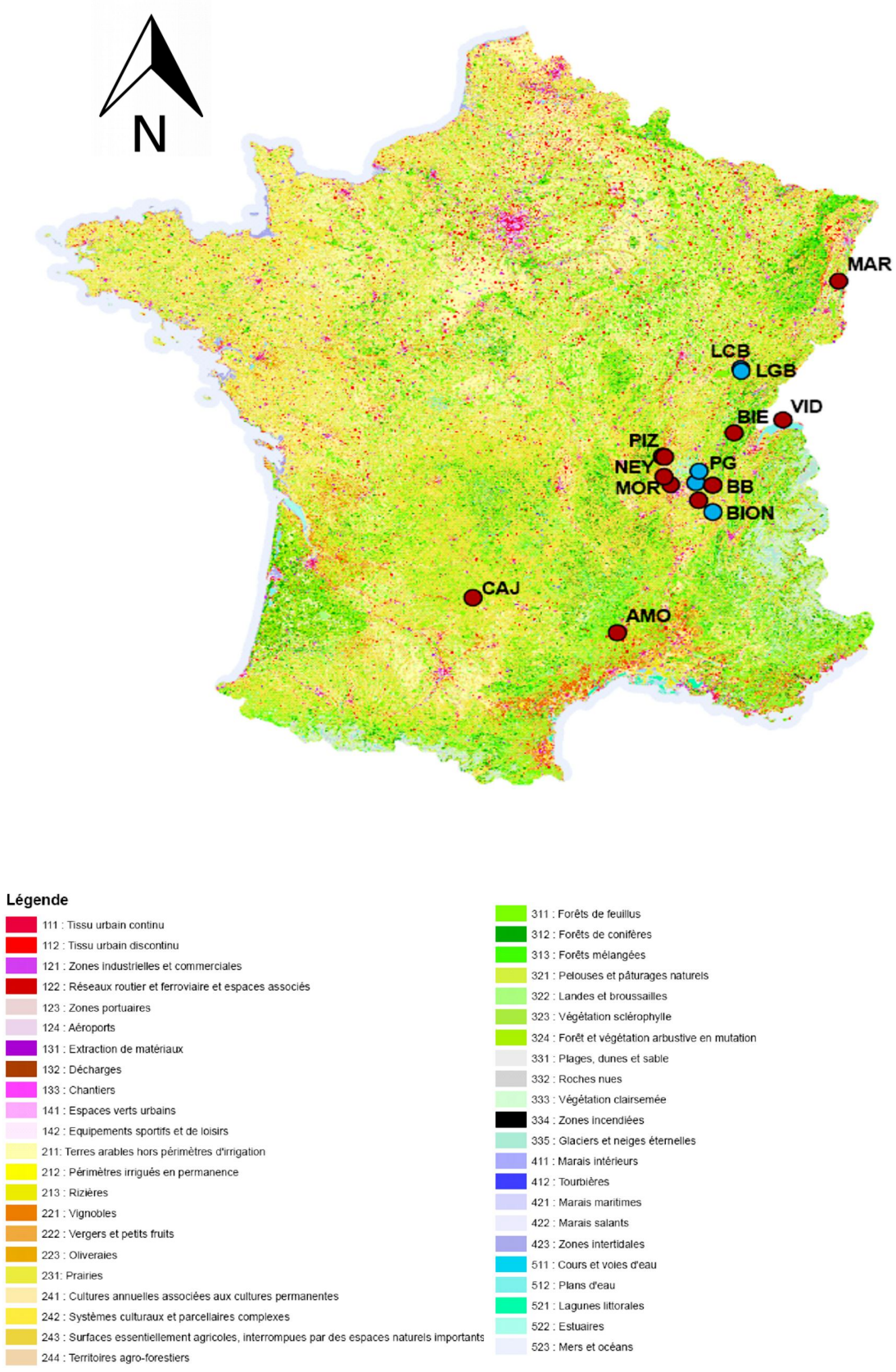


Figure III-2 : Localisation géographique des sites de prélèvement selon lôoccupation des sols en France (source : Corine Land Cover, http://sd1878-2.sivit.org/).

Ainsi, 10 sites de prélèvements ont été sélectionnés, et prospectés afin de préciser les lieux d'échantillonnage. Sur ces 10 sites, 4 n'ont pas été retenus soit parce qu'il y avait trop peu de sédiment disponible pour les expérimentations envisagées, soit à cause de la présence trop importante de végétaux ou de roches qui rendaient l'échantillonnage impossible. Les prélèvements des 8 sédiments de référence ont donc été réalisés sur les 6 sites permettant des prélèvements aisés, de bonne qualité et en quantité suffisante. L'un des sites, situé à Port-Galland sur l'Ain, a fait l'objet de 3 prélèvements (Tableau III-1, Figure III-2).

Lieu de prélèvement		Bassin versant *	Coordonnées		Date	Numéro de l'échantillon	Acronyme
Commune	Rivière		x_L93	y_L93			
Port Galland (lieu dit)	Ain	Rhône	871522	6525630	02/02/2009	2	PG2
					08/10/2009	3	PG3
					15/09/2010	5	PG5
Blandin	Bourbre	Rhône	891695	6488170	02/02/2009	2	BB2
Chenecey Buillon	Loue	Rhône	925005	6674290	04/02/2009	2	LCB2
Grange Bouquet (lieu dit)			925867	6670930	21/09/2010	2	LGB2
Creys Malville (chenal)	Rhône	Rhône	891744	6522740	06/02/2009	2	CMC2
St Maurice de Remens	Neyrieux	Rhône	875292	6540910	15/09/2010	1	NEY1

Tableau III-1 : Présentation des 8 sédiments de référence.

* Grands bassins versants > 10000 km²

- Le site de Port Galland se situe sur une île de la rivière Ain près de Saint-Maurice-de-Gourdans (01), dans une zone assez peu anthropisée (Figure III-2). Le sédiment de ce site a été souvent utilisé au laboratoire et de nombreuses analyses sont disponibles. Il est considéré comme référence dans plusieurs publications antérieures (Péry, 2003; Péry et al., 2003), et les notes hydrobiologiques disponibles sur la commune sont bonnes. Des prélèvements ont été effectués à différentes saisons sur ce site. Trois prélèvements effectués en hiver 2009, en été 2009 et en automne 2010 constituent trois des références utilisées lors de ce travail de thèse, respectivement PG2, PG3 et PG5.
- La Bourbre est la rivière dans laquelle sont régulièrement prélevés les amphipodes *G. fossarum*. La présence de ces organismes tend à indiquer une bonne qualité de la rivière. Le prélèvement a été effectué sur la partie amont de la rivière, peu anthropisée, au niveau de la commune de Blandin (38).
- Les 2 sites de prélèvement sur la rivière Loue se situent dans une zone très peu anthropisée du Doubs (25). Les deux sites présentent des caractéristiques différentes, l'un étant dans le lit de la rivière (LCB), l'autre dans un bras mort (LGB).

- Le site sur le Rhône à Creys-Malville (38) est un site avec une population d'invertébrés très développée (Mouthon, 2001). Il s'agit d'ailleurs du lieu de prélèvement des mollusques utilisés lors de ce travail (*P. antipodarum*). C'est dans le chenal de la rivière qu'a été prélevé le sédiment CMC.
- Le Neyrieux à Saint-Maurice-de-Remens est un petit cours d'eau localisé dans une zone peu anthropisée (Figure III-2). De plus le sédiment de ce site a déjà été utilisé comme référence (Péry, 2003; Péry et al., 2003) et d'anciennes analyses sont disponibles.

sédiment			Indices biologiques							
Acronyme	**riviere de prélèvement**	**site prélèvement**	**localisation de la station la plus proche du site de prélèvement du sédiment**	**riviere**	**date**	**IBGN**	**IBD**	**IPS**	**IPR**	**IBMR**
LCB2	LOUE	chenecey buillon	chenecey buillon	LOUE	18/05/1998	15				
					01/09/1998	17				
					22/08/2002		18	16		
					09/09/2004		20	19		
CMC2 et CMA2	RHONE	creys Malville	saint sorlin en bugey	RHONE	26/09/2007		16	14		
					01/10/2008		15	16		
BB2	BOURBRE	blandin	chelieu	BOURBRE	01/07/2008	16				
PG 2 à 5	AIN	port Galland	saint maurice de gourdans	AIN	24/06/1992	16				
					11/04/1997	17				
					30/09/1997	16				
					29/05/1998	16				
					20/08/1998	15				
					26/07/1999	17				
					28/07/1999		20	19		
					07/06/2000		20	19		
					17/09/2000		20	17		
					13/08/2001	14	20	18		
					03/07/2002		20	16		
					30/07/2002	18	20	18		
					18/06/2003	19				
					25/06/2003		20	19		
					27/08/2003	19				
					27/04/2004		20	19		
					06/07/2004	18				
					29/07/2004		20	19		
					29/07/2004		19			
					05/10/2004		20	16		
					28/06/2005		20	20		
					12/07/2005	19				
					12/07/2005	15				
					15/06/2006		20	18		
					04/07/2006	18				
					04/07/2006	16				
					23/07/2008		20	19		10

sédiment			Indices biologiques							
Acronyme	**riviere de prélèvement**	**site prélèvement**	**localisation de la station la plus proche du site de prélèvement du sédiment**	**riviere**	**date**	**IBGN**	**IBD**	**IPS**	**IPR**	**IBMR**
PG2 à 5 (suite)	AIN	port galland	saint maurice de gourdans	AIN	27/07/2009	15				
					29/07/2009		20			
					30/07/2009					10
NEY1	NEYRIEUX	saint maurice de remens	saint maurice de remens	POLLON						
LGB2	LOUE	lieu dit grange bouquet	chatillon sur lison	LOUE						
CAJ1	LOT	cajarc	pont de saint pierre toirac	LOT	27/09/2005		18			
					14/08/2007		12			
					09/07/2008	11				
					06/08/2008		13			
					09/07/2009		13			
					19/08/2009	7				
					01/09/2008				11	
IBA1	SAONE	lyon	lyon	SAONE	21/08/2007				11	
					24/09/2007		13			
					24/07/2008		13			
					30/07/2009	15				
					13/10/2009		12			
MAR1	RHIN	marckolsheim	rhinau	RHIN	12/09/2003				11	
					30/08/2004				8	
					07/09/2005				11	
					11/10/2006				5	
					31/07/2007	5				
					07/09/2007		15			
					18/09/2007				6	
					01/08/2008	6				
					05/08/2008		16			
					29/08/2008				2	
					04/08/2009		16			
MOR1	AZERGUES	morancé	lucenay	AZERGUES	03/07/2003	16				
					05/08/2003		9			
					03/06/2004	15				
					29/06/2004		8			
					22/06/2005		9			
					01/08/2007		7			

sédiment			Indices biologiques							
Acronyme	**riviere de prélèvement**	**site prélèvement**	**localisation de la station la plus proche du site de prélèvement du sédiment**	**riviere**	**date**	**IBGN**	**IBD**	**IPS**	**IPR**	**IBMR**
MOR1 (suite)	AZERGUES	morancé	lucenay	AZERGUES	19/09/2007				10	
					24/10/2007	11				
					24/07/2008		8			
					03/09/2008	15				
					28/07/2009	12				10
					20/10/2009		11			
VID1	LAC LEMAN	baie de vidy								
AMO1	GARDON D'ANDUZE	anduze	tornac	GARDON D'ANDUZE	24/06/2003	16				
					23/09/2003	15				
					09/08/2007		15			
					28/08/2007	16				
					20/06/2008				9	
					25/06/2009	16				
					03/07/2009		15			
BION1	BION	bourgoin jallieu	bourgoin jallieu	BION						
BIE1	BIENNE	saint claude	saint claude	BIENNE						
PIZ1 et JEAN1	ARDIERE	pizay et saint jean d'ardières	saint jean d'ardieres	ARDIERE	03/06/2004	10				
					30/06/2004		10			
					12/10/2004		10			
					26/07/2007		13			
					13/09/2007	12				
					24/07/2008		14			
					03/09/2008	9				
					28/07/2009	13	11			9

Tableau III-2 : Notes obtenues pour cinq indices hydrobiologiques (Indice Biologique Global Normalisé, lôIndice Biologique Diatomées, lôIndice de Polluosensibilité Spécifique, lôIndice Poisson Rivière et lôIndice Biologique Macrophytique en Rivière) sur les stations de la banque hydro France (http://www.hydro.eaufrance.fr/) les plus proches des points de prélèvement des sédiments.

Remarque : Pour les indices IBGN IBD IPS et IBMR les notes attribuées vont de 1 à 20, 20 correspondant à la meilleure note (bonne qualité biologique du cours dôeau) et 1 à la plus mauvaise. Pour lôIPR la note donnée correspond à un écart à la référence, les plus petites notes sont donc les meilleures.

2 Sélection des sites contaminés

Comme pour les sédiments de référence, la sélection des sites contaminés sôest effectuée suivant une démarche *a priori*, sur la base des connaissances du laboratoire et à dire dôexpert (sites ayant posé problèmes à leurs gestionnaires, ou dont la contamination par un ou plusieurs contaminants a été vérifiée). Lôensemble des sites sélectionnés devant représenter un panel large de contaminants, la typologie de contamination a également été prise en compte. Ainsi 11 sites ont été retenus (tableau III-3, figure III-2).

Lieu de prélèvement		Bassin versant *	Coordonnées		Date	Numéro de l'échantillo	Acronyme
Commune	Rivière		x_L93	y_L93			
Creys Malville (anse)	Rhône	Rhône	891744	6522740	06/02/2009	2	CMA2
Cajarc	Lot	Garonne	607663	6376314	05/05/2010	1	CAJ1
Ile Barbe Lyon	Saône	Rhône	841888	6523230	11/05/2010	1	IBA1
Marckolsheim	Rhin	Rhin	1040750	6788250	11/05/2010	1	MAR1
Morancé	Azergues	Rhône	834208	6532896	06/05/2010	1	MOR1
Baie de Vidy	Lac Léman	Léman	974981	6607450	28/04/2010	1	VID1
Anduze	Amous	Rhône	778523	6330670	14/09/2010	1	AMO1
Bourgoin Jailleu	Bion	Rhône	875151	6502970	16/09/2010	1	BION1
St Claude	bienne	Rhône	917120	6590740	20/09/2010	1	BIE1
Pizay	Ardières	Rhône	832217	6560100	07/07/2010	1	PIZ1
St Jean d'Ardières			834464	6559410	07/07/2010	1	JEAN1

Tableau III-3 : Provenance des sédiments contaminés.

* Grands bassins versants > 10000 km²

- Marckolsheim sur le Rhin a été choisi dôaprès les informations transmises par EDF (gestionnaire de la retenue) pour sa pollution mixte, avec lôhexa-chloro-benzène (HCB) comme contaminant majeur, dont la concentration dans les 33 premiers centimètres de sédiments atteint 185,5 µg / kg. Le HCB est un polluant organique persistant classé comme cancérogène de classe 2 (INERIS, 2005), et fait partie de la liste des substances prioritaires à suivre dans la DCE.
- Trois des sites ont été choisis pour leurs contaminations polymétalliques avec différents métaux : Cajarc sur le Lot connu notamment pour sa forte concentration en cadmium Cd = 15 mg/kg, Zn = 1000 mg/kg, Pb = 150 mg/kg, Hg = 1 mg/kg (Audry, 2003) ; LôAmous à Anduze pour sa contamination en arsenic, plomb et zinc avec dôaprès les données du laboratoire du 11/2006, respectivement 1184 mg/kg, 1882 mg/kg et 2096 mg/kg (Casiot et al., 2009) ; Morancé sur lôAzergues situé dans une région ayant un important passé minier, laissant suspecter une contamination en plomb, zinc et cuivre.

- Le Bion à Bourgoin-Jailleu (69) et la Baie de Vidy sur le Léman (Suisse) pour leurs contaminations urbaines liées aux rejets de STEP (Poté et al., 2008; Gust et al., 2011).
- La Saône au niveau de l'île Barbe, pour sa contamination urbaine liée à sa localisation géographique dans la métropole Lyonnaise (Figure III-2).
- A Creys-Malville, le point de prélèvement du sédiment contaminé forme une anse où l'eau est l'eau très stagnante. Le sédiment à cet endroit présentait une couleur et odeur laissant suspecter une contamination organique.
- La Bienne a été retenue car suite à des lâchers de sédiments, de fortes mortalités de poissons ont été observées par les gestionnaires. De plus, suite au passé industriel de la région, l'historique des contaminations de la rivière montre des concentrations importantes en métaux lourds (B. Devillers, Parc Naturel Régional du Haut Jura, communication personnelle).
- Les sédiments de Pizay et St-Jean ont été sélectionnés pour leur contamination probable en insecticides. En effet, ils se situent en zone de culture (Figure III-2) et ont été prélevés aux pieds de vergers en cours de traitement chimique. Seuls les chironomes ont été exposés à ces sédiments.

II Caractérisation des sédiments

1. Principales caractéristiques géochimiques des sédiments

Les propriétés géochimiques des sédiments comme la granulométrie ou le contenu en MO peuvent impacter les réponses biologiques (Ristola et al., 1999; Vos et al., 2000). De plus, d'un sédiment à l'autre, toutes ces caractéristiques varient fortement. Dans le cadre d'une évaluation de la toxicité de sédiments par des bioessais, il est donc indispensable de connaître l'impact de la géochimie des sédiments sur les réponses biologiques. Les sédiments de référence utilisés ont donc été caractérisés pour leurs principales propriétés géochimiques. Les sédiments contaminés ont été caractérisés pour ces mêmes caractéristiques afin de vérifier qu'elles sont comparables à celles des sédiments de référence. Ce paragraphe détaille donc la granulométrie, la quantité de MO ainsi que sa qualité (C/N), le taux d'humidité, le pH, le contenu en $CaCO_3$ et en AVS des sédiments utilisés.

a. Sédiments de référence

Les sédiments ont été sélectionnés pour leurs propriétés géochimiques variées. Les principales caractéristiques (matière organique totale, C/N, taux d'humidité, granulométrie, carbonates, pH et AVS) sont décrites dans le tableau III-4.

Chaque sédiment présente une granulométrie très différente avec des proportions d'argile, de limon et de sable variant respectivement de 0 à 19 %, 6 à 89 % et 8 à 94 %. Ainsi BB2 et NEY1 sont classés comme sables ; PG2, PG3, LCB2 et LGB2 comme limons sableux alors que CMC2 et PG5 sont des limons (Campy et Meybeck, 1995). De même, la quantité de matière organique totale, mesurée par mesure de perte au feu, varie beaucoup avec les sédiments LCB2 et PG2 qui présente les taux de MO les plus élevés, de 15 % et 13 % respectivement et les sédiments BB2 et NEY1 dont les taux de MO sont les plus faibles avec 2 et 3 % respectivement. La matière organique ne varie pas seulement quantitativement mais également qualitativement avec des rapports C/N allant de 0,1 à 41,8 %. Le contenu en carbonates ($CaCO_3$) est lui compris entre 22 % (BB2) et 80 % (NEY1). Les AVS, lorsqu'ils ont été mesurés, sont inférieurs à 15 µmol / g ps.

Acronyme		**PG3**	**PG2**	**BB2**	**LCB2**	**CMC2**	**NEY1**	**PG5**	**LGB2**
Perte au feu (%)		9,1	12,9	2,1	14,9	5,9	< 3	8,3	10,6
C / N		37,11	79,92	34,42	68,16	26,54	NR	41,80	33,73
Taux d'humidité		67	67	28	68	52	30	68	71
Texture (%)	Argile	19,20	0,11	0,21	0,14	1,27	0,04	3,33	3,01
	Limon	62,79	70,27	8,92	46,32	73,90	6,18	88,55	71,92
	Sable	18,01	29,62	90,87	53,54	24,82	93,78	8,12	25,07
$CaCO_3$ (%)		NR	49,0	21,5	41,2	27,0	80,3	54,7	43,9
pH		NR	7,79	7,72	8,19	7,55	NR	NR	NR
Eh (mV)		NR	-208	+40	-181	-234	NR	NR	NR
AVS (µmol/g ps)		NR	4,3	0,2	8,5	14,1	NR	NR	NR

Tableau III-4 : Caractérisation géochimique des sédiments de référence pour leur contenu en MO (perte au feu ; C/N), leur taux d'humidité, leur texture, leur contenu en carbonates de calcium, leur pH, leur Eh et leur contenu en AVS.

NR non renseigné. Pour le sédiment NEY1, le taux C/N n'était pas calculable car il ne contient que du carbone.

Les sédiments de référence sélectionnés présentent une gamme assez large des 2 caractéristiques majeures des sédiments que sont le contenu en matière organique (MO) et la granulométrie. Le contenu en MO varie de 0 à 15 %.

En ce qui concerne la granulométrie, les sédiments de référence couvrent une gamme allant de moins de 10 % de particules fines (NEY1 et BB2) à plus de 90 % (PG5). Les données de granulométrie de nos sédiments ont été mises en perspective avec un travail de lôINERIS (2010) qui a collecté un grand nombre de données sur un panel de sédiments échantillonnés en France et Belgique sur une période de 28 ans (Tableau III-5).. Les données ont été recueillies par lôINERIS auprès des Voies Navigables de France, des agences de lôeau Adour Garonne, Artois Picardie, Loire Bretagne, Rhin Meuse, Rhône Méditerranée Corse et du Service Public de Wallonie (Belgique).

Les proportions de particules fines sont variables, allant de 0 à 56 % pour les argiles et de 0 à 94 % pour les limons. La proportion de sable varie quant à elle de 0 à 100 %. Les mesures effectuées dans nos sédiments se situent dans les gammes observées par lôINERIS (2010) sur les sédiments en France et Belgique. Nos sédiments sont donc représentatifs de la granulométrie des sédiments que lôon retrouve en France et Belgique.

	Granulometrie (%)		
	Argiles	Limons	Sables
Nombre de données	1 138	1 138	1 138
Moyenne	14,4	47,4	38,2
Ecart-type (n)	10,2	24,3	27,8
Coefficient variation (%)	0,71	0,51	0,73
Minimum	0	0	0,01
1%	0,34	0,44	1,57
10%	3	7,66	9,69
1er Quartile	6,21	28,8	16,2
Médiane	11,9	52,3	29,5
3ème Quartile	21,1	66,3	55,6
90%	29,2	75,8	86,5
99%	41,9	88,1	98,5
Maximum	55,7	93,7	100

Tableau III-5 : Statistiques descriptives pour la granulométrie des sédiments en France et Belgique (dôaprès (INERIS, 2010).

b. Sédiments contaminés

Les sédiments présentent une granulométrie variable, avec des proportions dôargile, de limon et de sable variant respectivement de 0 à 4 %, 9 à 87 % et 9 à 90 % (Tableau III-6). Ainsi PIZ1, JEAN1 et BION1 sont classifiés comme sables ; AMO1 est un sable limoneux ; CMA2, VID1, MOR1, IBA1 et CAJ1 comme sables limoneux alors que MAR1 et BIE1 sont des limons (Campy et Meybeck, 1995). La granulométrie de ces sédiments se situe dans des gammes similaires aux références précédemment décrites, et sont également représentatifs de la granulométrie des sédiments en France et Belgique (Tableau III-5).

La quantité de MO totale varie beaucoup avec les sédiments VID1 et BIE1 qui présentent les plus hauts taux de MO de 16 % et 10 % respectivement et les sédiments AMO1 et BION1 dont les taux de MO sont les plus faibles avec 4 et 5 % respectivement. La matière organique ne varie pas seulement quantitativement mais également qualitativement avec des coefficients C/N allant de 0,2 à 58,5 %. Ces valeurs sont comparables de celles observées pour les références (MO : 2 à 15 % ; C / N : 0,1 à 42 %), avec seulement les sédiments de lôAmous (AMO1) et de la Bienne (BIE1) pour lesquels le rapport C / N est un peu plus élevé que dans les références.

Le contenu en carbonates ($CaCO_3$) est lui compris entre 0 (MOR1 et CAJ1) et 59 % (BIE1). La gamme observée pour les références était comprise entre 22 et 80 %, un peu plus élevée que pour les sédiments contaminés.

Comme pour les références, les AVS lorsquôils ont été mesurés, sont inférieurs à 15 µmol/g ps sauf pour CMA2 (33 µmol / g) et VID1 (116 µmol / g).

Dôune manière générale, les caractéristiques géochimiques des sédiments de référence et des sédiments contaminés semblent proches. Nous allons vérifier quôelles sont bien comparables dans le paragraphe suivant.

Acronyme		CMA2	CAJ1	IBA1	MAR1	MOR1	VID1	AMO1	BION1	BIE1	PIZ1	JEAN1
Perte au feu (%)		7,6	8,8	8,0	8,0	8,7	15,7	3,9	5,0	9,8	NR	NR
C / N		44,02	29,41	23,36	30,60	23,51	15,57	58,53	41,86	50,52	23,83	38,46
Taux d'humidité		63	60	58	61	59	77	33	53	65	NR	NR
Texture (%)	Argile	0,15	0,61	2,95	3,44	0,97	0,75	2,26	0,49	4,18	0,64	0,49
	Limon	51,04	58,11	55,93	87,03	67,28	71,20	32,59	18,02	77,74	23,14	9,30
	Sable	48,81	41,27	41,12	9,53	31,75	28,05	65,15	81,49	18,07	76,22	90,21
$CaCO_3$ (%)		29,3	< 1	18,3	32,0	< 1	15,9	11,4	29,9	59,1	NR	NR
pH		7,56	7,11	7,13	7,22	7,03	7,21	7,86	7,24	7,58	NR	NR
Eh (mV)		-279	-77	-129	-125	-120	-160	-128	-129	-146	NR	NR
AVS (µmol/g ps)		33,0	6,1	3,5	4,3	12,2	116,0	1,1	10,2	1,48	NR	NR

Tableau III-6 : Caractérisation géochimique des sédiments contaminés pour leur contenu en MO (perte au feu ; C/N), leur taux d'humidité, leur texture, leur contenu en carbonates de calcium, leur pH, leur Eh et leur contenu en AVS.
NR non renseigné.

c. Comparaison des caractéristiques géochimiques des deux catégories de sédiments, références et contaminés

Cœst sur les sédiments de référence sélectionnés que la variabilité naturelle de réponse des traits de vie des organismes de la batterie va être définie. La batterie de test sera ensuite utilisée pour tester les sédiments contaminés, il est donc nécessaire que les caractéristiques des sédiments contaminés soient similaires à celles des références (hormis pour la contamination) afin de pouvoir comparer les réponses des 3 espèces dôinvertébrés aux deux catégories de sédiments. Nous avons donc représenté par une ACP les sédiments de référence et les sédiments contaminés en fonction de leurs caractéristiques géochimiques principales (Figure III-3). Chaque point représente un sédiment (références en bleu et contaminés en rose). Les cercles représentent lôétendue des gammes des caractéristiques des sédiments de chaque groupe.

LôACP montre un recoupement des caractéristiques géochimiques des 2 types de sédiments (recoupements des cercles) à lôexception des AVS. En effet, les taux dôAVS sont plus élevés pour certains sédiments contaminés, principalement de Vidy et de Creys-Malville anse (VID1 et CMA2). Globalement, les 2 catégories de sédiments ne se distinguent pas par lôétendue des gammes des caractéristiques géochimiques de texture, contenu en MO et carbonates, bien que les combinaisons entre ces paramètres puissent être différentes. Les sédiments de référence et les sédiments contaminés sont donc très comparables dôun point de vue géochimique.

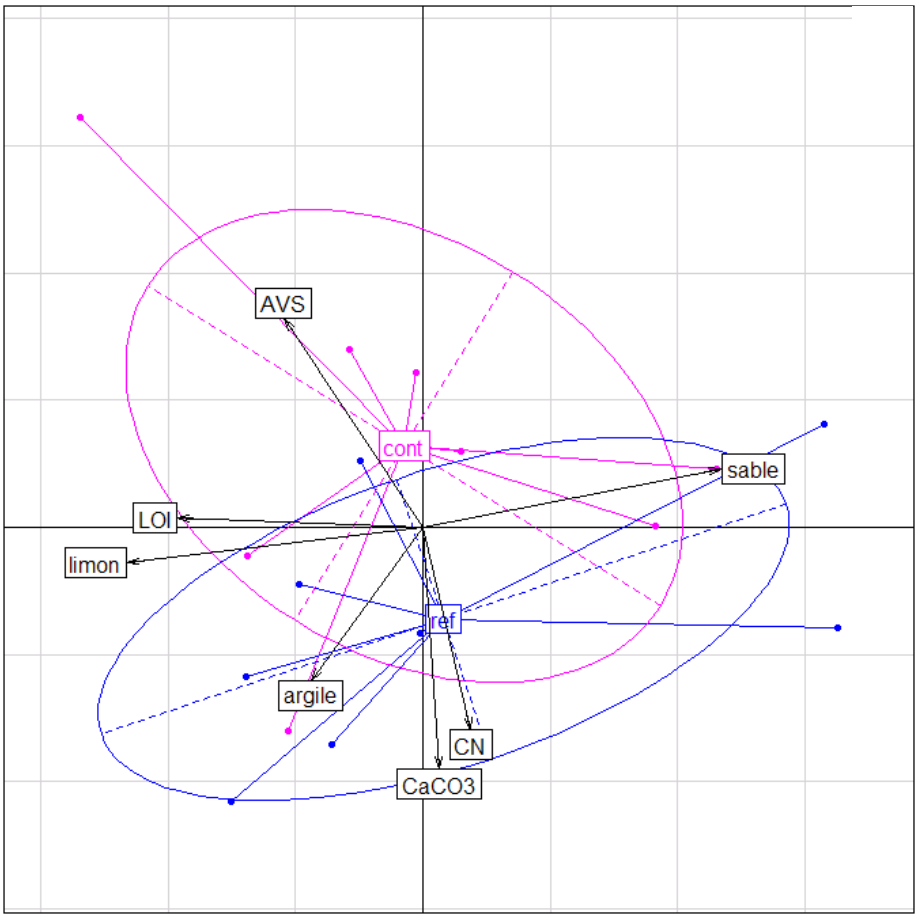


Figure III-3 : Représentation par une ACP des principales caractéristiques géochimiques (texture, AVS, LOI, C/N et carbonates) des 2 catégories de sédiments (références en bleu et contaminés en rose).

2. Contamination métallique et micropolluants organiques

Nous avons effectué une sélection des sédiments pour obtenir 2 catégories, « référence » et « contaminé ». Nous avons ensuite vérifié ce classement en effectuant des analyses des sédiments pour leur contenu en contaminants majeurs tels que des métaux lourds et des micropolluants organiques. Ainsi, 11 métaux et métalloïdes, 18 HAP, et le contenu total en PCB ont été dosés (Chapitre 2). Ces mesures chimiques, bien que non exhaustives donnent une indication supplémentaire sur la qualité des sédiments, au moins pour les contaminants dosés.

a. Contenu en contaminants des sédiments sélectionnés

Nous avons vu précédemment que les 2 catégories de sédiments (références et contaminés) étaient comparables pour leurs caractéristiques géochimiques majeures (texture, MOé). En revanche on s'attend à observer des différences de taux de contamination entre les références et les contaminés. Les résultats des dosages de métaux, PCB et HAP sont présentés dans les tableaux III-7 et III-8 pour les sédiments de référence et les sédiments contaminés respectivement. De la même manière que précédemment, nous avons donc réalisé une ACP en intégrant les niveaux de contamination en métaux, PCB totaux et HAP totaux en plus des caractéristiques géochimiques (Figure III-4). Les 2 catégories de sédiments, références en bleu et contaminés en rose, qui se recoupaient largement pour leurs propriétés géochimiques, sont cette fois très différenciées graphiquement (cercles peu chevauchants). On constate que les sédiments contaminés se distinguent donc largement des références sur leur contenu en métaux, PCB et HAP.

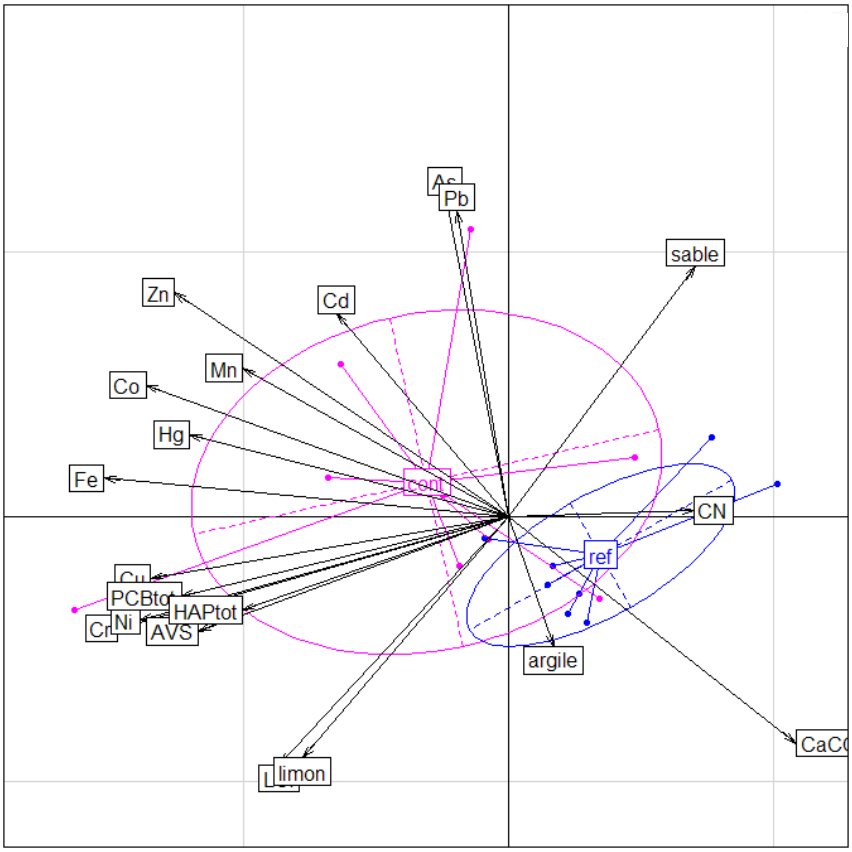


Figure III-4 : Représentation par une ACP des principales caractéristiques géochimiques (texture, AVS, LOI, C/N et carbonates) et de la contamination (métaux, PCB et HAP).des sédiments de références (en bleu) et contaminés (en rose).

		BB2	LCB2	PG2	PG3	PG5	NEY1	LGB2	CMC2
Métaux et métalloïdes (mg / kg ps)	**Cr (LQ = 0,33)**	12,3	41,7	29,9	31,4	30,6	5,0	45,4	52,2
	Fe (LQ = 6,7)	4755	14367	12889	13140	12217	2489	15733	20567
	Co (LQ = 0,33)	1,76	5,50	3,87	4,34	4,30	0,92	5,21	7,47
	Ni (LQ = 0,33)	5,6	23,0	17,9	16,8	16,5	1,7	20,4	34,8
	Cu (LQ = 0,33)	2,6	15,8	15,7	13,6	14,7	1,2	14,3	21,5
	Zn (LQ = 1,67)	15,8	93,5	69,5	61,4	63,5	7,6	112	87,8
	As (LQ = 0,33)	2	8,6	5,4	6,36	5,7	2,0	9,8	7,6
	Cd (LQ = 0,033)	0,07	0,70	0,31	0,330	0,33	0,15	0,78	0,33
	Pb (LQ = 0,33)	5,7	16,1	16,7	17,5	17,9	3,5	53,1	20,9
	Mn (LQ = 0,33)	244	244	270	198	184	95	117	488
	Hg (LQ = 0,01)	< LQ	0,05	0,07	0,05	0,09	<LQ	0,09	0,07
Micropolluants organiques (µg / kg ps)	**PCB totaux (LQ = 5)**	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ
	Anthracène (LQ= 20)	< LQ	66	53	21	73	< LQ	33	< LQ
	Acénaphthène (LQ= 20)	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ
	Acénaphtylène (LQ= 20)	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ
	Benzo (a) pyrène (LQ= 10)	23	474	638	251	330	< LQ	156	40
	Benzo (a) anthracène (LQ= 10)	24	280	333	291	219	< LQ	133	42
	Benzo (b) fluoranthène (LQ= 10)	22	254	300	207	350	< LQ	192	54
	Benzo (k) fluoranthène (LQ= 10)	12	188	136	582	204	< LQ	102	22
	Benzo (ghi) perylène (LQ= 10)	16	203	211	203	115	< LQ	65	38
	Chrysène (LQ= 50)	< LQ	293	291	294	313	< LQ	85	< LQ
	Dibenzo (a,h) anthracène (LQ= 20)	< LQ	< LQ	< LQ	29	68	< LQ	46	< LQ
	Fluoranthène (LQ= 40)	66	639	754	686	834	< LQ	377	106
	Fluorène (LQ= 40)	< LQ	< LQ	43	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ
	Indéno (1,2,3-cd) pyrène (LQ= 10)	14	113	164	78	321	< LQ	206	24
	Methyl 2 fluoranthène (LQ= 50)	< LQ	79	90	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ
	Methyl 2 naphtalène (LQ= 50)	< LQ	65	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ
	Naphtalène (LQ= 25)	< LQ	31	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ
	Phénanthrène (LQ= 25)	< LQ	176	220	< LQ	315	< LQ	109	55
	Pyrène (LQ= 40)	42	441	528	343	771	< LQ	418	76
	HAP totaux (liste des 16 définie par l'US EPA)	219	3158	3671	2985	3913	0	1922	457

Tableau III-7 : Contenu en métaux, PCB et HAP des sédiments sélectionnés comme référence. LQ = limite de quantification.

		CMA2	IBA1	MOR1	MAR1	VID1	CAJ1	AMO1	BION1	BIE1	PIZ1	JEAN1
Métaux et métalloïdes (mg / kg ps)	**Cr (LQ = 0,33)**	48,8	49,9	54,7	54,8	93,4	42,9	30,5	19,6	25,5	NR	NR
	Fe (LQ = 6,7)	17177	24346	31171	23380	34849	28146	21135	6080	10382	NR	NR
	Co (LQ = 0,33)	6,57	8,85	11,8	8,24	9,45	11,2	8,84	4,59	3,50	NR	NR
	Ni (LQ = 0,33)	30,9	24,0	23,9	32,9	50,3	23,4	20,6	8,6	17,8	NR	NR
	Cu (LQ = 0,33)	38,8	36,9	97,0	30,9	217	25,6	33,0	27,0	34,2	NR	NR
	Zn (LQ = 1,67)	141,4	160	429	109	477	572	483	105	93,4	NR	NR
	As (LQ = 0,33)	5,5	16,6	37,2	8,4	11,8	41,9	314	2,3	6,8	NR	NR
	Cd (LQ = 0,033)	0,39	0,53	2,16	0,21	1,38	11,23	2,24	0,27	0,43	NR	NR
	Pb (LQ = 0,33)	21,5	37,4	86,9	24,6	91,2	78,0	1597	23,0	24,9	NR	NR
	Mn (LQ = 0,33)	330	689	461	460	387	721	374	143	170	NR	NR
	Hg (LQ = 0,01)	0,09	0,17	0,19	0,19	1,02	0,44	0,44	0,47	0,15	NR	NR
Micropolluants organiques (µg / kg ps)	**PCB totaux (LQ = 5)**	< LQ	< LQ	68	< LQ	222	7	< LQ	< LQ	< LQ	NR	NR
	Anthracène (LQ= 20)	71	37	66	< LQ	75	187	42	24	21	NR	NR
	Acénaphthène (LQ= 20)	< LQ	< LQ	24	< LQ	45	97	< LQ	< LQ	< LQ	NR	NR
	Acénaphtylène (LQ= 20)	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	NR	NR
	Benzo (a) pyrène (LQ= 10)	446	234	384	74	125	316	204	67	95	NR	NR
	Benzo (a) anthracène (LQ= 10)	363	237	338	53	347	54	165	67	74	NR	NR
	Benzo (b) fluoranthène (LQ= 10)	339	239	344	90	377	92	247	87	104	NR	NR
	Benzo (k) fluoranthène (LQ= 10)	206	109	161	37	284	139	137	39	49	NR	NR
	Benzo (ghi) perylène (LQ= 10)	234	231	293	82	253	214	81	28	37	NR	NR
	Chrysène (LQ= 50)	318	231	338	< LQ	393	379	134	114	125	NR	NR
	Dibenzo (a,h) anthracène (LQ= 20)	< LQ	< LQ	40	< LQ	< LQ	< LQ	54	< LQ	< LQ	NR	NR
	Fluoranthène (LQ= 40)	844	719	974	186	1315	189	519	190	235	NR	NR
	Fluorène (LQ= 40)	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	119	121	< LQ	< LQ	< LQ	NR	NR
	Indéno (1,2,3-cd) pyrène (LQ= 10)	172	241	340	93	212	187	218	70	96	NR	NR
	Methyl 2 fluoranthène (LQ= 50)	127	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	NR	NR
	Methyl 2 naphtalène (LQ= 50)	130	< LQ	< LQ	< LQ	97	199	< LQ	< LQ	< LQ	NR	NR
	Naphtalène (LQ= 25)	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	< LQ	294	< LQ	< LQ	< LQ	NR	NR
	Phénanthrène (LQ= 25)	176	295	343	72	326	450	274	102	107	NR	NR
	Pyrène (LQ= 40)	615	412	547	98	720	100	211	92	191	NR	NR
	HAP totaux (liste des 16 définie par l'US EPA)	3784	2985	4192	785	4591	2819	2286	880	1134	NR	NR

Tableau III-8 : Contenu en métaux, PCB et HAP des sédiments sélectionnés comme contaminés. LQ = limite de quantification.

b. Représentativité des sédiments sélectionnés dans le contexte franco-belge

Afin de situer le niveau de contamination de nos sédiments par rapport au contexte français, les concentrations des contaminants dosés (métaux, PCB et HAP) ont été comparées à la contamination du panel de sédiments échantillonnés sur les territoires français et belge (INERIS, 2010). La base de données de l'INERIS (2010) représente 5787 à 11966 dosages selon le contaminant, et couvre 8 métaux et métalloïdes (As, Cd, Cr, Cu, Hg, Ni, Pb, Zn), les PCB totaux et les HAP totaux (somme des 16 HAP définie par l'USEPA). A partir de cette base de données, la contamination des sédiments en France / Belgique a été décrite (moyenne, médiane, minimum, maximum, quartiles...) pour chaque contaminant (INERIS, 2010). Les statistiques descriptives de cette base de données sont présentées dans le tableau III-9.

	Métaux (mg / kg)								Organiques (mg / kg)	
	Arsenic	Cadmium	Chrome	Cuivre	Mercure	Nickel	Plomb	Zinc	Somme de 16 HAP	Somme de 7 PCB
Nombre de données	10 956	11 943	8 740	11 072	11 791	11 498	11 966	11 053	5 687	6 531
Données « manquantes »	1 893	906	4 109	1 777	1 058	1 351	883	1 796	7 162	6 318
Moyenne	12,4	10,2	52,1	48,5	1,22	26,8	122	446	8,71	0,2
Ecart-type (n)	21	107	93,1	112	5,7	54,2	768	2 598	77,7	9,87
Coefficient variation (%)	1,7	10,5	1,79	2,31	4,69	2,02	6,28	5,82	8,92	49,5
Minimum	0,01	0,002	0,05	0,01	0,002	0,02	0,02	0,01	0,01	7,00E-05
1%	0,02	0,002	2,5	1,4	0,005	1,75	0,3	12,2	0,01	7,00E-04
10%	2,4	0,18	10,7	6,6	0,03	7	9,6	40	0,24	0,007
1er Quartile	4,2	0,3	20	12	0,05	11,6	17,7	69	0,53	0,018
Médiane	7,27	0,65	36	21,7	0,13	19	32,6	130	1,47	0,057
3ème Quartile	13,7	2	58,6	45	0,4	30	78,4	305	5,04	0,07
90%	25	5,5	96,5	99,9	1,3	45,3	215	882	14,2	0,14
99%	83,5	187	321	426	31	153	1 232	4 519	90	0,65
Maximum	1 005	7 285	5 300	4 330	200	2 380	50 420	142 500	3 363	798

Tableau III-9 : Statistiques descriptives pour les contaminants organiques et les métaux dans les sédiments en France et Belgique (d'après (INERIS, 2010).

Nous avons positionné les concentrations de nos sédiments, contaminant par contaminant, par rapport à ces valeurs. Un exemple est donné dans le tableau III-10 pour 2 sédiments, l'un sélectionné comme référence (BB2) et l'autre comme contaminé (AMO1).

	Arsenic	Cadmium	Chrome	Cuivre	Mercure	Nickel	Plomb	Zinc	Somme des PCB	Somme des HAP
Valeur maximale mesurée										
99%	AMO1						AMO1			
90%										
3° quartile		AMO1			AMO1			AMO1		
Médiane				AMO1		AMO1			AMO1	
1° quartile			AMO1							
10%			BB2							
1%				BB2		BB2	BB2	BB2	BB2	
Valeur minimale mesurée	BB2	BB2								BB2 AMO1
					BB2					

Tableau III-10 : Exemple de situation des niveaux de contamination de 2 sédiments échantillonnés lôun en tant que référence (BB2 en vert) et lôautre en tant que contaminé (AMO1 en rouge), par rapport aux sédiments français.

Ainsi le sédiment de lôAmous (AMO1) avec 314 mg / kg dôarsenic est représentatif des fortes concentrations en As parmi les sédiments franco-belges (1 % les plus contaminés), alors que le sédiment de la Bourbre (BB2) se situe parmi les 1 % des sédiments les moins contaminés.
La plupart des contaminants dosés dans les sédiments se situent dans les gammes mesurées dans les sédiments franco-belges (INERIS, 2010). Nos sédiments sont donc représentatifs des niveaux de contaminations franco-belges.

Nous avons élaboré un système de notation des sédiments prenant en compte lôensemble des contaminants :
Pour chaque contaminant un nombre de points a été attribué selon la position du sédiment échantillonné par rapport à la base de données de lôINERIS (2010), avec une valeur dôautant plus importante que la concentration se situe dans les valeurs hautes (Tableau III-11).

Positionnement du sédiment par rapport au contexte français pour un contaminant donné	valeur attribuée
[ ]sédiment Ò[ ] minimum	0
[ ] minimum < [ ]sédiment Ò[ ] 1 %	1
[ ] 1 % < [ ]sédiment Ò[ ] 10 %	2
[ ] 10 %< [ ]sédiment Ò[ ] 1° quartile	3
[ ] 1° quartile < [ ]sédiment Ò[ ] médiane	4
[ ] médiane < [ ]sédiment Ò[ ] 3° quartile	5
[ ] 3° quartile < [ ]sédiment Ò[ ] 90 %	6
[ ] 90 % < [ ]sédiment Ò[ ] 99 %	7
[ ] 99 % < [ ]sédiment Ò[ ] maximum	8

Tableau III-11 : Grille des valeurs attribuées à un sédiment suivant sa position dans le contexte français pour un contaminant donné.

Les valeurs obtenues pour chaque contaminant ont été sommées et le score final obtenu a permis de répartir les sédiments en 6 classes. Chaque classe est représentée par un code couleur allant du bleu ï vert pour les sédiments les moins contaminés au rouge ï noir pour les plus contaminés (Tableau III-12).

A_

catégorie *a priori* du sédiment	
référence	contaminé
PG3	CMA2
PG2	CAJ1
BB2	IBA1
LCB2	MAR1
CMC2	MOR1
NEY1	VID1
PG5	AMO1
LGB2	BION1
	BIE1

B_

Score final obtenu	Couleur attribuée
10 à 19	
20 à 29	
30 à 39	
40 à 49	
50 à 59	
60 à 69	

Tableau III-12 : A_ Couleur attribuée aux sédiments échantillonnés en fonction de leur position par rapport aux sédiments français. B_ Légende du code couleur.

Parmi les 6 classes de contamination, les sédiments classés comme références obtiennent des scores les positionnant comme faisant partie des 4 classes les moins contaminées alors que les sédiments classés comme contaminés font partie des 4 classes les plus contaminées. Cependant une partie des sédiments à la fois références et contaminés se situent dans les classes intermédiaires. Néanmoins nous avons vu que les dosages chimiques seuls ne suffisent pas à catégoriser un sédiment, cœst pourquoi cette classification référence / contaminé sœst principalement basée sur dœautres indices tels que lœanthropisation des sites de prélèvement ou les indices hydrobiologiques.

c. Niveaux de contamination et toxicité

Les sédiments (références et contaminés) présentent des contaminations. Un classement par la contamination n'est pas suffisant pour évaluer le risque toxique d'un sédiment. Nous nous sommes donc aussi basés sur une approche par seuils d'effet :

Il a été proposé dans la littérature d'utiliser des critères de danger correspondant aux concentrations les plus basses en contaminants en dessous desquelles les effets sont peu probables (Effect Range Low ou ERL (Long et al., 1995) ; Threshold Effect Level ou TEL (Mc Donald et al., 1996)) et aux concentrations au-delà desquelles il est probable d'observer un effet (Effect Range Medium ou ERM (Long et al., 1995) ; Probable Effect Level ou PEL (Mc Donald et al., 1996)). L'utilisation des moyennes des valeurs disponibles dans la littérature pour ces critères précédents a été proposée comme approche consensuelle (MacDonald et al., 2000). Ainsi des valeurs de Threshold Effect Concentration (TEC) et de Probable Effect Concentration (PEC) ont été proposées pour un certain nombre de composés (Tableau III-13).

		TEC	PEC
Métaux (mg/kg ps)	Cr	43,4	111
	Ni	22,7	48,6
	Cu	31,6	149
	Zn	121	459
	As	9,8	33,0
	Cd	0,99	4,98
	Pb	35,8	128
	Hg	0,18	1,06
Micropolluants organiques (µg/kg ps)	Anthracène	57,2	845
	Benzo (a) pyrène	150	1450
	Benzo (a) anthracène	108	1050
	Chrysène	166	1290
	Dibenzo (a,h) anthracène	33,0	
	Fluoranthène	423	2230
	Fluorène	77,4	536
	Naphtalène	176	561
	Phénanthrène	204	1170
	Pyrène	195	1520
	HAP totaux	1610	22800
	PCB totaux	59,8	676

Tableau III-13 : TEC et PEC disponibles (MacDonald et al., 2000)

Dans un contexte de contamination multiple, il a été proposé de calculer les PEC moyens (MacDonald et al., 2000). Le quotient obtenu est appelé « quotient PEC moyen » ($Q_{PEC}m$). Le

$Q_{PEC}m$ dôun sédiment est obtenu en moyennant les ratios concentration / PEC de chaque contaminant, selon lôéquation 4.

Equation 4 :

$$Q_{PEC}m = \frac{\sum_{i=1}^{n} \frac{Ci}{PECi}}{n}$$

Où :
C_i = concentration dôun contaminant i
PEC_i = concentration dôeffet prédit associée au contaminant i
n = nombre de contaminant

Selon MacDonald et al. (2000), pour des valeurs de $Q_{PEC}m$ inférieures à 0,5, on sôattend à ce que les échantillons ne soient pas toxiques. Cette prédiction est vérifiée dans 90% des cas pour QPECm < 0.1, ou 83% des cas pour QPECm < 0,5 (n = 347). Ces auteurs proposent donc de retenir un seuil de 0,5 pour classer les sédiments. Nous avons donc appliqué ce calcul à lôensemble de nos sédiments et rangé nos sédiments en 6 classes selon la valeur obtenue, les différentes classes au-delà de 0,5 servant à nuancer le propos. La première classe correspond à la valeur de 0,5 proposées par MacDonald et al. (2000). Une couleur a été attribuée à chaque classe (Tableau III-14).

A_

catégorie *a priori* du sédiment	
référence	**contaminé**
PG3	CMA2
PG2	CAJ1
BB2	IBA1
LCB2	MAR1
CMC2	MOR1
NEY1	VID1
PG5	AMO1
LGB2	BION1
	BIE1

B_

$Q_{pec}m$	Couleur attribuée
0 à 0,49	
0,5 à 0,99	
1 à 1,49	
1,5 à 1,99	
2 à 2,49	
2,5 à 2,99	

Tableau III-14 : A_ Couleur attribuée aux sédiments échantillonnés en fonction de leur $Q_{PEC}m$. B_ Légende du code couleur.

Tous les sédiments que nous avions sélectionnés comme références sôavèrent présenter des $Q_{PEC}m$ très faibles, inférieures au seuil de 0,5 proposé par MacDonald et al. (2000). Ce constat nous conforte dans notre classement de ces sédiments en tant que références.
En revanche, pour 4 des sédiments contaminés, ce seuil est dépassé, ce qui tend à indiquer que leur niveau de contamination présente un danger toxique. Cinq des sédiments contaminés présentent de $Q_{pec}m$ inférieurs au seuil de risque toxique, cependant il est important de

rappeler que les dosages effectués ne sont pas exhaustifs et qu'il n'existe pas de seuils TEC et PEC pour tous les contaminants. Les valeurs $Q_{pec}m$ sont donc seulement indicatives.

III Organisation des expérimentations

Les 3 espèces ont été testées sur 8 sédiments de référence, 9 sédiments naturellement contaminés et 1 sédiment de référence dopé à 5 concentrations de cadmium allant de 0,5 à 19,5 mg / kg ps. Les chironomes ont également été testés sur 2 sédiments supplémentaires naturellement contaminés.

Plusieurs traits de vie par espèce ont été suivis sur chaque sédiment :

- La reproduction des adultes, l'alimentation des mâles adultes et la croissance des juvéniles chez les *G. fossarum*.
- La croissance des larves et l'émergence des imagos chez les *C. riparius*.
- La reproduction des adultes et la croissance des juvéniles chez *P. antipodarum*.

Etant donné le nombre de sédiments, les expérimentations ont été réalisées en cinq séries successives nommées S1 à S5 (Figure III-5). La série S1 comprend les sédiments PG2, LCB2, CMC2, BB2 (références) et CMA2 (contaminé). La série S2 comprend le sédiment PG3 dopé en Cd (témoin et cinq concentrations). La série S3 est composée de sédiments contaminés seulement (VID1, MAR1, MOR1, IBA1 et CAJ1), tout comme la série S4 (PIZ1 et JEAN1). Enfin la série S5 est composée de PG5, NEY1, LGB2 (références) et BION1, AMO1 et BIE1 (contaminés).

Pour les séries S1, S2 et S3 tous les traits de vie des trois espèces ont été testés. Pour S5 le test de reproduction des gammares n'a pas été effectué par manque d'organismes. Pour S4, seuls les chironomes ont été exposés.

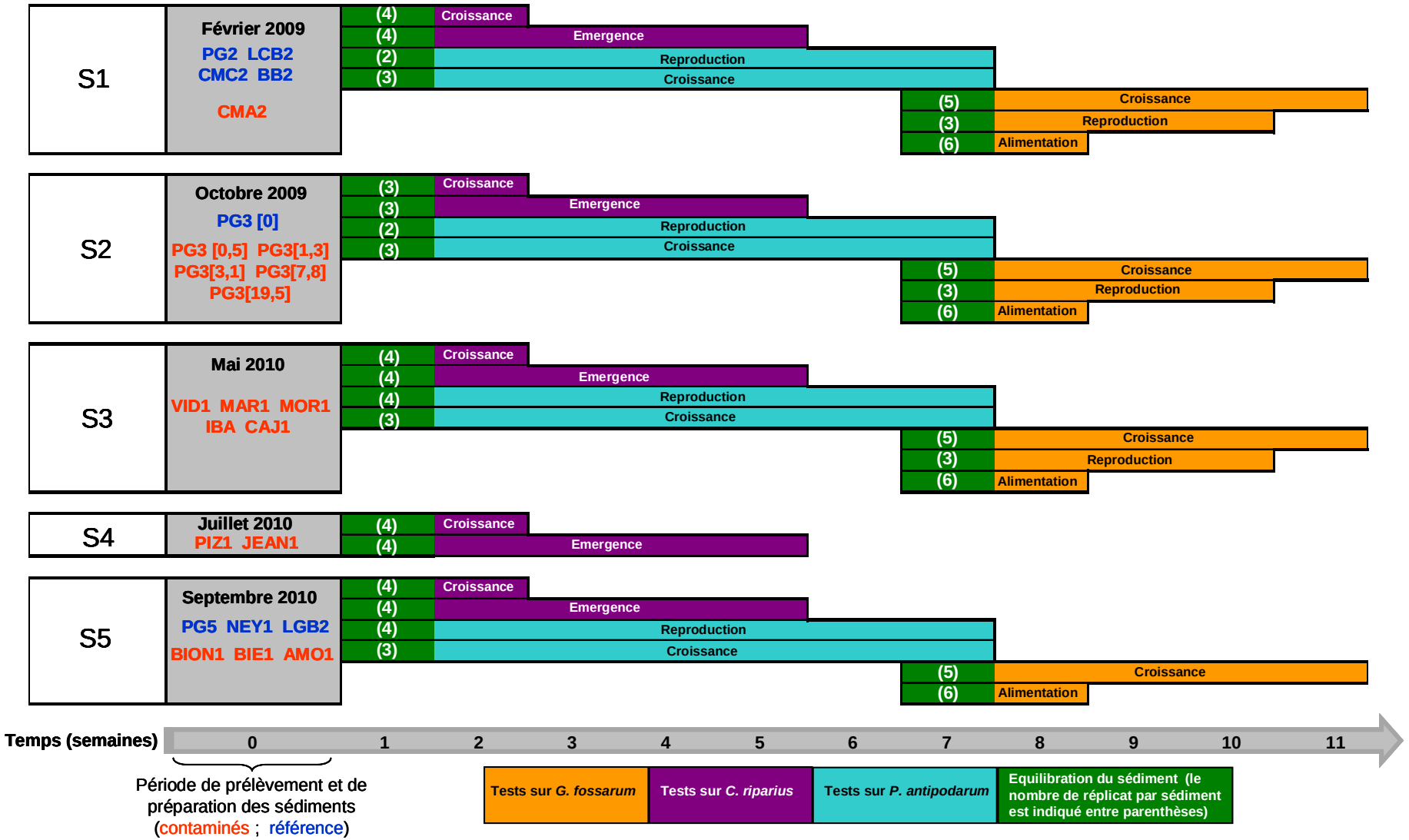


Figure III-5 : Schéma organisationnel des cinq séries dœxpérimentation (S1 à S5)

IV Discussion

Pour effectuer la sélection des sites de prélèvement, nous avons opté pour une approche *a priori*, à lôaide des connaissances du laboratoire (anciens dosages ; littératureé). Les sédiments ont été sélectionnés pour répondre au mieux aux exigences de (i) caractéristiques géochimiques variées des sédiments de référence (ii) caractéristiques géochimiques comparables entre sédiments de référence et contaminés (iii) sédiments de référence peu contaminé et (iv) sédiments contaminés avec des typologies de contamination variées.

La diversité même des sites sélectionnés comme références (sur des cours dôeau différents) a permis dôobtenir 8 sédiments aux propriétés géochimiques très différentes (texture limoneuse à sableuse ; contenu de 2 à 15 % de matière organiqueé), et représentatifs des sédiments français et belges. Nous avons également constaté que dans une grande majorité, les propriétés des sédiments contaminés sont comparables à celles des sédiments de référence, la seule exception concernant le taux dôAVS plus élevé pour 2 sédiments contaminés que pour les références. Le plus souvent, les AVS accompagnent justement les pollutions.

Les dosages de métaux, PCB et HAP effectués dans nos sédiments (références et contaminés confondus) montrent des concentrations dans les gammes mesurées dans les sédiments français et belges. Nos sédiments sont donc représentatifs des contaminations que lôon peut retrouver sur les territoires français et belges.

Il est difficile, voire impossible, de trouver un site exempt de toute contamination. Nous avons dôailleurs constaté que les sédiments de référence contiennent des contaminants avec des concentrations allant jusquôà dépasser les valeurs médianes françaises (INERIS, 2010). Cependant, pour tous les sédiments de référence, ces concentrations sont sans effet toxique attendu ($Q_{pec}m < 0,5$). De plus, la sélection des sites de référence sôest effectuée sur des zones géographiques globalement peu anthropisées (Figure III-2) et sur des cours dôeau avec de bonnes caractéristiques hydrobiologiques (Tableau III-2). Ces informations sur les sites de prélèvement des références (hydrobiologie, localisation géographique, anthropisation), combinées aux données de contaminations des sédiments (classement des sédiments, $Q_{PEC}m$) constituent autant dôindications qui valident notre classement de ces sédiments comme références.

Pour 45 % des sédiments classés comme contaminés, les niveaux de contamination laissent attendre des effets toxiques ($Q_{pec}m > 0,5$; Tableau III-14). Pour les autres, ce sont les informations à notre disposition concernant les sites de prélèvement qui nous ont permis de les classer en tant que contaminés. Il est important de rappeler que les dosages effectués ne sont pas exhaustifs. Par exemple, d'après ce classement, le sédiment du Rhin se trouve dans la même classe que les références, mais il a été sélectionné à cause de sa contamination en HCB, non dosé ici et donc non pris en compte dans le calcul des $Q_{pec}m$. On peut supposer que si le HCB avait été dosé, ce sédiment pourrait changer de classe de contamination et ainsi se distinguer des références. Pour de nombreux contaminants, aucune valeur TEC et PEC n'a été publiée. Si elles étaient calculées, le classement de nos sédiments serait susceptible d'être modifié.

Le choix d'utiliser 0,5 comme valeur $Q_{pec}m$ pour le classement des sédiments, recommandé par MacDonald et al. (2000), est discutable. En effet, l'utilisation de ce seuil permet de vérifier la prédiction (effet toxique ou non) dans 83 % des cas. La probabilité de vérifier cette prédiction serait de 90 % en abaissant ce seuil à 0,1 (MacDonald et al., 2000; Babut et Perrodin, 2001). Le classement des sédiments par la chimie dépend du seuil (par exemple $Q_{pec}m$ de 0,5 ou de 0,1) et reste donc arbitraire. Les autres indicateurs qui nous ont servi à établir le classement des sédiments, comme l'hydrobiologie ou la situation géographique, sont donc d'une importance primordiale.

L'ensemble des informations sur nos sédiments tendent à valider leur classement dans les catégories références et contaminées.

Bilan de la sélection des sédiments

- Les sédiments de référence sélectionnés sont de qualité acceptable, compte tenu des informations disponibles (ex : localisation des sites, valeurs $Q_{PEC}m$). De plus, leurs propriétés géochimiques sont très variées (ex : texture sableuse à limoneuse ; 2 à 15 % de MO).
- Les sédiments contaminés présentent des caractéristiques géochimiques comparables à celles des sédiments de référence (ex : texture, contenu en MO).
- Les mesures chimiques complémentaires tendent à confirmer que nos références présentent peu de risque toxique.
- En revanche, les sédiments contaminés présentent des risques toxiques avérés dans 45 % des cas ($Q_{pec}m > 0,5$) pour les contaminants dosés. Pour les autres, les contaminants dont la présence est suspectée n'ont pas été dosés, mais la probabilité d'une toxicité liée à ces contaminants est forte.
- Plusieurs typologies de contamination sont représentées (métaux ; HCB ; STEP).
- Les sédiments sélectionnés présentent une bonne représentativité des sédiments français et belges.

Chapitre 4

Etude de la variabilité naturelle des traits de vie sur des sédiments de référence et définition des seuils de réponse

Ce chapitre a pour objectif de présenter et discuter les résultats obtenus lors des expérimentations sur les sédiments de référence réalisées sur les 3 espèces modèles. Les résultats sont présentés pour chaque sédiment testé, organisme par organisme et trait par trait (expérimentations indépendantes), et seront interprétés selon la démarche précédemment décrite (Figures II-10 et II-11).

Pour rappel, la variabilité naturelle des traits de vie en conditions de référence a été étudiée sur 8 sédiments faiblement contaminés aux caractéristiques géochimiques contrastées (perte au feu, granulométrie, teneur en carbonatesé). Sur ces 8 sédiments, 3 (PG2, PG3 et PG5) ont été échantillonnés sur le même site (PG), mais à des périodes différentes de lœtude.

A partir des réponses de chaque trait de vie étudié, des seuils référentiels (SR) seront établis. Ces SR correspondront aux 2,5^{ème} et 97,5^{ème} centiles de la distribution des réponses médianes de chaque trait de vie des organismes exposés aux sédiments de référence.

I *Gammarus fossarum*

Dans ce paragraphe les résultats obtenus sont présentés pour les différents tests réalisés sur les traits de vie suivants :

- Tests de croissance : taux de survie, taux de croissance
- Tests d'alimentation : taux de survie, taux d'alimentation
- Tests de reproduction : taux de survie, nombre d'embryon par femelle, nombre d'ovocyte par femelle et surfaces ovocytaire

Pour rappel, les expérimentations se sont déroulées dans des systèmes thermo-régulés à 12°C, sous renouvellement d'eau continu et avec une quantité de nourriture *ad libitum*. Les organismes, prélevés sur le terrain puis stabulés au laboratoire, ont été exposés à un total de 8 sédiments de référence lors des tests de croissance et d'alimentation. Les prélèvements d'organismes sur le terrain n'ont pas toujours permis d'obtenir suffisamment d'individus pour le lancement des tests. Ainsi, par manque d'organismes, la reproduction n'a été suivie que sur 5 sédiments de référence au lieu de 8.

Le test de reproduction a été effectué suivant le protocole décrit par Geffard et al. (2010). Des couples de gammares, sélectionnés en fonction du cycle de reproduction des femelles (en début de cycle, cf chapitre 2), ont été exposés 3 semaines aux sédiments. En fin d'exposition, le comptage des individus survivants a permis de calculer leur taux de survie. Le nombre d'embryons et d'ovocytes ainsi que les surfaces ovocytaires moyennes ont été mesurées, pour chaque sédiment, sur une dizaine de femelles au stade de leur cycle de reproduction C2 (d'après Geffard et al. (2010)).

Le taux moyen d'alimentation, a été évalué après 1 semaine d'exposition aux sédiments par des mesures des surfaces foliaires consommées par les mâles adultes. Les taux de survie de ces individus ont été également calculés en fin de test.

Enfin, les juvéniles fraichement pondus ont été mesurés et dénombrés en début et en fin d'une exposition de 4 semaines aux sédiments afin de calculer un taux de croissance moyen et un taux de survie.

1. Résultats des biotests sur sédiments de référence avec *G. fossarum*

a. Reproduction

Lors de ce test l'un des réplicats du sédiment CMC2 a été perdu, les mesures de reproduction (nombre d'embryon et d'ovocytes par femelle et surfaces ovocytaires) et les taux de survie ont donc été calculés sur 2 réplicats pour ce sédiment et 3 pour les autres.

Le stade de reproduction des femelles a un impact sur les critères de reproduction suivis (nombre d'embryon, nombre d'ovocyte et surfaces ovocytaires) (Geffard et al., 2010). Les femelles analysées pour ces critères doivent donc être synchrones dans leur stade de reproduction afin que les résultats soient comparables. Pour les 5 sédiments testés, la majeure partie des femelles avait atteint le stade de reproduction C2 (Geffard et al., 2010). Ainsi 6 à 10 femelles en stade C2 ont été analysées pour chaque sédiment. Les SR_{min} et SR_{max} ont été définis (Tableau IV-1), et sont de 2,3 à 4,7 embryons par femelle ; 3,3 à 4,9 ovocytes par femelle, et une surface par ovocyte allant de 90698 à 115104 µm². Les CV intra sédiments pour le nombre d'embryon et le nombre d'ovocyte par femelle sont parfois élevés (jusqu'à 40 % pour le nombre d'embryons, et 45 % pour le nombre d'ovocytes). Les valeurs élevées marquent une forte variabilité biologique. Cette variabilité se retrouve entre les sédiments, à moindre échelle, pour le critère du nombre d'embryon par femelle avec un CV inter sédiments de 17,5 %. Les CV inter sédiments sont très faibles (< 10 %) pour les critères de nombre d'ovocyte et les surfaces ovocytaires et nous ne notons pas de différence significative entre les résultats obtenus pour les sédiments. Les caractéristiques géochimiques des différents sédiments testés ne semblent donc pas impacter certaines réponses, critères de nombre et surface des ovocytes. Concernant le nombre d'embryons produits par femelle, il existe une différence significative entre les sédiments testés. Cependant, la variabilité de réponse inter-sédiments reste peu élevée (17,5 %).

Après 21 jours, les taux de survie des organismes exposés étaient excellents, avec un SR_{min} calculé à 81 % de survie, et peu variables avec des coefficients de variation (CV) inter réplicats allant de 4 à 13 % selon le sédiment. Les taux de survie sont également reproductibles d'un sédiment à l'autre puisque le CV inter sédiment observé est de 9,1 %. Aucune différence statistiquement significative n'a été mise en évidence entre les survies sur

les différents sédiments, ce qui montre que les caractéristiques géochimiques des sédiments testés n'ont qu'une très faible influence sur les taux de survie.

b. Alimentation

Le test d'alimentation consiste à mesurer le taux de nutrition individuel de mâles gammares adultes et de taille homogène (entre 11 et 12 mm). Les taux de survie sont également mesurés. Les individus ont été exposés pendant une semaine dans 6 réplicats de chaque sédiment. Après 7 jours d'exposition aux sédiments faiblement contaminés, les taux moyens de survie observés sont excellents et peu variables, avec un SR_{min} calculé à 95,7 %. Les CV inter réplicats associés aux mesures de survie sont inférieurs à 10 % et le CV inter sédiments est de 2 %. Les SR_{min} et SR_{max}. Les taux d'alimentation ont été calculés à 25 et 41 mm² / jour / individu respectivement, sur la base des réponses obtenues sur l'ensemble des sédiments de référence (Tableau IV-1). Pour chaque sédiment, les CV intra sédiment, associés à la mesure du taux d'alimentation, calculés sur les 6 réplicats par sédiment, sont inférieurs à 25 %. Le CV inter sédiments est faible (12,6 %), mais une différence significative de taux d'alimentation entre les sédiments a été calculée (Tableau IV-1). Il y a donc une influence possible du sédiment sur le taux d'alimentation.

c. Croissance

Les tests de croissance ont été effectués sur des gammares juvéniles fraîchement pondus. Le taux de survie et le taux de croissance des individus ont été mesurés après 4 semaines d'exposition et dans 5 réplicats par sédiment à l'exception de CMC2 et LCB2 pour chacun desquels 1 réplicat a été perdu. Après 28 jours, les taux de survie des juvéniles sont très bons pour tous les sédiments (> 75 %) et peu variables (CV inter réplicats < 25 % et CV inter sédiments de 10 %). Ils donnent lieu à un SR_{min} acceptable de 69 %.

Les taux de croissance des juvéniles ont permis de calculer les SR_{min} et SR_{max} en conditions de référence (Tableau IV-1) à 0,031 et ,056 mm / jour respectivement. Les CV entre les réplicats de chaque sédiment, sont inférieurs à 16 %. Le CV inter sédiments est de 15 %. Le taux de croissance des juvéniles est donc peu variable mais impacté par les caractéristiques intrinsèques des sédiments testés puisqu'une différence significative de taux de croissance a été calculée selon le sédiment en question (Tableau IV-1).

	Survie, Embryons produits, Nombre et surface des ovocytes 21 jours												Survie et Alimentation des mâles 7 jours						Survie et Croissance des juvéniles 28 jours					
	Survie (%)			Nombre d'embryon pondéré par femelle			Nombre d'ovocyte pondéré par femelle			Surface ovocytaire (µm²)			Survie (%)			Taux d'alimentation (mm²/jour/individu)			Survie (%)			Taux de croissance (mm/jour)		
Sédiment	médiane	CV inter réplicats (%)	n	médiane	CV inter réplicats (%)	n	médiane	CV inter réplicats (%)	n	médiane	CV inter réplicats (%)	n	médiane	CV inter réplicats (%)	n	médiane	CV inter réplicats (%)	n	médiane	CV inter réplicats (%)	n	médiane	CV inter réplicats (%)	n
PG3	80,0	13,3	3	2,5	20,5	6	3,5	45,3	6	95864	20,8	6	100,0	0,0	6	26,6	18,4	6	80,0	9,2	5	0,045	10,3	5
PG2	100,0	4,2	3	4,0	13,2	10	4,5	14,5	10	104031	14,3	10	100,0	0,0	6	34,1	15,2	6	86,7	15,0	5	0,041	10,0	5
BB2	100,0	4,2	3	4,1	28,8	7	4,2	24,7	7	106987	11,8	7	96,7	3,8	6	31,9	14,9	6	86,7	7,9	5	0,036	5,5	5
LCB2	100,0	4,2	3	3,5	39,8	8	4,4	18,6	8	110366	10,1	8	100,0	0,0	6	33,1	8,4	6	76,7	19,6	4	0,040	15,6	4
CMC2	96,4	5,2	2	3,5	20,8	7	3,8	22,0	7	97258	10,6	7	100,0	3,5	6	28,4	11,2	6	100,0	18,2	4	0,036	8,3	4
NEY1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	100,0	8,4	6	35,8	24,3	6	76,9	14,3	5	0,043	10,2	5
PG5	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	100,0	4,2	6	36,2	25,0	6	76,9	12,8	5	0,049	11,4	5
LGB2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	95,0	5,8	6	39,2	13,9	6	76,9	22,1	5	0,055	11,7	5
p-value (test effectué)	0,626 (KW)			0,005 (KW)			0,100827 (ANOVA)			0,494673 (ANOVA)			0,147 (KW)			0,001 (KW)			0,063 (KW)			0,000013 (ANOVA)		
moyenne	95,3		5	3,5		5	4,1		5	102901		5	99,0		8	33,2		8	82,6		8	0,043		8
écart type	8,7		5	0,6		5	0,4		5	6226		5	2,0		8	4,2		8	8,2		8	0,006		8
CV inter sédiments (%)	9,1		5	17,5		5	9,8		5	6,1		5	2,0		8	12,6		8	10,0		8	14,8		8
Seuil de réponse inférieur (P95%)	81,0			2,3			3,3			90698			95,7			25,0			69,1			0,031		
Seuil de réponse supérieur (P95%)	-			4,7			4,9			115104			-			41,3			-			0,056		

Tableau IV-1 : Résultats obtenus pour chaque trait testé sur le crustacé *G. fossarum* et SR obtenus. L'existence (ou absence) de différences de réponse de chaque trait de vie entre les sédiments testés a été vérifiée par des tests statistiques appropriés (ANOVA ou Kruskal-Wallis noté KW, cf chapitre 2), les résultats (p-value) sont également présentés dans ce tableau.

2. Discussion

La mise en î uvre des tests dôalimentation et de croissance est très simple, avec peu de compétences techniques nécessaires. La durée du test dôalimentation est courte (1 semaine) En ce qui concerne la reproduction, si le dénombrement des ovocytes est rapide et techniquement simple (observation de la femelle *in vivo* sous loupe binoculaire), la mesure des surfaces ovocytaires nécessite dôavoir à disposition un microscope équipé pour la prise dôimage. De plus une formation aux techniques de prise dôimage et de mesure des ovocytes est nécessaire.

Pour lôensemble des tests, une autre contrainte technique réside dans la nécessité dôavoir à disposition un stock de feuilles afin de nourrir les organismes. Ces feuilles sont ramassées à lôautomne lors de leur chute. Il nôest donc pas possible de mettre en î uvre ce test en plein été par exemple, si un stock de feuilles nôa pas été prévu lôautomne précédent. De plus, une modification de la nourriture distribuée pourrait modifier les taux dôalimentation des gammares (Bundschuh et al., 2009). Il serait donc intéressant dôenvisager un système de standardisation du conditionnement de feuilles afin que les tests soient comparables dôun laboratoire à un autre.

La disponibilité des organismes peut également être un facteur limitant sur lequel nous nôavons pas de contrôle, chaque série de test étant dépendante des prélèvements effectués sur le terrain. De plus, pour les tests de reproduction et dôalimentation il a été montré dans différentes études lôimportance de la standardisation des organismes utilisés (Dedourge-Geffard et al., 2009; Geffard et al., 2010). Cependant, plus les critères de sélection des individus sont standardisés et strictes, plus il est compliqué dôavoir des individus en nombre suffisant. Côest par exemple ce qui sôest passé lors de la série S5 du test de reproduction ou les prélèvements dôorganismes ne contenaient pas un nombre suffisant de femelles en précopulat et en fin de cycle de mue.

Les expérimentations ont tout de même été menées avec succès. Les conditions dôexposition employées ont permis, pour lôensemble des tests, dôobtenir de très bons taux de survie (> 80 % pour les adultes et > 75 % pour les juvéniles). Pour chaque critère mesuré pour chacun des traits (reproduction, alimentation et croissance) nous avons défini avec succès des SR_{min} et SR_{max} en conditions de référence. Les résultats obtenus sur les sédiments de référence sont très reproductibles, avec pour chaque critère considéré pour chacun des traits (reproduction, alimentation, croissance, survie), des CV inter sédiments inférieurs à 18 % (tableau IV-1).

Reproduction

Les mesures de surfaces ovocytaires sont en accord avec les travaux de Geffard et al. (2010) qui propose une surface folliculaire moyenne de 106000 µm², pour des organismes exposés dans l'eau du laboratoire, sans sédiment, contre 102900 µm² dans notre étude, au même stade du cycle de reproduction. En ce qui concerne le nombre d'ovocytes et d'embryons, Geffard et al. (2010) calculent un nombre d'ovocytes et d'embryons moins important, avec 13,4 ovocytes et 12,9 embryons par femelle, contre 16,9 et 14,7 respectivement dans notre étude. Ces différences peuvent probablement être expliquées par une différence de taille des femelles (12,2 mm dans cette étude, contre 8,3 mm dans celle de Geffard et al. (2010). En effet le nombre d'embryons par portée est proportionnel à la taille de femelles (Sutcliffe, 1993).

La cohérence des résultats obtenus avec des organismes maintenus en présence de différents sédiments ou dans l'eau seule (Geffard et al., 2010), tend à montrer une bonne stabilité de ces traits de vie. D'ailleurs, les mesures que nous avons effectuées sur les critères de nombre d'embryons, nombre d'ovocytes et surfaces ovocytaires sont répétables, peu variables entre les sédiments et non impactées par les caractéristiques géochimiques des sédiments testés (robustes). Des traits à la fois peu variables, et non impactés par les caractéristiques géochimiques des sédiments, présentent un bon potentiel pour la détection future d'effets d'une contamination des sédiments. Il faut tout de même noter que la mesure du nombre d'ovocytes par femelle présente une forte variabilité intra sédiment (jusqu'à 45 %) qui est susceptible de masquer l'effet potentiel des caractéristiques géochimiques des sédiments sur ce trait.

Les critères de nombre et de surface des ovocytes concernent un même organe et donc les mêmes fonctions biologiques, il est donc possible que l'information apportée par l'utilisation de ces 2 traits soit redondante.

Les résultats obtenus pour le critère du nombre d'embryons, sont à prendre avec précaution car lors de la manipulation des femelles, et en particulier lors du tamisage des béchers, il est possible de perdre quelques embryons. La mesure du nombre d'embryon par femelle est d'ailleurs assez variable, à la fois entre les mesures effectuées sur un même sédiment (CV intra sédiment allant jusqu'à 40 %), et entre sédiments (CV inter sédiments de 17,5 %). Ce critère est sans doute le moins fiable des 3 testés.

Alimentation

Dans une étude de Dedourge-Geffard et al. (2009), les taux de consommation de feuilles mesurés sur des organismes en cage *in situ*, étaient de 19 et 23 mm² pour les sites de contrôle, contre 33 mm² dans ce travail de thèse. Cette différence pourrait être due à une qualité médiocre des sites de contrôle ou à une taille d'organismes différente (non précisée dans l'étude). En effet, la taille des individus conditionne leur consommation de feuilles (Coulaud et al., 2011). Pour une taille de mâles de 11 à 12 mm, similaire à celle des organismes exposés, les résultats sont en accord avec les résultats déjà obtenus au laboratoire (Coulaud et al., 2011), avec une consommation individuelle journalière de feuilles d'aulne d'environ 33 mm² en moyenne. La mesure du taux d'alimentation est donc reproductible d'une étude à l'autre et répétable dans le temps. Cette répétabilité se retrouve également dans les coefficients de variations peu élevés mesurés sur les sédiments de référence (CV intra sédiment maximum de 25 % et CV inter sédiments de 12,6 %).

Malgré l'impact significatif des caractéristiques géochimiques des sédiments, testés sur la mesure du taux d'alimentation, la répétabilité et la faible variabilité de ce critère tendent à indiquer son bon potentiel pour la détection d'effets toxiques des contaminants.

Le conditionnement des feuilles peut aussi avoir un impact sur leur consommation par les gammares. Une étude a montré que selon le type de micro-organismes qui se développent en surface des feuilles les gammares mangent des quantités de feuilles variables (Bundschuh et al., 2009). Pour s'assurer de la fiabilité de la mesure, il est donc important de contrôler la qualité des aliments distribués.

Les mesures de survies d'adultes, associées au test d'alimentation, tout comme celles associées au test de reproduction, montrent que ce trait est peu variable et non impacté par les caractéristiques géochimiques des sédiments testés, et qu'il présente donc un bon potentiel pour une application à l'évaluation du risque toxique des contaminations des sédiments.

Croissance

Les mesures de croissance disponibles pour les gammares ont très souvent été effectuées en estimant un gain de poids (Maltby et al., 1990) ou des différences d'énergie métabolisée (Sutcliffe et al., 1981), ce qui rend les comparaisons de nos résultats avec les données de la littérature impossible. Cependant, les taux de croissance de *G. fossarum* ont été mesurés en phase aqueuse (données personnelles non publiées). Ils sont inférieurs à ceux obtenus sur sédiments, avec une moyenne de 0,026 mm / jour en eau contre 0,043 mm / jour en sédiment. Les sédiments représentent un important apport alimentaire (apport conséquent de MO avec des pertes au feu allant de 2 à 15 %), qui peut soutenir de meilleurs taux de croissance qu'en

phase aqueuse. Cependant, aucune donnée n'est disponible concernant la croissance de *G. fossarum* exposés à des sédiments naturels. Des études ont été réalisées chez *Gammarus pulex*, une espèce proche, dont le taux de croissance en eau naturelle est linéaire les deux premiers mois de sa vie avec une croissance de 0,037 mm / jour (Garric et Geffard, 2007). Cette croissance est très proche des valeurs mesurées ici et semble cohérente. Les mesures de croissance effectuées sont peu variables (CV intra sédiment maximum de 15,6 % et CV inter sédiments de 14,8 %) mais impactées par les caractéristiques géochimiques des sédiments testés. Il sera donc nécessaire d'évaluer le potentiel de ce critère dans la détection d'effets toxiques des sédiments contaminés.

Les mesures de survies des juvéniles ont répondu à l'image des survies des adultes (peu variables et non impactées par les caractéristiques géochimiques des références) et présentent donc un bon potentiel pour la détection des effets des contaminations des sédiments.

Bilan des tests sur *G. fossarum*

- SR définis pour lœensemble des traits considérés (tableau IV-1).

- Critères de survies (adultes et juvéniles), nombre dœovocyte par femelle et mesure des surfaces ovocytaires peu variables et non impactées par les caractéristiques géochimiques des sédiments testés : très bon potentiel pour la détection dœeffets toxiques des sédiments contaminés.
  Critères taux de croissance des juvéniles et taux dœalimentation des mâles adultes peu variables mais impactés pas les caractéristiques géochimiques des sédiments testés : bon potentiel potentiel pour la détection dœeffets toxiques des sédiments contaminés.
  Critère nombre dœembryons par femelle le plus variable, le moins fiable et impacté par les caractéristiques géochimiques des sédiments testés : mauvais potentiel pour la détection dœeffets toxiques des sédiments contaminés.

- Tests de croissance et dœalimentation très faciles à mettre en î uvre et de courte durée pour le test dœalimentation (1 semaine).

- Test de reproduction facile à mettre en î uvre. Mesure du nombre dœovocytes simple. Contraintes techniques importantes pour la mise en î uvre de la mesure des surfaces ovocytaires (matériel et formation).

- Nombre dœorganismes disponibles limitant.

II *Chironomus riparius*

Ce paragraphe présente les résultats des biotests effectués sur les chironomes, avec :

- Dans une première partie, les tests de croissance sur lesquels sont calculés des taux de survie et des taux de croissance des larves.
- Dans une deuxième partie, les résultats des tests d'émergence avec des calculs des taux de survie, des taux d'émergence des imagos et la vitesse de développement des mâles et des femelles.

Pour chacun de ces traits de vie un total de 8 sédiments de référence a été testé. Les protocoles de la méthode standard NF T90-339-1 (AFNOR, 2010) ont été rigoureusement appliqués sur des organismes issus des cultures du laboratoire. Lors des tests de croissance, la taille des larves a été mesurée en début et fin d'une exposition d'une semaine afin de calculer un taux moyen de croissance. Le nombre de survivants a été compté en fin d'exposition pour déterminer le taux de survie. Les tests d'émergence ont été conduits durant 28 jours pendant lesquels les mâles et femelles émergents étaient dénombrés quotidiennement. Ces données ont permis de calculer des taux moyens d'émergence et les vitesses de développement des larves des 2 sexes (OCDE, 2010). Le nombre de survivants lors des tests d'émergence correspond à la somme du nombre d'individus ayant émergé et des larves retrouvées vivantes en fin d'exposition.

1. Résultats sur sédiments de référence avec *C. riparius*

a. Croissance

Pour 1 des 3 des réplicats du sédiment CMC2, aucun organisme n'a été retrouvé mort ou vivant, ce réplicat n'a pas été pris en compte dans les résultats.

Les taux de croissance journaliers ont été mesurés et les SR_{min} et SR_{max} associés ont été calculés pour l'ensemble des résultats obtenus pour les 8 sédiments références et correspondent respectivement à 0,90 et 1,36 mm / jour (Tableau IV-2). Bien qu'une différence statistiquement significative existe entre les taux de croissance obtenus pour les sédiments de référence, les coefficients de variations (CV) inter réplicats observés atteignent

un maximum de 13,3 %, alors que le CV inter sédiment est de 10,4 %, ce qui suggère que lôinfluence des caractéristiques sédimentaires sur la croissance est faible.

Après 7 jours, le SR_{min} de survie acceptable est de 61 %, mais les taux de survie sont assez variables au sein des réplicats pour 3 des sédiments (CV inter réplicats allant jusquôà 33 %). En revanche, le CV inter sédiments est de lôordre de 15 % et aucune différence significative entre les taux de survie pour les sédiments de référence nôa été montrée, ce qui suggère que les caractéristiques intrinsèques des sédiments testés nôont quôune faible influence sur la variabilité des taux de survie. Lôimpact potentiel des caractéristiques géochimiques des sédiments testés peut cependant être masqué par la forte variabilité intra sédiments observée.

b. Emergence

Suite à des problèmes techniques sur 2 des 4 réplicats du sédiment PG2, les valeurs obtenues pour ces réplicats nôont pas été prises en compte dans lôanalyse des données.

Après 28 jours dôexposition, nous avons calculé les taux dôémergence moyens et les vitesses moyennes de développement pour chaque sexe ainsi que les seuils de réponse minimum et maximum pour ces 3 critères sur lôensemble des références (Tableau IV-2). Les taux dôémergence sont élevés, avec un SR_{min} acceptable de 67 %. Les CV inter réplicats pour ce critère sont parfois importants (jusquôà 40 %), montrant une forte variabilité biologique. En revanche le CV inter sédiments est faible (9,4 %). Les résultats obtenus pour les taux de survie sont du même ordre, avec une survie minimale observée 70 % (Tableau IV-2), un SR_{min} associé défini à 67 %, un CV inter sédiments de 9,4 %, et des CV intra sédiments élevés (jusquôà 37 %). Aucune différence significative entre les 8 sédiments ni pour les taux dôémergence, ni pour les taux de survie nôont été montrées. Les propriétés géochimiques des sédiments nôont donc pas eu dôimpact sur les taux dôémergence et la survie des chironomes.

Les vitesses de développement obtenues pour les 2 sexes sont peu variables entre les réplicats dôun même sédiment (CV intra sédiment maximum de 10 %), et entre sédiments (CV inter sédiments de 5,0 % pour les mâles et 4,6 % pour les femelles), ce qui montre une grande robustesse et répétabilité de ce trait. Les SR des vitesses de développement sont plus importants pour les mâles (0,060 à 0,073 $jour^{-1}$) que pour les femelles (0,056 à 0,067 $jour^{-1}$). Il a été calculé une différence statistiquement significative entre les vitesses de développement obtenues pour les différents sédiments de référence testés (pour les 2 sexes). Il y a donc un impact des CV intra caractéristiques géochimiques des sédiments testés sur les vitesses de développement.

	Survie et Croissance 7 jours						Survie, Taux d'émergence et Vitesses de développement 28 jours											
	Survie (%)			Taux de croissance (mm/jour)			Survie (%)			Taux d'émergence (%)			Vitesse de développement des mâles (1/jour)			Vitesse de développement des femelles (1/jour)		
Sédiment	médiane	CV inter réplicats (%)	n	médiane	CV inter réplicats (%)	n	médiane	CV inter réplicats (%)	n	médiane	CV inter réplicats (%)	n	médiane	CV inter réplicats (%)	n	médiane	CV inter réplicats (%)	n
PG3	70,0	8,7	3	1,10	12,0	3	90,0	11,1	3	90,0	11,1	3	0,070	3,7	3	0,066	2,1	3
PG2	80,0	22,0	3	1,12	9,5	3	75,0	28,3	2	75,0	28,3	2	0,066	8,2	2	0,063	4,6	2
BB2	93,3	7,1	3	1,02	8,7	3	70,0	23,1	4	70,0	23,1	4	0,070	4,6	4	0,062	10,1	4
LCB2	97,8	3,9	3	1,33	4,4	3	70,0	18,6	4	70,0	18,6	4	0,067	1,8	4	0,062	0,5	4
CMC2	70,0	33,7	2	1,07	3,2	2	85,0	31,7	4	85,0	31,7	4	0,069	1,1	4	0,060	8,9	4
NEY1	90,0	12,8	4	1,29	2,7	4	85,0	17,7	4	85,0	17,7	4	0,065	1,6	4	0,064	1,9	4
PG5	90,0	9,1	4	1,08	8,8	4	90,0	14,4	4	85,0	15,2	4	0,064	0,7	4	0,059	4,3	4
LGB2	65,0	26,1	4	1,03	13,3	4	85,0	37,1	4	80,0	40,0	4	0,060	2,7	4	0,057	4,8	4
p-value (test effectué)	0,120 (KW)			0,031 (KW)			0,658 (KW)			0,758 (KW)			0,010 (KW)			0,031 (KW)		
moyenne	82,0		8	1,13		8	81,3		8	80,0		8	0,066		8	0,061		8
écart type	12,5		8	0,12		8	8,3		8	7,6		8	0,003		8	0,003		8
CV inter sédiments (%)	15,2		8	10,4		8	10,3		8	9,4		8	5,0		8	4,6		8
Seuil de réponse inférieur (P95%)	61,5			0,90			67,5			67,6			0,060			0,056		
Seuil de réponse supérieur (P95%)	-			1,36			-			-			0,073			0,067		

Tableau IV-2 : Résultats obtenus pour chaque trait suivi chez lôinsecte *C. riparius* et SR obtenus. Lôexistence (ou absence) de différences de réponse de chaque trait de vie entre les sédiments testés a été vérifiée par des tests statistiques appropriés (ANOVA ou Kruskal-Wallis noté KW, cf chapitre 2), les résultats (p-value) sont également présentés dans ce tableau.

2. Discussion

Les tests effectués sur *C. riparius* ont été mis en place suivant la norme AFNOR (2010). Ces tests sont très simples à mettre en î uvre et les protocoles sont déjà largement utilisés et diffusés.

Contrairement aux 2 autres organismes de test, le trait « reproduction » chez cette espèce nôa pas été évalué dans le cadre de cette batterie de test. La poursuite des tests jusquôau suivi de reproduction (cycle de vie complet) a été depuis recommandée dans la norme OCDE 233 (2010). Lôeffort supplémentaire nécessaire pour la mise en place de ce test en continuité du suivi de lôémergence est faible et est à envisager en perspective de ce travail.

Survie et Taux dôémergence

Les survies obtenues sont du même ordre que ce qui est recommandé dans les critères de validité établis pour un sédiment artificiel dans les normes AFNOR (2010) et OCDE (2010), soit un minimum de 70 % de survie recommandé dans les témoins à 7 et 28 jours respectivement. Dans les 2 cas, le sédiment artificiel utilisé est sableux. Si lôon compare aux normes uniquement les sédiments testés classés comme sableux (BB2 et NEY1), les taux de survie et dôémergence obtenus sont au moins équivalents aux critères de validité des normes.

Les conditions dôexposition employées pour lôensemble des tests sur chironomes permettent donc dôavoir des survies correctes et des SR ont donc pu être définis pour chaque critère testé sur cet organisme.

Seul LGB2 à 7 jours présente un taux de survie inférieur à ce qui est recommandé dans les normes (65 %). Sur ce même sédiment, le taux de survie à 28 jours était de 85 %. Pour dôautres sédiments, les taux de survie à 7 jours ont parfois été inférieurs à ceux à 28 jours (mesures effectuées sur des réplicats différents mais avec un même lot dôorganismes de départ), cêst également le cas pour PG3 et CMC2. Ces résultats reflètent la variabilité individuelle de la survie chez cet organisme, présente quelles que soit les caractéristiques géochimiques du sédiment. Les survies moyennes à 7 et 28 jours et les taux dôémergence obtenus pour lôensemble des sédiments montrent tout de même une tendance logique avec des taux respectifs à 82 %, 81 % et 80 %.

La forte variabilité individuelle observée conduit à établir des SR_{min} assez faibles de 61 % pour la survie à 7 jours, et 67 % pour la survie et lôémergence à 28 jours (survie et taux dôémergence sont très liés puisque la quasi-totalité des individus survivants ont émergé). Cette

variabilité pourrait probablement être minimisée en testant un plus grand nombre d'organismes par réplicat (10 seulement ici), mais en tenant compte de l'effet de densité possible sur la croissance (Ristola et al., 1999).

Les taux de survie après 7 et 28 jours et les taux d'émergence sont très variables au sein d'un sédiment donné avec des CV intra sédiments pouvant atteindre 33,7 % et 37,1 % respectivement. En revanche, la variabilité inter sédiments est faible avec des CV inter sédiments pour les survies à 7 et 28 jours, ainsi que pour le taux d'émergence de 15,2 %, 10,3 % et 9,4 % respectivement. Aucune influence des caractéristiques géochimiques des sédiments n'a été montrée. La faible variabilité inter sédiments et l'absence d'impact des caractéristiques géochimiques des sédiments testés suggèrent un bon potentiel de ces 3 critères, pour la détection des effets toxiques des sédiments contaminés.

Croissance

Les taux de croissance observés sont tous supérieurs à 1,02 mm / jour, ce qui est en accord avec le critère de validité de 1 mm / jour de la norme (AFNOR, 2010), basé sur un substrat artificiel de référence (sable). Les taux de croissance SR_{min} et SR_{max} calculés sont de 0,90 et 1,36 mm / jour respectivement. Par rapport à la norme AFNOR (2010), le SR_{min} que nous avons défini est plus faible. Cette différence s'explique par l'utilisation d'un panel de sédiments naturels (très différents), qui prend donc en compte l'impact des différentes caractéristiques géochimiques sur les réponses biologiques, alors que seul un type de substrat artificiel a servi à établir la norme. Cette différence tend à confirmer l'intérêt de l'utilisation de tout un panel de sédiments de référence pour évaluer la gamme des réponses liées aux paramètres géochimiques (Ristola et al., 1999).

L'étude de Péry et al. (2002) montre un taux de croissance des larves de *C. riparius*, d'environ 1,4 mm / jour, obtenu sur sédiment artificiel et dans des conditions expérimentales très similaires (nourriture *ad libitum*, 21°C, 300 à 400 $\mu S/cm^{-1}$). Ce taux de croissance est du même ordre de grandeur que notre SR_{max}, ce qui conforte les seuils que nous avons définis.

Les taux de croissance varient peu d'un réplicat à un autre pour chacun des 8 sédiments testés (CV inter réplicats maximum de 13%) et entre les sédiments (CV inter sédiments de 10,4 %). De nombreuses études ont montré que la quantité et la qualité de la MO disponible, ainsi que la granulométrie ont un impact sur les taux de croissance des chironomes (Stuijfzand et al., 2000; Vos et al., 2000; Vos et al., 2002; Vos et al., 2002). Nos propres résultats corroborent cela (p-value < 0,05) bien que cette influence puisse être diminuée par l'apport de nourriture *ad libitum* nécessaire pour le bon développement de cette espèce (Vos et al., 2002).

Les très faibles CV inter réplicats et inter sédiments de ce trait montrent néanmoins que le taux de croissance des chironomes a un bon potentiel pour la détection des effets des contaminations des sédiments.

Emergence

La vitesse de développement est fortement liée à la croissance de l'organisme, celle-ci représentant en temps la majeure partie de son cycle de vie. Ces 2 critères ont répondu de manière similaire. L'information apportée par l'utilisation de ces 2 traits est potentiellement redondante. Les tests sur sédiments contaminés devraient permettre d'évaluer de manière plus approfondie l'intérêt de l'emploi combiné des 2 traits.

Quel que soit le sédiment testé, les mâles se développent plus vite que les femelles, ce qui est en accord avec le cycle de développement décrit dans la littérature (Pascoe et al., 1989; Péry et al., 2002). L'émergence des mâles est donc logiquement plus précoce que celle des femelles avec respectivement des émergences à 13,8 jours et 14,3 (résultats non montrés). Dans la littérature, la plupart des données sont présentées en jour d'émergence, sans toujours préciser s'il s'agit du nombre de jour écoulés entre l'éclosion et l'émergence ou entre la mise en bécher et l'émergence, ce qui rend les comparaisons difficiles (Péry et al., 2002). Les SR_{min} et SR_{max} définis correspondent respectivement à 0,060 et 0,073 $jour^{-1}$ pour les mâles et 0,056 et 0,067 $jour^{-1}$ pour les femelles.

La vitesse de développement de *C. riparius*, tout comme la croissance, est influencée par les caractéristiques intrinsèques des sédiments (p-value < 0,05), mais très peu variable à la fois au sein d'un même sédiment et entre sédiments, avec des CV intra et inter sédiments maximum 10,1 % et 5,0 % respectivement. Ces critères sont donc aussi de potentiels bon détecteurs de contamination des sédiments.

Bilan des tests sur *C. riparius*

- SR définis pour les mesures de survie, de croissance, dô émergence et de vitesse de développement (Tableau IV-2).

- Critères de survie et de taux dô émergence peu variables entre les sédiments et non impactés par les caractéristiques géochimiques des sédiments testés : très bon potentiel pour la détection dôeffets toxiques des sédiments contaminés.
  Critères taux de croissance et vitesses de développement très liés, potentiellement redondants ; dépendants des propriétés des sédiments mais peu variables, répétables et cohérents avec la littérature disponible (Péry et al., 2002; AFNOR, 2010) : bon potentiel pour la détection dôeffets toxiques des sédiments contaminés.

- Protocoles standardisés pour les tests de croissance et dô émergence, rapides et facile à mettre en î uvre. Largement diffusés et utilisés (Oetken et al., 2005).

- Comme recommandé dans la norme OCDE 233 (2010), suivi de reproduction à envisager en continuité des tests dô émergence (effort expérimental supplémentaire nécessaire peu important pour le suivi dôun trait de vie essentiel pour les communautés de chironomes).

III *Potamopyrgus antipodarum*

Les résultats des tests de reproduction (taux de survie et nombre d'embryon par femelle) et de croissance (taux de survie et taux de croissance) des mollusques sont détaillés dans ce paragraphe.

Les expérimentations ont été conduites dans des systèmes thermo-régulés à 21°C, sous renouvellement d'eau continu et avec une quantité de nourriture *ad libitum*. Les organismes adultes utilisés lors des tests sont prélevés sur le terrain puis stabulés dans des cultures de laboratoire d'où les juvéniles sont natifs.

Le test de reproduction est adapté du protocole décrit par Duft et al. (2003). Des individus adultes reproducteurs d'au moins 3,6 mm (taille moyenne de 4,3 ± 0,2 mm ; 4,6 ± 0,2 mm ; 4,4 ± 0,4 mm et 4,8 ± 0,3 mm pour les séries 1, 2, 3 et 5 respectivement), ont été exposés 6 semaines aux 8 sédiments de référence dans 2 ou 4 réplicats par sédiment. Les mesures ont été effectuées après 6 semaines d'exposition. Une étude récente a montré qu'à 16°C un contaminant tel que la fluoxétine n'induit un effet sur la reproduction qu'à partir de 4 semaines d'exposition (Gust et al., 2011). En l'absence de contaminants, une durée d'expérimentation plus longue peut être nécessaire pour observer les effets potentiels des sédiments. En fin d'exposition, les survivants ont été comptés afin de calculer leur taux de survie. Puis chaque organisme a été disséqué pour compter le nombre d'embryons présents dans la poche embryonnaire.

Des juvéniles, de taille homogène, pour chaque série de tests ont été sélectionnés pour effectuer le test de croissance. Ils ont été mesurés et dénombrés en début et en fin d'une exposition de 6 semaines aux sédiments de référence dans les 3 réplicats par sédiment afin de calculer un taux de croissance moyen et un taux de survie.

1. Résultats sur sédiments de référence avec *P. antipodarum*

a. Reproduction

Après 6 semaines d'exposition, les organismes ont été analysés pour leur taux de fécondité (nombre d'embryons produits par femelle), et leur survie.

Avec des survies minimales de 98 %, les conditions d'exposition mises en place semblent convenir à l'espèce, conduisant à un SR_{min} calculé à 96 %. Les survies sont très peu variables à la fois pour un sédiment donné et entre sédiments, avec des CV intra sédiments atteignant au maximum 3,3 %, et un CV inter sédiments de 0,8 %. La survie du gastéropode n'a pas été affectée par les caractéristiques géochimiques des sédiments de référence testés.

La présence de vers oligochètes (*Chaetogaster limnaei,* Dr Claudia Gérard, communication personnelle) infestant les organismes adultes a induit une diminution du nombre d'embryons présents dans les poches embryonnaires. Un tel impact de vers parasites a déjà été montré dans la littérature (Gerard et al., 2003). De ce fait, les individus parasités, voire des réplicats entiers, n'ont pas été pris en compte dans les résultats des tests de reproduction (Annexe 2), conduisant ainsi à des variations du nombre de réplicats (cf tableau IV-3) et du nombre d'individus par réplicats, mesurés d'un sédiment à l'autre. Etant donné le nombre important d'organismes par réplicats au début des tests (20), le retrait des quelques individus parasités permet tout de même d'avoir un nombre de données conséquent et exploitable.

La fécondité, mesurée par le nombre moyen d'embryons présents dans la poche embryonnaire des femelles, au départ des tests était assez variable suivant les séries (Tableau IV-4). Néanmoins les différences de fécondité au départ des tests n'ont pas impacté les niveaux de fécondité après les 6 semaines d'exposition aux sédiments de référence ($p > 0,05$).

Série expérimentale	Série 1	Série 2	Série 3	Série 5
Fécondité (nombre embryon s/ adulte)	18,37 $\pm$ 9,1 (40)	5,2 $\pm$ 3,8 (40)	15,6 $\pm$ 9,1 (40)	3,75 $\pm$ 2,7 (40)

Tableau IV-4 : Fécondité moyenne au début des tests des lots de *P.antipodarum* utilisés lors des tests sur sédiments de référence.

Le nombre total moyen d'embryons produits par individu (après exclusion des parasités), toutes références confondues, est de 17,4 embryons avec de très fortes variations entre sédiments (CV inter sédiments 31,2 %) et surtout entre réplicats d'un même sédiment (CV intra sédiment allant jusqu'à 81 %). Ceci conduit à définir une large gamme de réponse en conditions de référence de 6,8 à 28,1 embryons par individu en moyenne, qui représente la quasi-totalité des réponses possibles observables dans des conditions de laboratoire. Dans la littérature, le nombre moyen d'embryons dans les contrôles varie autour de 13 (Gust et al.,

2009) ; 13,7 (Oetken et al., 2005) ; 2 à 3 (Pedersen et al., 2009) ; 3,5 à 13 (Jobling et al., 2004) ; 11 à 14 (Duft et al., 2003).

b. Croissance

Concernant la croissance des juvéniles, en fonction des organismes à notre disposition, nous avons observé une taille de départ homogène pour une série donnée, mais variable d'une série de tests à l'autre (1,5 à 2,7 mm). Nous avons vérifié que les différences de taille de départ n'ont pas eu d'incidence sur les taux de croissance des juvéniles *P. antipodarum* mesurés après 6 semaines d'exposition Nous n'avons pas mis en évidence d'impact significatif de la taille de départ sur les taux de croissance entre les différentes séries de tests (Kruskal-Wallis : p= 1,00).

Les taux de croissance journalier moyens et les SR_{min} et SR_{max} ont été calculés pour l'ensemble des sédiments de référence. Nous avons obtenu une croissance moyenne de 0,045 mm / jour et des SR_{min} et SR_{max} de 0,035 à 0,055 mm / jour respectivement.

Les taux de croissance intra sédiment sont assez variables selon le sédiment (CV intra sédiment allant de 3 à 31 %), mais peu variables entre les sédiments avec un CV inter sédiments de 11,6 %. Il n'a pas été mis en évidence d'impact des caractéristiques géochimiques des sédiments testés sur les taux de croissance (p-value > 0,05).

Après les 6 semaines, les taux de survie moyens des juvéniles par sédiment sont élevés, avec un SR_{min} de 92,6 %. Les survies sont également peu variables et présentent des CV intra sédiments allant de 0 à 17,7 % et un CV inter sédiments de 3,1 %.

	Survie, Embryons produits par les adultes 42 jours						Survie et Croissance des juvéniles 42 jours					
	Survie (%)			Nombre total d'embryon par femelle			Survie (%)			Taux de croissance (mm/jour)		
Sédiment	médiane	CV inter réplicats (%)	n	médiane	CV inter réplicats (%)	n	médiane	CV inter réplicats (%)	n	médiane	CV inter réplicats (%)	n
PG3	100,0	0,0	2	18,8	0,7	2	96,0	0,0	3	0,039	9,8	3
PG2	100,0	0,0	2	18,3	25,3	2	100,0	4,7	3	0,043	31,2	3
BB2	100,0	0,0	2	27,3	11,1	2	92,0	17,7	3	0,050	25,7	3
LCB2	100,0	0,0	1	15,1	-	1	96,0	4,2	3	0,043	14,8	3
CMC2	98,3	2,4	2	21,9	4,4	2	96,0	6,5	3	0,038	23,3	3
NEY1	100,0	0,0	4	9,9	81,0	4	100,0	2,9	3	0,047	24,3	3
PG5	100,0	1,7	4	15,0	46,2	4	100,0	0,0	3	0,053	3,0	3
LGB2	98,3	3,3	4	13,1	41,1	4	100,0	0,0	3	0,045	15,5	3
p-value (test effectué)	0,463 (KW)			0,175 (KW)			0,149 (KW)			0,200 (KW)		
moyenne	99,6		8	17,4		8	97,5		8	0,045		8
écart type	0,8		8	5,4		8	3,0		8	0,005		8
CV inter sédiments (%)	0,8		8	31,2		8	3,1		8	11,6		8
Seuil de réponse inférieur (P95%)	98,3			6,8			92,6			0,035		
Seuil de réponse supérieur (P95%)	-			28,1			-			0,055		

Tableau IV-3 : Résultats obtenus pour chaque trait suivi chez le mollusque *P. antipodarum* et SR obtenus. L'existence (ou absence) de différences de réponse de chaque trait de vie entre les sédiments testés a été vérifiée par des tests statistiques appropriés (ANOVA ou Kruskal-Wallis noté KW, cf chapitre 2), les résultats (p-value) sont également présentés dans ce tableau.

2. Discussion

Survie

La survie des adultes et des juvéniles de *P. antipodarum* s'est avérée très satisfaisante dans nos conditions expérimentales (SR_{min} de 98 et 93 % respectivement), et présente une très faible variabilité intra et inter sédiment. Les conditions d'exposition semblent donc adaptées pour cette espèce. La survie, à la fois peu variable et non impacté par les caractéristiques géochimiques des sédiments testés est donc potentiellement un bon détecteur des contaminations des sédiments.

Reproduction

Même si le cycle de reproduction de l'espèce présente un pic de juillet à novembre, des embryons peuvent être produits par les individus matures en continu au cours de l'année (Gust et al., 2011). En effet, le cycle de production embryonnaire, qui dure entre 4 et 5 semaines à la température d'exposition n'est pas synchronisé chez l'ensemble des individus exposés (Gust et al., 2011). Cette désynchronisation de la reproduction conduit à une grande variabilité du nombre d'embryons présents dans la poche embryonnaire d'un individu à l'autre, même chez les organismes en condition témoin.

Des paramètres environnementaux tels que la température (Gust et al., 2011), la nutrition ou l'âge des adultes (Lassen, 1979) peuvent influencer le nombre d'embryons porté par les femelles. Lors des expérimentations en laboratoire, le nombre d'embryons produits dans les contrôles (eau ou sédiment) est souvent faible variant de 8 à 14 embryons (Mazurova et al., 2008), de 12 à 18 embryons (Schmitt et al., 2011), ou encore une moyenne de 14 embryons (Gust et al., 2009). La moyenne de 17 embryons obtenue dans cette étude sur les sédiments de référence est donc cohérente avec la littérature disponible, tout comme la grande variabilité de réponse observée.

La taille des individus est également susceptible d'influer fortement leur production embryonnaire.

Le taux de reproduction lors des expositions aux sédiments de référence a montré une importante variabilité. En effet, les CV entre les réplicats d'un même sédiment varient pour les références de 1 à 81 % et le CV inter sédiment de 31 % est également très élevé. Dans le cadre du protocole mis en œuvre (petit nombre de réplicats, taille des adultes de départ variant entre les séries de test de 4,33 à 4,75 mm), la forte variabilité individuelle de la reproduction

chez cet organisme, conduit à établir une gamme de reproduction acceptable en conditions de référence très étendue. Cette gamme couvre la quasi-totalité des réponses possibles quant au nombre d'embryons produits par individu en conditions de laboratoire. L'amplitude des réponses observables en conditions de référence tend à diminuer la probabilité de mettre en évidence un impact d'une contamination et limitera donc la sensibilité du test à la contamination. En l'état, ce critère semble donc inapproprié à la détection d'effets des contaminations des sédiments.

La présence de parasites, qui impacte le nombre d'embryons observé par adulte, peut être un facteur de variabilité supplémentaire des taux de reproduction, les individus parasités ayant tendance à avoir moins d'embryons. Ces observations sont en accord avec la diminution du nombre d'embryons rapportée dans l'étude de Gerard et al. (2003). L'apparition des parasites n'est pas liée à la population de test puisque l'origine des mollusques était la même lors de toutes les séries de tests. Ainsi la présence de parasites constitue un aléa ponctuel et imprévisible mais qui peut rendre un test inexploitable. Elle doit si possible être contrôlée avant la réalisation des tests.

Des améliorations de protocole seraient nécessaires pour pouvoir utiliser le critère de reproduction pour une application à l'évaluation de la toxicité des sédiments telle que nous l'avons mise en place. Il serait en particulier important d'augmenter le nombre de réplicats (seulement 2 pour certains sédiments), afin de s'affranchir de la variabilité individuelle du taux de reproduction en réduisant les CV intra sédiments.

Une autre amélioration possible des protocoles pourrait consister à rendre plus stricte la sélection des organismes reproducteurs utilisés en début de test, afin de limiter la variabilité individuelle des niveaux de reproduction en fin de test. Cela pourrait se faire par exemple en n'utilisant que des lots d'organismes présentant un nombre d'embryons minimum au départ des tests, ou en préparant les organismes en amont du test, en tentant de les synchroniser artificiellement, par exemple en simulant les températures correspondant à l'arrivée de la période du pic de reproduction. Toutefois, le cycle biologique de cette espèce est actuellement trop peu connu pour être maitrisé et moins adapté que chez d'autres espèces (absence de cycle de mue). Une sélection des individus testés sur un critère de taille uniquement n'est pourtant pas suffisante comme l'a souligné Gust et al. (2011) et doit être améliorée afin de rendre réellement envisageable ce biotest de manière standardisée. De nombreux facteurs peuvent influencer la fécondité de cette espèce, tels que l'alimentation (Dorgelo et al., 1995) et la température (Gust et al., 2011). Cette espèce parthénogénétique possède de plus plusieurs clones pour lesquels les niveaux de reproduction sont variables (Jensen et al., 2001), ce qui

explique partiellement les larges variations de reproduction observées dans le littérature (bien que tous les résultats soient obtenus pour un même clone).

Croissance

Nous avons obtenu une gamme de taux de croissance acceptable en conditions de référence allant de 0,035 à 0,055 mm / jour. Dans la littérature les taux de croissance sont généralement compris entre 0,01 et 0,02 mm / jour (Gerard et Poullain, 2005; Gust et al., 2011) mais atteignent parfois 0,06 mm / jour (Roger, 2006). Cependant, la plupart des observations de croissance des juvéniles de *P. antipodarum* ont été faites en phase aqueuse. Les expositions conduites en présence de sédiments montrent des taux de croissance plus variables. A 18 °C, Dorgelo (1988) et Dorgelo et Leonards (2001), observent une croissance inférieure à celle que nous observons (entre 0,01 et 0,02 mm / jour après 6 semaines d'exposition). Le cycle de développement des mollusques dépend de facteurs environnementaux comme la température (OECD, 2010; Gust et al., 2011). Ainsi à 21 °C il est logique que nous observions des taux de croissance supérieurs à ceux observés dans ces études.

La présence de particules sédimentaires peut également fortement stimuler la croissance des jeunes, allant jusqu'à 0,05 mm / jour (Broekhuizen et al., 2001), en fonction du ratio particules / nourriture. La quantité et la qualité de la nourriture disponible impactent directement les taux de croissance qui varient entre 0,010 et 0,047 mm / jour à 15°C (Dorgelo et al., 1995; Dorgelo et Leonards, 2001). Les sédiments testés contiennent des proportions variables de MO de compositions différentes (C/N), mais la réponse des juvéniles que nous avons observée s'est tout de même avérée reproductible dans le temps et peu variable entre les sédiments testés (CV inter sédiments de 11,6 %) et simple à étudier. La variabilité au sein d'un même sédiment peut être élevée (CV intra sédiments jusqu'à 31 %).

La faible variabilité inter sédiments, et l'absence d'effet des caractéristiques géochimiques des sédiments testés, sur la mesure du taux de croissance, suggèrent que ce critère a un bon potentiel de détection des contaminations des sédiments.

Bilan des tests sur *P. antipodarum*

- Les SR ont été définis pour les mesures de survie, de croissance, de reproduction et sont présentés dans le Tableau IV-3.

- Critères de survie des adultes et des juvéniles et taux de croissance des juvéniles peu variables entre sédiments et non impactés par les caractéristiques géochimiques des sédiments testés : très bon potentiel pour la détection dœffets toxiques des sédiments. Critère taux de reproduction des adultes très variable au sein dûn même sédiment et entre sédiments : mauvais potentiel pour la détection dœffets toxiques des sédiments. Approche mise en î uvre pour ce critère non satisfaisante.

- Tests de croissance et de reproduction simples à mettre en î uvre mais longue durée dœxposition (6 semaines).

- Amélioration des protocoles du test de reproduction à envisager (nombre de réplicats ; sélection de organismes de test)

Conclusions quant à la définition des seuils de réponse des traits de vie des trois espèces en conditions de référence

Pour toutes les espèces, les taux de survie lors des expositions aux sédiments de référence se sont avérés bons voir très bons. Les protocoles d'exposition semblent donc convenir aux organismes.

La première étape pour pouvoir interpréter les données récoltées a été la définition des SR en conditions de référence. La gamme de réponse en conditions de référence est définie comme étant l'intervalle de réponses dans lequel se situent 95 % des réponses obtenues sur sédiments de référence. Pour la calculer, 2 méthodes statistiques étaient possibles. La première méthode consiste à définir la gamme à partir d'une valeur médiane par sédiment (n sédiments), alors que la seconde est définie à partir des valeurs obtenues pour chaque réplicat de chaque sédiment (n sédiments * k réplicats). Si la seconde méthode est plus robuste d'un point de vue statistique, elle nécessite entre autre que les données récoltées aient une distribution normale, et que le nombre de réplicats final soit constant, ce qui n'était le cas que pour une partie de traits testés (et donc seulement utilisable au cas par cas). La première méthode est quant à elle généralisable à l'ensemble de nos données et est donc c'est celle pour laquelle nous avons opté afin de définir uniformément la définition de SR en conditions de pas ou peu contaminées.

Ainsi, pour chacune des 3 espèces (*G. fossarum*, *C. riparius*, *P. antipodarum*) et pour chaque trait de vie, nous avons défini avec succès des seuils de réponse sur des sédiments peu contaminés. A titre comparatif, nous avons appliqué la seconde méthode à nos jeux de données lorsque cela était possible (Annexe 3). Il en résulte des SR proches (par exemple limite acceptable pour la survie de *G. fossarum* lors du test de reproduction située à 83 % contre 81 dans la méthode retenue). D'une manière assez générale, les SR obtenus par la première méthode (celle choisie) sont plus conservateurs, avec par exemple, un taux d'émergence de *C. riparius* minimum acceptable à 68 % contre 49 % ; ou encore un nombre d'ovocytes par femelle *G. fossarum* situé entre 3,3 et 4,9 contre 2,5 et 6,0.

Parmi les résultats obtenus nous avons constaté que si certains traits sont robustes, répétables et peu variables (mesures de surfaces ovocytaires chez le gammare), d'autres sont peu robustes du fait de leur grande variabilité naturelle (reproduction chez le mollusque).

Des améliorations de protocoles peuvent être envisagées pour certains tests. En effet, une augmentation du nombre de réplicats ou la standardisation plus poussée des individus utilisés

(en particulier pour les tests avec le mollusque) pourrait permettre de diminuer la variabilité biologique observée et donc dôaugmenter le potentiel des tests à discriminer une contamination.

Il est nécessaire dôeffectuer ces tests sur dôautres populations, voire dôeffectuer des essais inter-laboratoires afin de vérifier si la variabilité naturelle définie sur sédiments de références lors de cette étude est généralisable ou spécifique à la population utilisée et au laboratoire effectuant le test.

Les sédiments ayant servi à définir les SR, même sôils représentent un panel conséquent de caractéristiques géochimiques, ne sont pas exhaustifs de toutes les caractéristiques existantes. Ainsi il est possible quôavec dôautres sédiments de référence, les limites des référentiels varient.

Chapitre 5

Evaluation de la batterie de tests en conditions contaminées

Ce chapitre a pour objectif de présenter et discuter les résultats obtenus lors des expérimentations effectuées sur sédiments contaminés, suivant les mêmes protocoles que ceux utilisés pour la définition des seuils référentiels (SR, chapitre 4). Pour chaque critère un panel de 9 sédiments présentant des typologies de contamination variées a été testé afin d'évaluer le pouvoir discriminant des tests mis en place. Enfin, un sédiment naturel a été dopé avec un contaminant modèle, le cadmium, afin de tester la sensibilité de chaque trait à l'aide d'une approche dose-réponse.

Ce chapitre se structure en 2 parties. La première présente et discute les résultats obtenus sur les sédiments naturels contaminés. La seconde partie présente et discute les résultats obtenus sur le sédiment dopé en cadmium.

I Sédiments naturels contaminés

Pour chacun des traits de vie des 3 espèces, dont les résultats des expositions aux sédiments contaminés sont présentés ci-après, la sensibilité a été jugée en 3 classes suivant la proportion de sédiments contaminés classés comme toxiques par le critère en question : < 1/3 (peu sensible) ; 1/3 << 2/3 (moyennement sensible) et > 2/3 (très sensible).

1. *Gammarus fossarum*

Ce paragraphe présente un bilan des résultats des biotests sur gammares exposés aux sédiments naturels contaminés. Ces résultats sont présentés trait de vie par trait de vie. Les 3 traits qui ont été testés sont la reproduction, l'alimentation et la croissance après exposition aux sédiments contaminés. Par manque d'organisme, les tests de reproduction ont été conduits 6 sédiments contaminés contre 9 pour les autres traits.

Les protocoles de tests employés sont les mêmes que ceux utilisés pour la définition des SR en conditions de référence (chapitre 2 § III). Brièvement, pour le test de reproduction, des couples de gammares, dont les femelles sont synchrones dans leur cycle de reproduction, ont été exposés 3 semaines aux sédiments. En fin d'exposition, le nombre de survivants a été compté. Pour chaque sédiment, une dizaine de femelles se trouvant au stade C2 de leur cycle de reproduction, d'après Geffard et al. (2010) ont été analysées. Le nombre d'embryons, le nombre d'ovocytes et la surfaces ovocytaires (Geffard et al., 2010) ont été mesurés. Le taux moyen d'alimentation (mesures de surfaces foliaires consommées) des mâles de taille homogène a été évalué après 1 semaine d'exposition aux sédiments. Les taux de survie de ces individus ont été également calculés en fin de test. Les taux de survie et les mesures de croissance (mesure en début et fin de test) des juvéniles ont été mesurés après des expositions de 4 semaines aux sédiments.

a. Résultats des biotests sur sédiments contaminés avec *G. fossarum*

Les résultats obtenus sur les sédiments naturels contaminés pour les gammares sont présentés dans le tableau V-1.

	Survie, Embryons produits, Nombre et surface des ovocytes 21 jours												Survie et Alimentation des mâles 7 jours						Survie et Croissance des juvéniles 28 jours					
	Survie (%)			Nombre d'embryon pondéré par femelle			Nombre d'ovocyte pondéré par femelle			Surface ovocytaire (µm²)			Survie (%)			Taux d'alimentation (mm²/jour/individu)			Survie (%)			Taux de croissance (mm/jour)		
Sédiment	médiane	CV inter réplicats (%)	n	médiane	CV inter réplicats (%)	n	médiane	CV inter réplicats (%)	n	médiane	CV inter réplicats (%)	n	médiane	CV inter réplicats (%)	n	médiane	CV inter réplicats (%)	n	médiane	CV inter réplicats (%)	n	médiane	CV inter réplicats (%)	n
CMA2	100,0	4,2	3	3,7	25,0	10	4,3	17,7	10	99837	14,4	7	100,0	5,6	6	13,2	39,8	6	26,7	46,8	5	0,040	21,0	5
CAJ1	78,6	5,1	3	2,1	112,1	11	1,9	101,8	11	36140	29,3	6	100,0	8,8	6	18,5	38,4	6	8,0	61,2	4	0,070	7,3	4
IBA1	85,7	13,1	3	0,0	137,7	13	0,2	103,6	13	41129	62,0	3	95,0	5,8	6	21,5	27,2	6	12,0	46,6	5	0,060	17,8	5
MAR1	78,6	11,2	3	1,8	78,7	13	2,1	69,4	13	44983	20,4	6	100,0	4,2	6	23,6	10,7	6	20,0	36,4	5	0,056	10,5	5
MOR1	78,6	22,2	3	2,4	66,0	10	2,4	30,5	10	60136	40,0	6	100,0	0,0	6	21,6	33,9	6	28,0	23,7	5	0,064	13,7	5
VID1	35,7	10,8	3	0,0	185,2	6	1,2	158,1	6	45477	17,2	2	70,0	28,6	6	4,1	30,7	6	0,8	-	1	0,069	-	1
AMO1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	95,0	5,8	6	31,1	14,6	6	53,8	25,4	5	0,044	13,4	5
BION1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	90,0	22,3	6	0,8	136,9	6	61,5	29,9	5	0,046	10,9	5
BIE1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	100,0	4,2	6	15,5	36,7	6	38,5	51,0	5	0,048	15,4	5

Tableau V-1 : Résultats des tests de reproduction, alimentation et croissance de *G. fossarum* lors des expositions aux sédiments naturels contaminés.

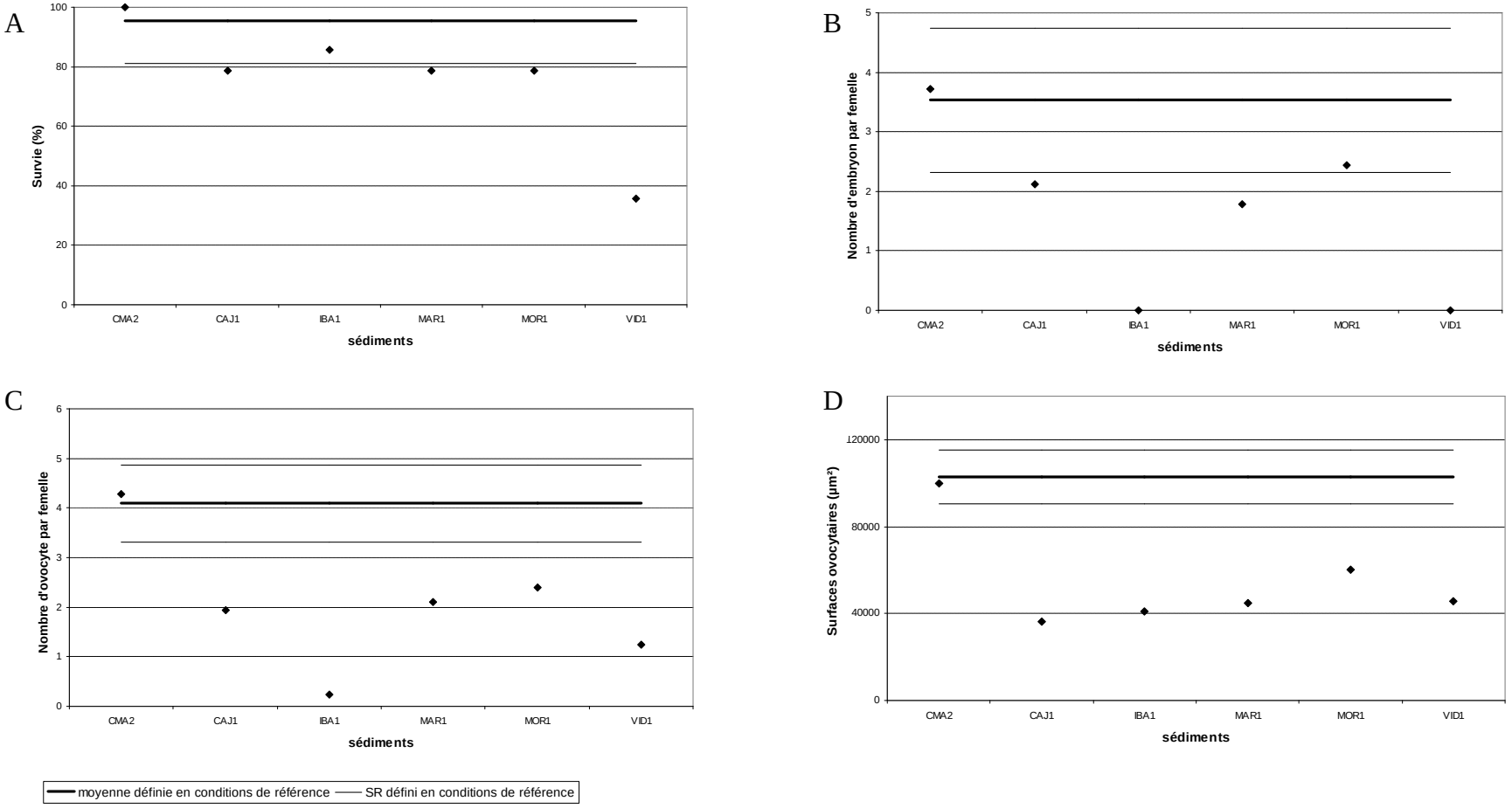
Reproduction des adultes

Dans lôensemble, les critères de reproduction (nombre dôembryons, nombre dôovocytes et surfaces ovocytaires) ainsi que les taux de survie des adultes reproducteurs exposés répondent de manière similaire. La survie des adultes reproducteurs est un critère moyennement sensible à la contamination des sédiments, avec des taux moyens de survie inférieurs au SR_{min} de 81 %, défini en conditions de référence, pour 4 des 6 sédiments contaminés testés (Tableau V-1 ; Figure V-1 A). Il sôagit des sédiments de Cajarc (CAJ1, contamination métallique), Marckolsheim (MAR1, contamination en HCB), Morancé (MOR1, contamination métallique) et Vidy (VID1, rejet de STEP). Ces taux de survie globalement élevés, ont permis dôéchantillonner suffisamment dôorganismes pour la mesure du nombre dôembryons et du nombre dôovocytes par femelle pour lôensemble des sédiments à lôexception du sédiment de Vidy. Pour ce dernier, les faibles survies nôont permis de mesurer les surfaces ovocytaires moyennes que sur 2 femelles, ce qui rend les données peu fiables pour ce sédiment.
Rappelons aussi que le manque dôorganismes répondant aux critères de sélections pour le lancement des expérimentations, est un facteur limitant qui a conduit à ne pas tester les sédiments de lôAmous, de la Bienne et du Bion.

Les mesures de nombre dôovocytes et de surface ovocytaire sont des critères très sensibles à la contamination des sédiments tandis que la mesure du nombre dôembryons est moyennement sensible. En effet, pour le nombre moyen dôembryons, les réponses obtenues sont hors des SR définis en conditions de référence pour 4 / 6 sédiments testés, contre 5 / 6 pour les 2 autres critères (Figure V-1 B, C et D). Les sédiments identifiés comme toxiques à lôaide des critères de nombre et surface des ovocytes sont les mêmes. Les 2 critères étant mesurés sur les mêmes tissus (ovocytes), lôinformation obtenue est redondante. Il semble donc possible de simplifier le test de reproduction en ne gardant quôun seul des critères, nombre dôovocytes ou surface ovocytaire. Dans ce cas nous préconisons de conserver le plus simple à mettre en place, côest à dire la mesure du nombre dôovocytes, qui nécessite moins de temps et moins de matériel que les mesures de surfaces ovocytaires.

La reproduction de *G. fossarum* en tant que critère dôeffet dans un test biologique a été peu étudiée, et principalement en phase aqueuse. Cependant les quelques études disponibles montrent que différents critères associés à la reproduction des gammares sont sensibles aux pollutions de lôeau. La formation et le maintien de précopulats de *G. pulex* se sont avérés

sensibles au BPA et à un pesticide (esfenvalerate) (Watts et al., 2001; Cold et Forbes, 2004). La structure des gonades de femelles exposées à un effluent de STEP a été affectée chez *G. pulex* et *G. fossarum* (Gross et al., 2001; Schirling et al., 2005). Geffard et al. (2010) a aussi observé une diminution significative des valeurs associées aux 3 critères (nombre dœembryons, nombre dœovocytes et surfaces ovocytaires) dans des eaux contaminées avec des contaminants modèles (cadmium, nonylphenol et méthomyle). Nos résultats sont donc en accord avec la littérature indiquant la reproduction des gammares comme un trait de vie sensible.



Figures V-1: Résultats des tests de reproduction des adultes *G. fossarum* exposés aux sédiments contaminés positionnés par rapport à la moyenne et aux SR minimum et maximum définis en conditions de référence. A : Taux de survie ; B : Nombre d'embryons par femelle ; C : Nombre d'ovocytes par femelle ; D : Surfaces ovocytaires.

Alimentation des mâles adultes

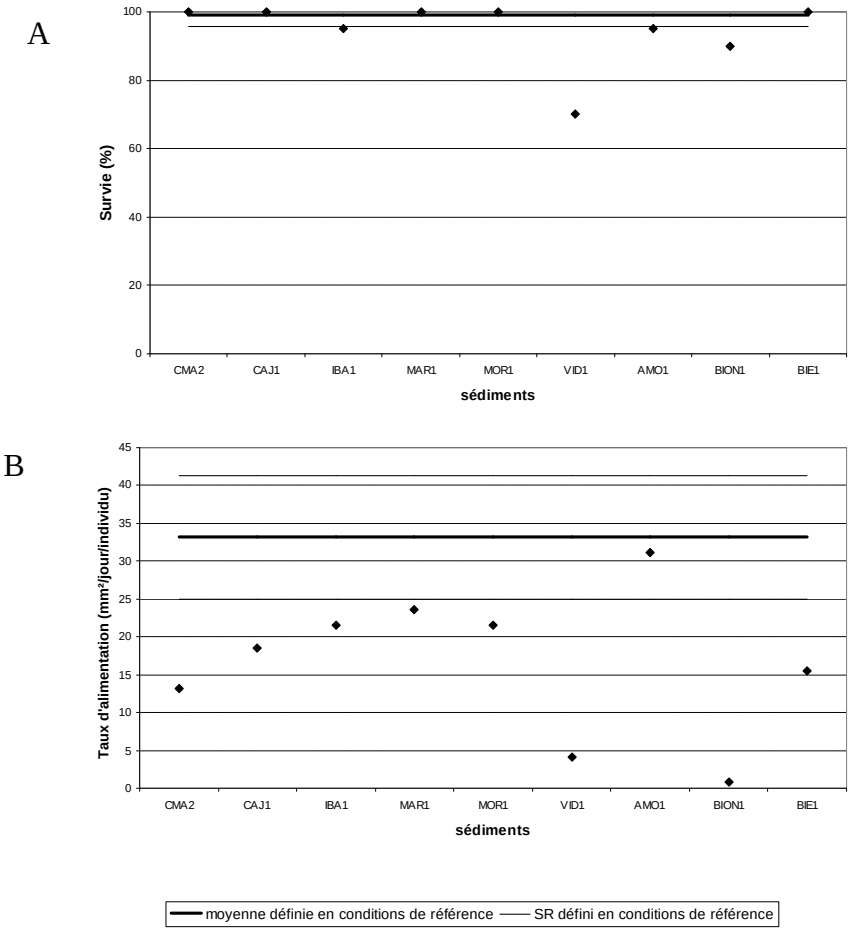
Les taux de survie associés au test d'alimentation, sont inférieurs au SR_{min} de 96 % obtenu en conditions contrôle pour 4 des 9 sédiments (IBA1 95 %, VID1 70 %, AMO1 95 % et BIE1 90 %) (Tableau V-1 ; Figure V-2 A). Le critère de survie des mâles adultes est donc moyennement sensible à la contamination des sédiments.

Les taux de survie des mâles, d'au minimum 70 %, restent suffisamment élevés pour obtenir des taux de consommation de feuilles d'aulne fiables. La mesure du taux d'alimentation s'est avérée très sensible à la contamination des sédiments, avec des taux de consommation de feuilles inférieurs au SR_{min} pour 8 / 9 sédiments contaminés testés (Figure V-2 B).

Le seul sédiment n'induisant pas d'effet sur le taux de consommation de feuilles par les gammares mâles est le sédiment de l'Amous (AMO1), alors qu'il a provoqué un effet sur la survie (taux de survie inférieur au SR). Il est intéressant de noter que les 2 sédiments (VID1 et BION1) pour lesquels les taux de consommation de feuilles sont les plus faibles, correspondent aux 2 sédiments présentant une contamination par des rejets de STEP.

La sensibilité des tests d'alimentation de *Gammarus sp.*, à une contamination ou à un changement de qualité du milieu, a d'ailleurs été mise en avant dans de nombreuses autres études (Veerasingham et Crane, 1992; Blockwell et al., 1998; Alonso et al., 2009).

La sensibilité du test d'alimentation sur *G. fossarum* exposé à une contamination métallique a été démontrée lors d'une expérimentation *in situ* (Dedourge-Geffard et al., 2009).

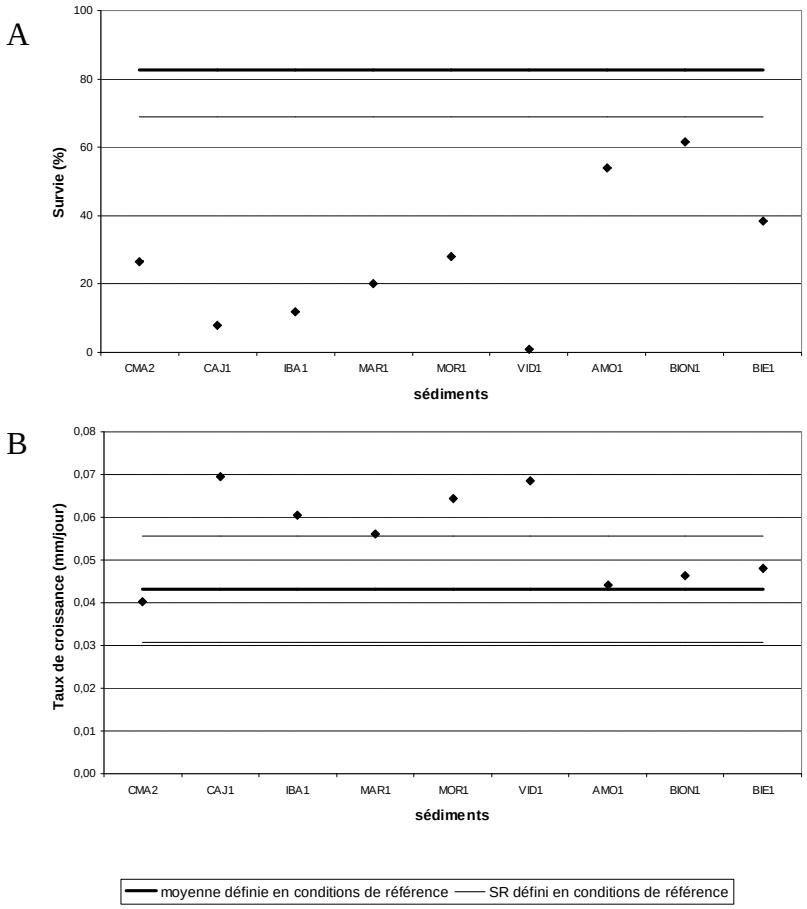


Figures V-2 : Résultats des tests d'alimentation des mâles adultes *G. fossarum* exposés aux sédiments contaminés positionnés par rapport à la moyenne et aux SR minimum et maximum définis en conditions de référence. A : Taux de survie ; B : Taux de consommation de feuilles d'aulne.

Croissance des juvéniles

Les taux de survie observés en conditions contaminés sont tous faibles (entre 1 et 65 %) et inférieurs au SR_{min} de 67 % défini sur les sédiments de référence (Tableau V-1 ; Figure V-3 A). Le taux de survie des juvéniles est donc un trait très sensible à la contamination du sédiment, quel que soit son type. Cependant, étant donné le peu d'individus ayant survécu, les mesures de taux de croissance n'ont pu être effectuées que sur un petit nombre de gammares (maximum de 5 organismes), ce qui rend les mesures de croissance très peu fiables.

Nous avons observé des inductions de croissance dans 5 cas sur 9 (CAJ1, IBA1, MAR1, MOR1 et VID1) (Figure V-3 B). Ce résultat ne s'explique pas par les quantités de MO disponibles qui sont comparables à celles de certains sédiments de référence. En revanche, les fortes mortalités obtenues ont pu favoriser les organismes les plus robustes, qui seraient également ceux ayant le plus grandi.



Figures V-3 : Résultats des tests de croissance des juvéniles *G. fossarum* exposés aux sédiments contaminés positionnés par rapport à la moyenne et aux SR minimum et maximum définis en conditions de référence. A : Taux de survie ; B : Taux de croissance.

b. Bilan des tests avec *G. fossarum* sur sédiments contaminés

- Critères très sensibles (plus de 2 /3 des sédiments contaminés classés comme toxiques) : nombre d'ovocyte par femelle ; surfaces ovocytaires ; taux d'alimentation des mâles adultes ; taux de survie des juvéniles.
  Critères moyennement sensibles (entre 1 / 3 et 2 / 3 des sédiments contaminés classés comme toxiques) : survie des adultes (lors des tests de reproduction et d'alimentation après 4 et 1 semaines d'exposition aux sédiments respectivement) ; nombre d'embryons par femelle.

- Critères de nombre d'ovocytes par femelle et de surface ovocytaire redondants (même tissu analysé, même sédiments discriminés) : on n'en garde qu'un, le critère nombre d'ovocytes, plus simple à mettre en œuvre

- Critère de croissance des juvéniles non fiable dans notre étude suite aux fortes mortalités

2. *Chironomus riparius*

Ce paragraphe présente les résultats des biotests effectués sur les chironomes lors des expositions aux sédiments contaminés. Dans un premier temps, 9 sédiments contaminés ont été testés. Devant la très faible sensibilité des tests sur chironomes face à ces sédiments, 2 sédiments supplémentaires présentant une probable contamination de type pesticides (non dosés) pour lesquels la sensibilité des chironomes est très probable, ont été ajoutés aux 9 précédemment testés. Cet ajout a pour objectif de vérifier la sensibilité des tests sur cette espèce.

Les protocoles de test sont les mêmes que ceux utilisés pour les expérimentations en conditions de référence (chapitre 2 § III) et suivent la méthode standard NF T90-339-1 (AFNOR, 2010). Pour rappel, des mesures de survie à 7 et 28 jours, de croissance à 7 jours, de taux dœémergence à 28 jours et de vitesse de développement des organismes ont été effectuées.

a. Résultats des biotests sur sédiments contaminés avec *C. riparius*

Lœensemble des résultats obtenus sur les sédiments naturels contaminés pour les chironomes sont présentés dans le tableau V-2.

	Survie et Croissance 7 jours						Survie, Taux d'émergence et Vitesses de développement 28 jours											
	Survie (%)			Taux de croissance (mm/jour)			Survie (%)			Taux d'émergence (%)			Vitesse de développement des mâles (1/jour)			Vitesse de développement des femelles (1/jour)		
Sédiment	médiane	CV inter réplicats (%)	n	médiane	CV inter réplicats (%)	n	médiane	CV inter réplicats (%)	n	médiane	CV inter réplicats (%)	n	médiane	CV inter réplicats (%)	n	médiane	CV inter réplicats (%)	n
CMA2	86,7	7,7	3	1,35	3,0	3	100,0	10,5	4	100,0	10,5	4	0,068	14,0	4	0,060	12,2	4
CAJ1	80,0	14,4	4	1,03	2,6	4	95,0	15,7	4	92,5	14,8	4	0,062	11,1	4	0,060	11,9	4
IBA1	90,0	5,4	4	1,18	6,1	4	100,0	0,0	4	100,0	0,0	4	0,071	3,5	4	0,063	6,9	4
MAR1	80,0	6,1	4	1,07	4,5	4	100,0	5,1	4	100,0	5,1	4	0,064	2,3	4	0,054	14,5	4
MOR1	90,0	5,4	4	1,14	4,7	4	100,0	10,5	4	95,0	10,4	4	0,066	8,1	4	0,061	9,7	4
VID1	95,0	6,1	4	1,31	4,9	4	92,5	19,8	4	92,5	19,8	4	0,070	4,1	4	0,065	8,0	4
AMO1	90,0	9,1	4	1,15	2,3	4	80,0	11,8	4	80,0	11,8	4	0,063	1,4	4	0,061	0,6	4
BION1	90,0	0,0	4	1,34	3,6	4	90,0	41,3	4	90,0	41,3	4	0,068	4,3	4	0,064	4,8	4
BIE1	75,0	27,8	4	0,71	23,9	4	40,0	54,2	4	40,0	54,2	4	0,054	2,6	4	0,047	6,3	4
PIZ1	65,0	62,4	4	0,84	26,4	4	50,0	42,6	4	50,0	42,6	4	0,052	6,5	4	0,047	9,9	4
JEAN1	55,0	60,9	4	0,80	25,3	4	95,0	10,4	4	95,0	10,4	4	0,061	3,3	4	0,056	1,8	4

Tableau V-2 : Résultats des tests de croissance et émergence de *C. riparius* lors des expositions aux sédiments naturels contaminés.

Tous les critères mesurés (survie, taux de croissance, taux d'émergence et vitesses de développement) se sont montrés peu sensibles à la contamination des sédiments (Tableau V-2 ; Figures V-4 et V-5).
La vitesse de développement des femelles a été inhibée lors de l'exposition au sédiment MAR1. Le taux de croissance, la survie à 28 jours, le taux d'émergence ainsi que la vitesse de développement des organismes des 2 sexes, ont été affectés par le sédiment BIE1. Cependant, ce sédiment contenait une quantité non négligeable d'oligochètes autochtones qui n'ont pu être éliminés lors du tamisage du prélèvement sur le site de la Bienne. Etant donné la faible contamination en métaux, HAP et PCB de ce sédiment, il ne peut être exclu que les effets observés résultent d'une compétition inter espèces entre ces oligochètes et les chironomes pour la nourriture ajoutée au cours du test plutôt que de la contamination elle-même.

Devant cette faible sensibilité des traits aux sédiments testés, et afin de vérifier qu'elle ne soit pas due à une résistance inhabituelle des organismes de test, 2 sédiments supplémentaires ont été ajoutés et testés uniquement sur *C. riparius*. Les sédiments de Pizay (PIZ1) et St-Jean (JEAN1) ont été sélectionnés pour leurs contaminations probables en pesticides car il a été montré que ces organismes sont sensibles à des contaminations en pesticides (Wogram et Liess, 2001). En effet, les sites de prélèvement de ces sédiments se situent en zone de culture et ont été prélevés aux pieds de vergers en cours de traitement chimique. Les résultats obtenus indiquent que l'ensemble des traits (survie à 28 jours, croissance et émergence) ont été affectés lors de l'exposition au sédiment PIZ1 (Tableau V-2 ; Figures V-4 et V-5). Le taux de croissance pour le sédiment JEAN1 a également présenté une inhibition par rapport aux valeurs de référence. Pour ce sédiment, le taux de survie observé après une semaine d'exposition, est de 55 % et est donc inférieur au SR_{min}, sur sédiments pas ou peu contaminés (57 %). Cependant pour ce même sédiment et pour une durée de test plus longue (lors du test d'émergence), la survie observée à 4 semaines était de 95 %. Aussi nous ne considérerons pas la faible survie observée sur le sédiment JEAN1 lors du test de croissance (Tableau V-2).

Ces résultats tendent à montrer que *C. riparius* répond à une typologie de contamination particulière. Cependant, ces sédiments n'étant pas prévus au départ, ils n'ont donc pas été analysés pour leur contenu en contaminants. Cette sensibilité particulière aux pesticides reste à valider. La sensibilité de *C. riparius* aux pesticides est contrastée (Hirthe et al., 2001; Crane et al., 2002; Faria et al., 2007). Cette grande résistance au panel de contaminants présents dans nos sédiments est illustrée dans d'autres études (Faria et al., 2007; Gillis et Wood, 2008).

Cette caractéristique est associée à une bonne capacité à accumuler certains contaminants (Mäenpää et al., 2003), illustrée également dans ce travail avec lôaccumulation de Cd lors de lôexpérimentation de dopage (Dabrin et al., 2012). Ces caractéristiques permettent dôenvisager dôexposer cette espèce en vue de mesures de biodisponibilité des contaminants.

Les sédiments classés comme toxiques par la mesure du taux de survie (7 et 28 jours), des taux de croissance et dôémergence, présentent pour chacun de ces traits les plus forts CV inter réplicats. Si lôaugmentation de la variabilité des réponses est associée à une réponse à la contamination, ce pourrait être une indication supplémentaire dans lôévaluation de toxicité. Il serait donc été intéressant de poursuivre ces observations sur de plus nombreux sédiments, pour sôen assurer.

Les sédiments contaminés conduisant à des effets sur lôémergence sont les mêmes que ceux induisant un effet sur la croissance. De ce fait, et compte tenu de la durée du test sur lôémergence (28 jours) plus importante que pour un test croissance (7 jours) son utilisation peut donc être mise en question.
Cependant la mesure de lôémergence, incluant le processus de métamorphose de la larve en adulte, apporte une information biologique complémentaire, en donnant une indication sur le nombre dôindividus susceptibles de participer à la reproduction. Plusieurs études montrent même que les tests dôémergence ne sont pas suffisants dans le cadre dôune évaluation de risque, et quôil faudrait effectuer des tests du cycle de vie complets (Taenzler et al., 2007), multi-générationnels (Tassou et Schulz, 2009) ou en modélisant lôimpact des sédiments contaminés à lôéchelle populationnelle (Charles et al., 2004). Cette nécessité dôaller chercher dôautres traits écologiquement pertinents, à lôaide de test sur le cycle de vie complet de lôespèce, sôest dôailleurs récemment traduit par une mise à jour de la norme OCDE 233 (2010). Cette norme préconise dorénavant des tests sur lôensemble du cycle de vie des chironomes, incluant la reproduction dans le cadre dôune évaluation du risque des substances chimiques.

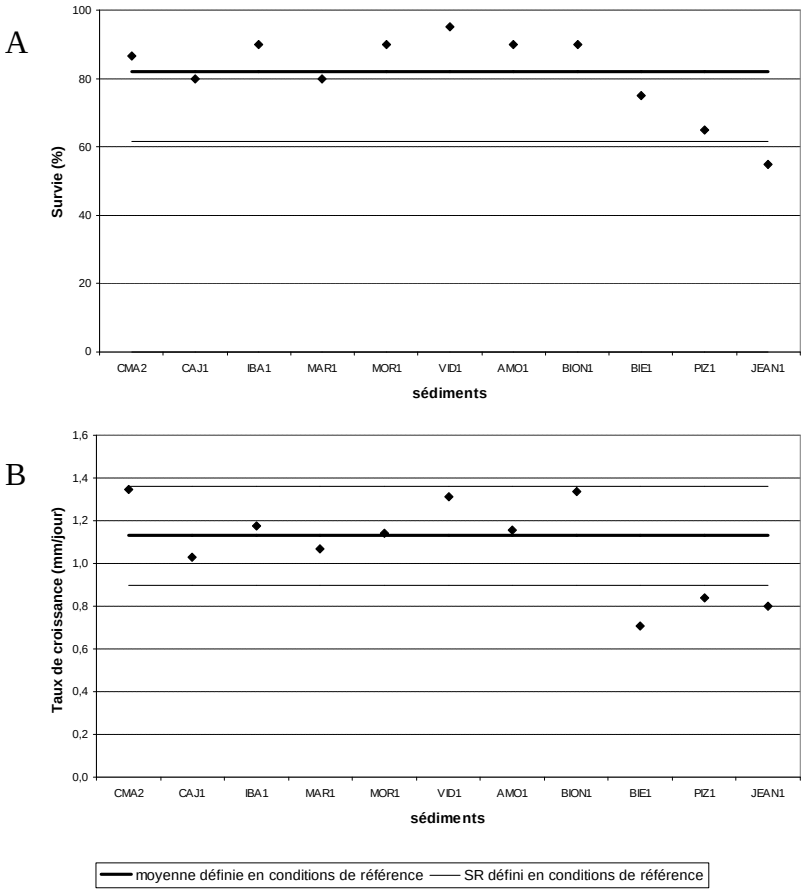


Figure V-4 : Résultats des tests de croissance des larves *C. riparius* exposés aux sédiments contaminés positionnés par rapport à la moyenne et aux SR minimum et maximum définis en conditions de référence. A : Taux de survie ; B : Taux de croissance.

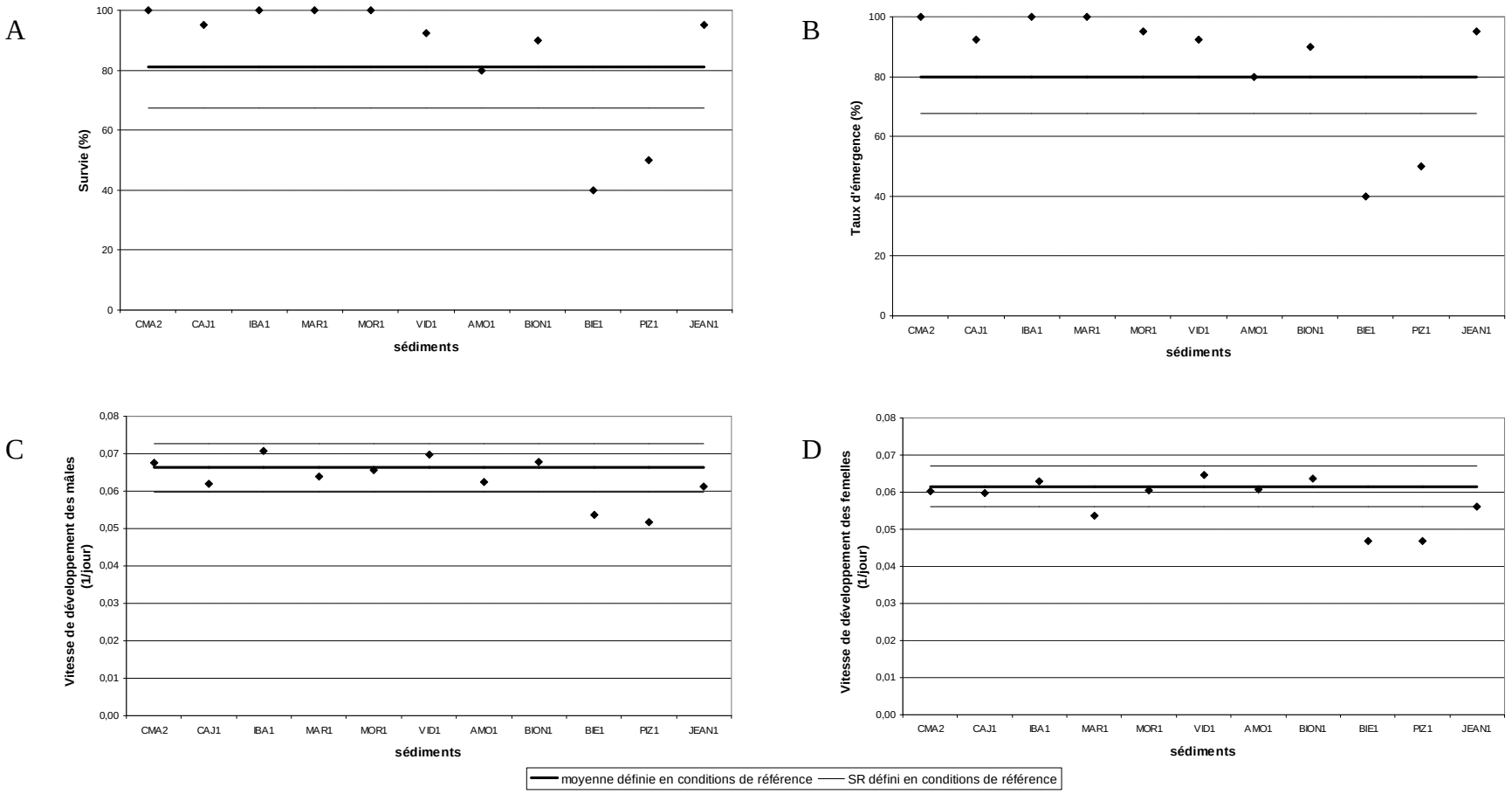


Figure V-5 : Résultats des tests dôémergence des larves *C. riparius* exposés aux sédiments contaminés positionnés par rapport à la moyenne et aux SR minimum et maximum définis en conditions de référence. A : Taux de survie ; B : Taux dôémergence ; C : Vitesse de développement des mâles ; D : Vitesse de développement des femelles.

b. Bilan des tests avec *C. riparius* sur sédiments contaminés

- Tous les critères (survie à 7 et 28 jours, taux de croissance, taux d'émergence et vitesse de développement des mâles et des femelles) classés comme peu sensibles à la contamination des sédiments.

- Sensibilité tout de même aux sédiments susceptibles de présenter une contamination par pesticides (PIZ1 et JEAN1).

- Vitesse de développement larves et taux de croissance étroitement liés : résultats similaires obtenus pour ces 2 traits.

3. *Potamopyrgus antipodarum*

Les résultats des tests de reproduction et de croissance des mollusques sont détaillés dans ce paragraphe. Ils sont présentés trait de vie par trait de vie (reproduction et croissance). Les organismes ont été exposés 6 semaines à un total de 9 sédiments contaminés et les protocoles de test employés sont les mêmes que ceux mis en î uvre pour la définition des SR sur sédiments de référence (chapitre 2 § III). Rapidement, lôévaluation du taux de reproduction se fait par comptage des embryons présents dans la poche embryonnaire des adultes (Duft et al., 2003) et les taux de croissance sont évalués par des mesures de juvéniles en début et fin dôexposition. La survie a été évaluée pour les adultes et les juvéniles.

a. Résultats des biotests sur sédiments contaminés avec *P. antipodarum*

Le tableau V-3 présente lôensemble les résultats obtenus sur les sédiments naturels contaminés pour les mollusques.

	Survie, Embryons produits par les adultes 42 jours						Survie et Croissance des juvéniles 42 jours					
	Survie (%)			Nombre total d'embryon par femelle			Survie (%)			Taux de croissance (mm/jour)		
Sédiment	médiane	CV inter réplicats (%)	n	médiane	CV inter réplicats (%)	n	médiane	CV inter réplicats (%)	n	médiane	CV inter réplicats (%)	n
CMA2	100,0	0,0	2	19,5	8,7	2	92,0	11,1	3	0,039	27,4	3
CAJ1	100,0	0,0	4	26,8	36,0	4	100,0	2,3	3	0,054	12,5	3
IBA1	100,0	0,0	4	21,5	37,1	4	100,0	0,0	3	0,046	17,7	3
MAR1	100,0	0,0	4	23,9	31,0	4	100,0	2,3	3	0,049	12,2	3
MOR1	97,7	2,7	4	20,6	36,9	4	100,0	2,3	3	0,050	17,5	3
VID1	97,7	6,7	4	13,1	39,1	4	100,0	7,2	3	0,042	16,6	3
AMO1	100,0	1,7	4	9,5	86,1	4	100,0	0,0	3	0,052	6,1	3
BION1	65,0	27,5	4	2,3	145,9	4	100,0	2,9	3	0,049	10,9	3
BIE1	100,0	0,0	4	5,1	85,9	4	100,0	0,0	3	0,048	10,0	3

Tableau V-3 : Résultats des tests de reproduction et croissance de *P. antipodarum* lors des expositions aux sédiments naturels contaminés.

Reproduction

Une inhibition du taux de reproduction a été observée pour le sédiment du Bion (BION1) ainsi que pour le sédiment de la Bienne (BIE1), avec respectivement 2,3 et 5,1 embryons par individu (SR_{min} de 6,8) (Tableau V-3 et Figure V-6 B). Ces résultats conduisent à classer ces sédiments BION1 et BIE1 comme toxiques, soit seulement 2 sédiments sur les 9 testés. Le critère de nombre d'embryons par femelle est donc peu sensible à la contamination des sédiments testés. Cette faible sensibilité s'explique par l'importante variabilité individuelle observée pour ce trait en conditions de référence. Elle a conduit à définir une gamme de niveaux de reproduction acceptables très large, ce qui limite la capacité du test à détecter des effets toxiques en présence de contaminants. Les améliorations de protocoles proposées précédemment (chapitre 4) pourraient permettre une augmentation de la sensibilité du test.
En l'état, le test de reproduction mené sur *P. antipodarum* n'est pas approprié pour une utilisation sur la base du référentiel proposé dans notre approche, mais plutôt dans une approche incluant un témoin connu et reproductible comme un sédiment reconstitué (Tuikka et al., 2011). En effet cette espèce présente un intérêt certain en écotoxicologie. Il représente un phyllum peu étudié encore et pour lequel peu de tests écotoxicologiques sont proposés, et a montré une sensibilité certaine à des contamination diverses aussi bien au laboratoire que sur le terrain : (i) lors d'exposition des médicaments (Péry et al., 2008; Gust et al., 2009), (ii) à des perturbateurs endocriniens supposés (Duft et al., 2007) (iii) aux filtres UV (Schmitt et al., 2008) (iv) à des contaminations variées sur le terrain comme des effluents de station d'épuration (Gust et al., 2010), des zones géographiques au passé minier (Gust et al., 2011), ou encore des sédiments contaminés (Schmitt et al., 2010).

Il est intéressant de noter que lors d'encagements *in situ* (2008) sur le site de prélèvement des sédiments de la rivière Bion, situé en aval d'une station d'épuration qui traite les rejets pour 78000 équivalent habitants, une inhibition de reproduction avait également été observée (Gust et al., 2010), en comparaison aux sites amont du rejet de STEP.
La fécondité des gastéropodes montre cependant différentes tendances selon les sédiments. En particulier, les sédiments VID1, AMO1, BION1 et BIE1 ont conduit à une fécondité moyenne assez faible et inférieure à la moyenne observée en sédiment de référence, au contraire des sédiments CMA2, IBA1, MAR1 et MOR1, et CAJ1, pour lesquels la fécondité est supérieure à la moyenne observée en sédiments de référence (Figure V-6 B). De telles inductions ont déjà été décrites sur cette espèce lors d'essais en milieux contaminés (Jobling et al., 2004) et

associés à des contaminations par des substances susceptibles de perturber les régulations endocriniennes de la reproduction. Cependant la grande variabilité de la reproduction, mesurée par le nombre dôembryon par individu, observée lors des tests sur sédiments de référence a conduit à définir une gamme de réponse acceptable (SR) très large, qui ne permet pas de statuer sur la significativité statistique de ces tendances.

Nous remarquons une augmentation de la variabilité du taux de reproduction avec lôapparition dôune lôinhibition de la reproduction. Les 2 sédiments ayant présenté une inhibition de reproduction ont aussi de très fortes variabilités inter réplicats. En effet, pour BION1, BIE1 ainsi que pour AMO1, cette variabilité (avec 146 %, 86 % et 86 % respectivement), est supérieure à la variabilité maximum de 81 % déjà observée en conditions de référence (Tableau V-3).

Un effet significatif sur le taux de survie des adultes reproducteurs a été observé, sur 3 des sédiments contaminés classés comme toxiques, comparativement aux seuils définis en conditions de référence. La survie des adultes reproducteurs est donc considérée comme un critère moyennement sensible à la contamination des sédiments. Pour les sédiments du Léman et de lôAzergues (VID1 et MOR1) la mortalité observée était de 2,3 %. Même faibles, ces taux de mortalité sont significatifs, comparativement aux SR_{min} de 1,7 %. En revanche, le sédiment du Bion, avec un taux de mortalité de 35 %, a impacté de manière très significative la survie des adultes (Tableau V-3 et Figure V-6 A).

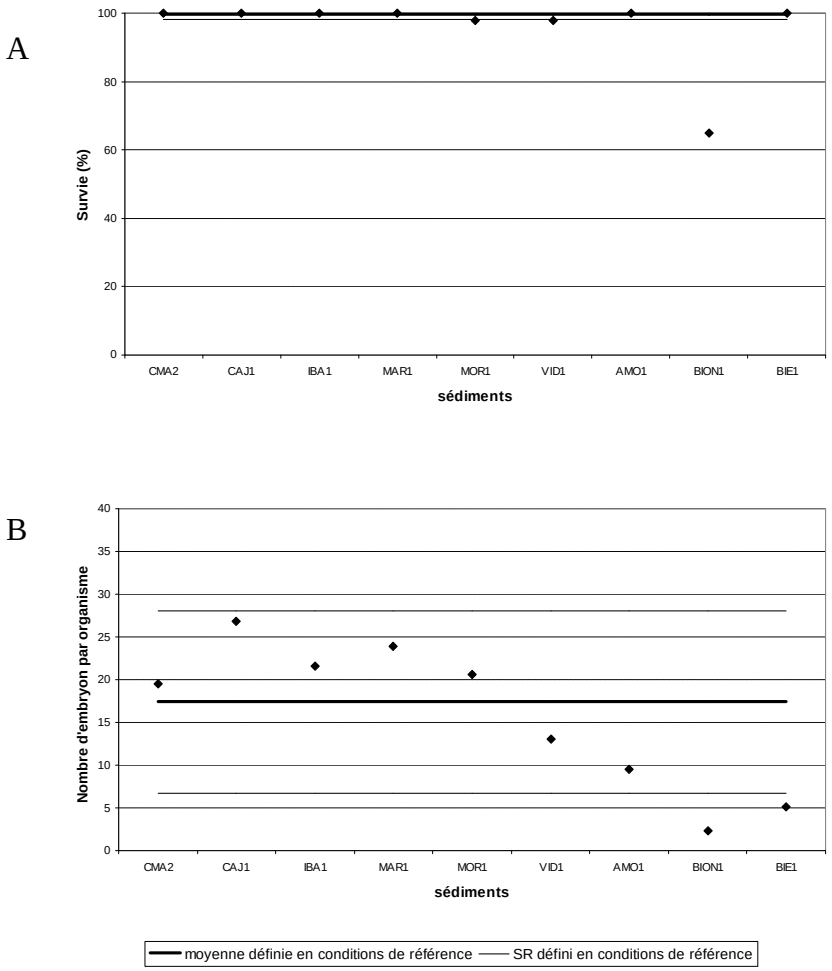


Figure V-6 : Résultats des tests de reproduction des adultes *P. antipodarum* exposés aux sédiments contaminés positionnés par rapport à la moyenne et aux SR minimum et maximum définis en conditions de référence. A : Taux de survie ; B : Nombre dœmbryon par femelle.

Croissance

Dans le panel de sédiments contaminés testés, nous nôobservons pas dôeffet sur la croissance des juvéniles (Tableau V-3 ; Figure V-7 B). Malgré une faible variabilité, le taux de croissance de *P. antipodarum* est un trait qui a été peu sensible à la contamination mesurées dans les sédiments testés.

La survie des juvéniles de *P. antipodarum*, très élevée pour lôensemble des sédiments contaminés, est un critère peu sensible à la contamination des sédiments. Avec 92 % de survie, le sédiment du Rhône CMA2 présente néanmoins un taux de survie inférieur au SR_{min} (Tableau V-3 ; Figure V-7 A).

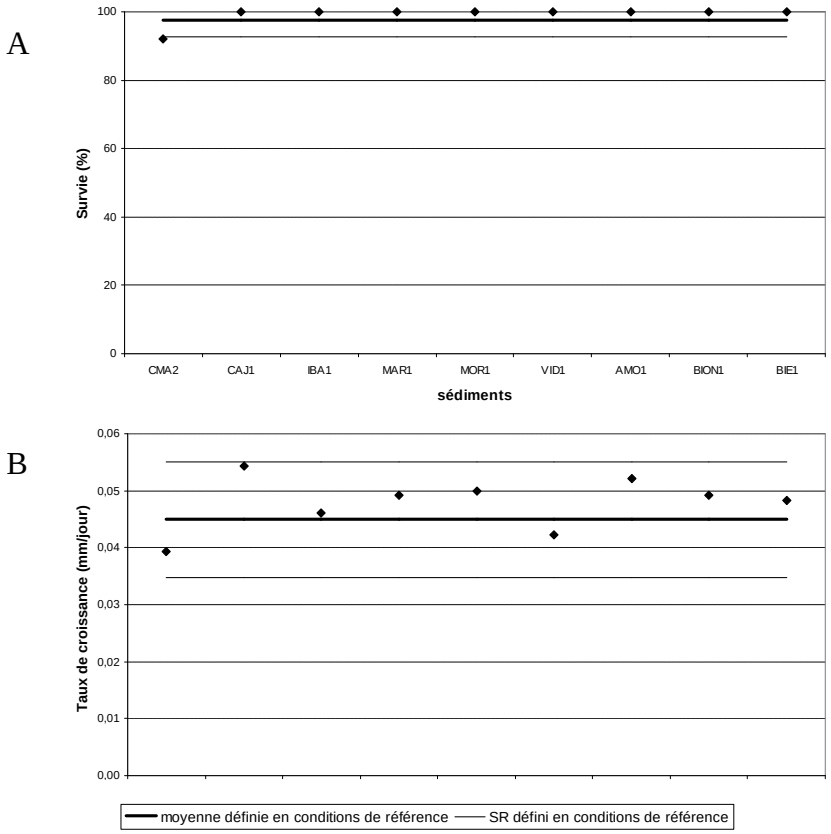


Figure V-7 : Résultats des tests de croissance des juvéniles *P. antipodarum* exposés aux sédiments contaminés positionnés par rapport à la moyenne et aux SR minimum et maximum définis en conditions de référence. A : Taux de survie ; B : Taux de croissance.

b. Bilan des tests avec *P. antipodarum* sur sédiments contaminés

- Critère moyennement sensible (entre 1 / 3 et 2 / 3 des sédiments contaminés classés comme toxiques) : taux de survie des adultes reproducteurs.
  Critères peu sensibles (moins de 1 / 3 des sédiments contaminés classés comme toxiques) : survie des juvéniles ; taux de croissance des juvéniles ; nombre d'embryons par femelle.

- En l'état, test de reproduction sur *P. antipodarum* non approprié pour une utilisation sur la base du référentiel proposé dans notre approche.

4. Synthèse des résultats obtenus sur sédiments naturels contaminés

Ce paragraphe a pour objectif d'effectuer un bilan de l'ensemble des tests mis en î uvre sur sédiments naturellement contaminés. Pour cela chaque test a été évalué sur 3 critères.

- Tout d'abord la facilité de mise en î uvre de chaque test a été établie en prenant en compte la durée des expérimentations, les besoins techniques nécessaires (matériels et humains ; compétences techniques nécessaires).
- Ensuite, la robustesse du test a été évaluée en prenant en considération la reproductibilité de chaque test entre les sédiments non contaminés (CV inter sédiments) et la cohérence des résultats obtenus avec les connaissances antérieures du laboratoire et avec la littérature disponible.
- Enfin, la sensibilité des tests a été évaluée selon la proportion de sédiments contaminés testés classés comme toxiques pour chaque critère. Le bilan obtenu est présenté dans le tableau V-4. Ces résultats, combinés aux conclusions tirées du développement des seuils référentiels pour chaque trait (chapitre 4) permettent d'établir un bilan quant à notre batterie de tests.

Notre approche basée sur un référentiel de valeurs pour chaque trait, obtenues sur des sédiments de référence, pour évaluer le danger toxique des sédiments, est pertinente dans la mesure où une grande partie des critères testés avec la méthode développée ici (par exemple le nombre d'ovocytes par femelle chez *G. fossarum*), ont permis de classer les sédiments contaminés comme effectivement toxiques. En revanche, les critères de taux de reproduction des adultes *P. antipodarum* et de taux de croissance des juvéniles *G. fossarum* se sont avérés peu appropriés dans la démarche mise en place.

Quelques améliorations sont tout de même à prévoir. Il serait nécessaire d'augmenter le nombre de sédiments de référence testés pour définir le référentiel (pourtant conséquent dans le cadre d'une thèse avec 8 sédiments de référence), ainsi que le nombre de réplicats pour certains traits (ex : test de reproduction pour *P. antipodarum*). De plus, certains tests semblent apporter une information redondante, alors que d'autres ne répondent pas aux contaminations testées, il serait donc important de revoir la sélection des traits à tester. Une diminution du nombre de traits suivis pourrait permettre d'augmenter le nombre de sédiments testés.

Dans le cas d'une très forte variabilité biologique, non liée aux propriétés des sédiments, il reste recommandé d'utiliser un contrôle biologique (ex : témoin eau ou sédiment artificiel ; carte de contrôle), afin de vérifier la qualité des organismes utilisés et éventuellement de pondérer les mesures obtenues.

Presque tous les tests sont très simples à mettre en î uvre à l'exception de la mesure de surface ovocytaires chez le gammare qui nécessite un matériel et une formation adaptée.
C'est sur le critère de sensibilité que les traits mesurés pour les 3 espèces, lors des différents tests effectués, se distinguent. En effet, l'ensemble des traits chez le gammare se sont avérés moyennement voire très sensibles aux contaminations des sédiments pour au moins l'un des critères de mesure, alors que les traits des 2 autres espèces se sont avérés parfois moyennement, et souvent peu sensibles ou semblent marquer une typologie particulière de contamination.
Ainsi, les tests sur gammares (sauf la mesure de croissance que nous n'avons pas pu réaliser en conditions contaminées) semblent être utilisables tels quels comme marqueurs de contamination des sédiments. En revanche, les tests concernant les 2 autres espèces, peu sensibles, sont potentiellement améliorables.

Les typologies de contamination représentées dans le panel de sédiments ne sont pas exhaustives. Certains types de contamination sont bien représentés (plusieurs mélanges de métaux par exemple), alors que d'autres sont sous représentés (pas de forte contamination en PCB par exemple). Des tests qui se sont avérés peu sensibles aux contaminations testés auraient pu l'être pour des typologies de contamination non représentées (et inversement). C'est le cas par exemple des composés organiques qui sont peu représentés alors qu'il a été montré que *P. antipodarum* peut y être sensible (Duft et al., 2003).

Espèce	Trait de vie	Paramètre mesuré	Caractéristiques des organismes à T0	Durée des tests (semaines)	Facilité de mise en î uvre	Robustesse	Sensibilité du test
G. fossarum	reproduction	survie nombre d'embryon par femelle nombre d'ovocyte par femelle surfaces ovocytaire	femelles en précopulats et en fin de cycle de mue (fin de stade D2)	3	+ + + -	++ + ++ ++	+ + ++ ++
	alimentation	survie taux de consommation de feuilles	mâles adultes 11 - 12 mm	1	+ +	++ ++	+ ++
	croissance	survie taux de croissance	juvéniles 2 - 2,5mm	4	+ +	++ ++	++ +
C. riparius	croissance	survie taux de croissance	larves 1,5 - 1,7 mm	1	+ + + +	+ ++	- -
	émergence	survie taux d'émergence vitesse de développement des mâles vitesse de développement des femelles	larves 1,5 - 1,7 mm	4	+ + + + + + + +	+ ++ ++ ++	- - - -
P. antipodarum	reproduction	survie nombre d'embryon par femelle	adultes reproducteurs 4,3 - 4,8 mm	6	+ + +	++ -	+ -
	croissance	survie taux de croissance	juvéniles 1,7 - 2,7 mm	6	+ + + +	++ ++	- -

Tableau V-4 : Bilan des tests effectués, critère par critère, pour les trois espèces. La facilité de mise en î uvre et la robustesse des tests a été établie sur un jugement personnel avec à chaque fois trois classes possible allant de « ï » pour les tests les plus difficiles à mettre en place et le moins robustes, à « ++ » pour les plus faciles à mettre en place et les plus robustes (« + » représentant la classe intermédiaire). La sensibilité des tests a été jugée en trois classes suivant la proportion de sédiments contaminés classés comme toxiques par le critère en question : < 1/3 (-) ; 1/3 << 2/3 (+) et > 2/3 (++).

II Sédiment dopé en cadmium (Cd)

Lôobjectif des tests effectués sur sédiments dopés était de comparer la sensibilité des traits testés pour les 3 espèces, face à un contaminant modèle, le cadmium. Le sédiment choisi est lôun de ceux sélectionné comme référence dans le cadre de la définition des référentiels de réponses biologiques (chapitre 3). Il sôagit de lôun des prélèvements du sédiment de lôAin (PG3) puisque côest ce site pour lequel le laboratoire dispose du plus grand recul. Le site de prélèvement, les caractéristiques géochimiques de ce sédiment brut (avant dopage) ainsi que les concentrations en contaminants dosés sont présentées respectivement dans les tableaux III-1, III-4 et III-6. Le sédiment PG3 a été dopé avec des concentrations choisies pour être représentatives des contaminations environnementales. Cette série dôexpérimentations a été effectuée en octobre 2009 (série S2, figure II-10). Lors de biotests sur sédiments dopés, la méthode la plus couramment utilisée pour vérifier les effets des contaminants sur les traits de vie consiste en lôétude des relations dose-réponse. Le plus souvent il sôagit de comparer les effets observés aux diverses concentrations de dopage à ceux constatés dans le témoin non dopé. Nous avons appliqué cette méthode au sédiment PG3 dopé en cadmium (concentrations 0,5 à 19,5 mg / kg). Les résultats obtenus ont été également comparés aux seuils référentiels définis sur les sédiments de référence (chapitre 4).

1. Choix des concentrations de dopage

Le sédiment PG3 a été dopé à des concentrations choisies pour être représentatives des contaminations environnementales. Pour définir les concentrations, nous nous sommes basés sur la distribution des contaminations en Cd dans les sédiments en France (Figure V-8, dôaprès lôINERIS (2010), et avons sélectionné nos concentrations de dopage pour quôelles représentent au mieux cette distribution. Les concentrations nominales sélectionnées se situent à la fois sous la concentration seuil dôeffets (TEC), entre TEC et la concentration dôeffet probable (PEC), et au-dessus le PEC définis par MacDonald et al. (2000). Les concentrations nominales suivent une raison de 2,5 (0 ; 0,5 ; 1,3 ; 3,1 ; 7,8 ; 15,5 mg / kg de poids sec). Les acronymes utilisés pour désigner ces sédiments dopés correspondent à celui du sédiment brut suivi de la concentration de dopage indiquée entre crochets, par exemple PG3[7,8] désigne la concentration de dopage à 7,8 mg / kg.

Les 3 espèces ont été exposées à ces sédiments dopés suivant les mêmes protocoles que ceux décrits sur sédiments naturels (chapitre 2).

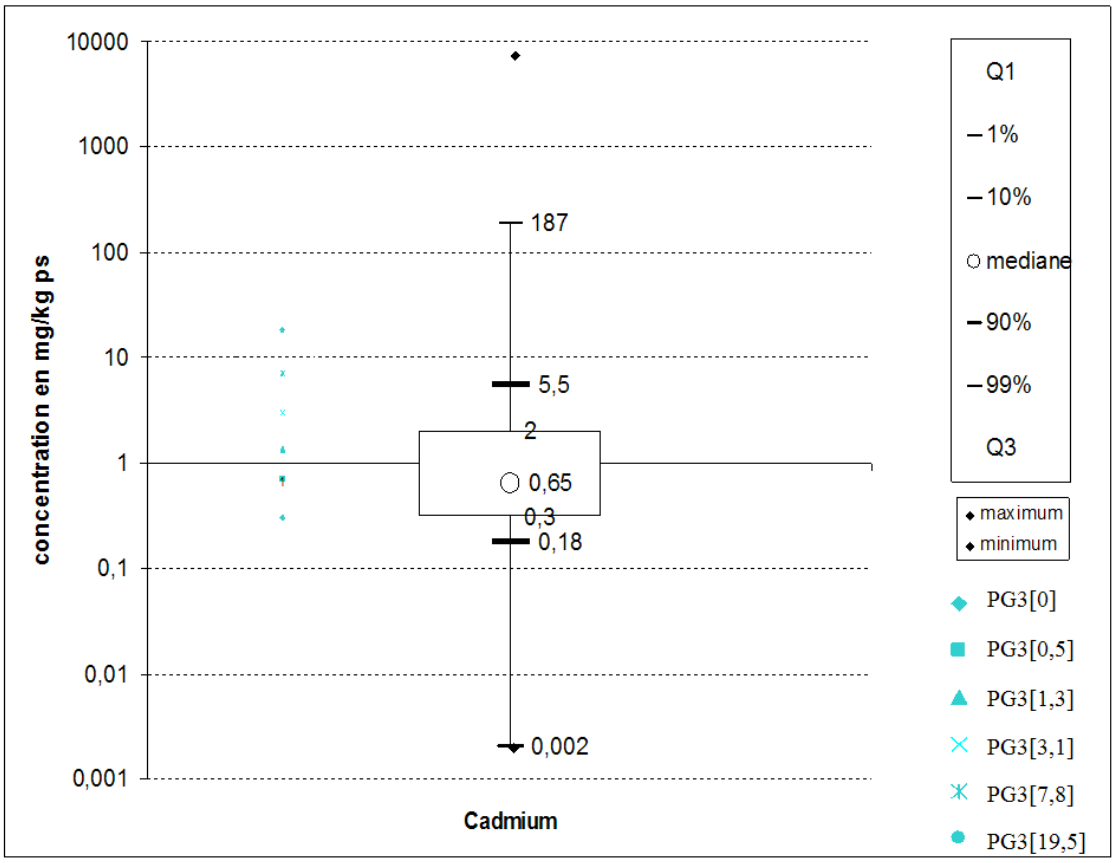


Figure V-8 : Concentrations de dopage en cadmium (en bleu) par rapport à la distribution des concentrations en Cd dans les sédiments français (en noir) (INERIS, 2010).

2. Efficacité du dopage

Des dosages de Cd dans les sédiments dopés ont été réalisés afin de vérifier lœfficacité des dopages. Les concentrations en Cd particulaire obtenues après dopage sont proches des concentrations nominales choisies (Tableau V-5). Les dosages réalisés dans les eaux (interstitielles et superficielles) montrent que le cadmium sœst très majoritairement fixé aux particules (Tableau V-5). Les rendements de dopage correspondants sont présentés figure V-9.

	Cd		
	Sédiment (mg / kg)	Eaux superficielles (µg / l)	Eaux interstitielles (µg / l)
PG3 [0]	**0,31**	< LQ	0,02
PG3 [0,5]	**0,71**	< LQ	NR
PG3 [1,3]	**1,35**	< LQ	NR
PG3 [3,1]	**2,97**	0,01	0,46
PG3 [7,8]	**6,97**	0,02	1,38
PG3 [19,5]	**17,5**	0,0	1,82

Tableau V-5 : Concentrations en Cd dosées dans les sédiments dopés ainsi que dans les eaux superficielles et interstitielles. (LQ= 0,033 mg / kg ; NR = non renseigné)

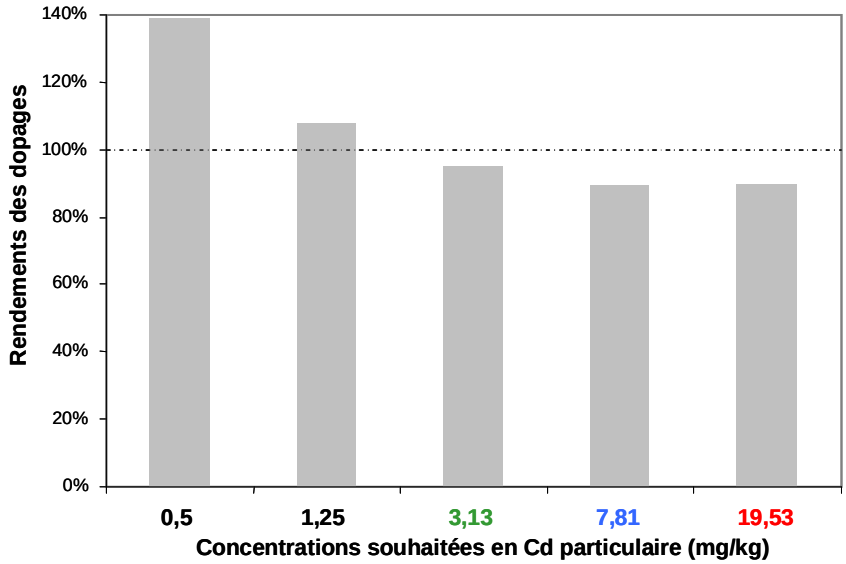


Figure V-9: Rendements des dopages en Cd.

Les rendements obtenus sont excellents (90 % au minimum). Pour les 2 plus faibles concentrations de dopage les rendements sont supérieurs à 100%, ceci est expliqué par la présence avant dopage de 0,3 mg/kg de Cd dans le sédiment (Figure V-9). Pour les 3 autres concentrations de dopage, la présence de Cd dans le sédiment de départ n'a que peu d'impact sur les rendements car il représente une très faible proportion des concentrations finales.

3. Résultats des biotests

Les résultats obtenus pour chaque trait de vie testé, lors des expositions réalisées sur les sédiments dopés sont présentés dans les tableaux V-6, V-7 et V-8 pour *G. fossarum*, *C. riparius* et *P. antipodarum* respectivement.

Lôanalyse de ces résultats a ensuite été effectuée par 2 méthodes. La première méthode consiste à comparer statistiquement les réponses obtenues pour les différentes concentrations de test au sédiment témoin non dopé. La seconde méthode que nous avons utilisée consiste à comparer les réponses obtenues pour les 5 concentrations de dopage à la gamme de réponse définie précédemment sur notre panel de sédiments de référence.

	Survie, Embryons produits, Nombre et surface des ovocytes 21 jours												Survie et Alimentation des mâles 7 jours						Survie et Croissance des juvéniles 28 jours					
	Survie (%)			Nombre d'embryon pondéré par femelle			Nombre d'ovocyte pondéré par femelle			Surface ovocytaire (mm²)			Survie (%)			Taux d'alimentation (mm²/jour/individu)			Survie (%)			Taux de croissance (mm/jour)		
Sédiment	médiane	CV inter réplicats (%)	n	médiane	CV inter réplicats (%)	n	médiane	CV inter réplicats (%)	n	médiane	CV inter réplicats (%)	n	médiane	CV inter réplicats (%)	n	médiane	CV inter réplicats (%)	n	médiane	CV inter réplicats (%)	n	médiane	CV inter réplicats (%)	n
PG3 [0]	80,0	13,3	3	2,5	20,5	11	3,5	45,3	11	95864	20,8	6	100,0	0,0	6	26,6	18,4	6	80,0	9,2	5	0,045	10,3	5
PG3 [0,5]	100,0	12,4	3	3,2	32,7	10	4,4	56,1	10	97343	14,4	7	95,0	11,0	6	19,3	24,0	6	80,0	6,9	5	0,051	7,6	5
PG3 [1,3]	90,0	11,1	3	3,6	39,6	11	4,9	23,7	11	98081	17,6	7	90,0	9,9	6	23,5	23,1	6	86,7	9,0	5	0,047	20,4	5
PG3 [3,1]	80,0	13,3	3	3,0	29,8	10	4,1	23,6	10	95839	14,9	7	100,0	4,2	6	23,7	18,3	6	66,7	12,2	5	0,042	11,0	5
PG3 [7,8]	90,0	11,1	3	2,8	34,8	10	4,8	42,5	10	100549	14,7	8	100,0	5,3	6	22,2	40,1	6	80,0	28,8	5	0,036	28,8	5
PG3 [19,5]	90,0	25,0	3	3,8	44,6	10	5,1	35,4	10	95104	13,5	8	100,0	0,0	6	25,1	19,6	6	80,0	13,5	5	0,048	6,5	5

Tableau V-6 : Résultats des tests de reproduction, alimentation et croissance de *G. fossarum* lors des expositions aux sédiments dopés.

	Survie et Croissance 7 jours						Survie, Taux d'émergence et Vitesses de développement 28 jours											
	Survie (%)			Taux de croissance (mm/jour)			Survie (%)			Taux d'émergence (%)			Vitesse de développement des mâles (1/jour)			Vitesse de développement des femelles (1/jour)		
Sédiment	médiane	CV inter réplicats (%)	n	médiane	CV inter réplicats (%)	n	médiane	CV inter réplicats (%)	n	médiane	CV inter réplicats (%)	n	médiane	CV inter réplicats (%)	n	médiane	CV inter réplicats (%)	n
PG3 [0]	70,0	8,7	3	1,10	12,0	3	90,0	11,1	3	90,0	11,1	3	0,070	3,7	3	0,066	2,1	3
PG3 [0,5]	66,7	37,7	3	1,08	11,7	3	70,0	34,3	3	70,0	34,3	3	0,071	8,2	3	0,064	7,5	3
PG3 [1,3]	76,7	15,1	3	1,18	5,5	3	100,0	12,4	3	100,0	12,4	3	0,069	2,1	3	0,064	6,8	3
PG3 [3,1]	76,7	15,1	3	1,23	5,6	3	80,0	13,3	3	80,0	13,3	3	0,072	1,5	3	0,067	0,8	3
PG3 [7,8]	80,0	33,1	3	1,18	3,9	3	80,0	32,8	3	80,0	32,8	3	0,072	5,8	3	0,067	1,2	3
PG3 [19,5]	60,0	16,7	3	1,24	9,0	3	40,0	44,6	3	40,0	44,6	3	0,069	3,1	3	0,069	2,5	3

Tableau V-7 : Résultats des tests de croissance et émergence de *C. riparius* lors des expositions aux sédiments dopés.

	Survie, Embryons produits par les adultes 42 jours						Survie et Croissance des juvéniles 42 jours					
	Survie (%)			Nombre total d'embryon par femelle			Survie (%)			Taux de croissance (mm/jour)		
Sédiment	médiane	CV inter réplicats (%)	n	médiane	CV inter réplicats (%)	n	médiane	CV inter réplicats (%)	n	médiane	CV inter réplicats (%)	n
PG3 [0]	100,0	0,0	2	18,8	0,7	2	96,0	0,0	3	0,039	9,8	3
PG3 [0,5]	98,3	2,4	2	21,3	12,6	2	100,0	26,6	3	0,026	52,9	3
PG3 [1,3]	96,7	4,9	2	14,8	70,7	2	96,0	2,4	3	0,039	6,5	3
PG3 [3,1]	100,0	0,0	2	20,2	7,7	2	92,0	6,5	3	0,039	4,8	3
PG3 [7,8]	100,0	0,0	2	18,0	10,0	2	100,0	2,3	3	0,043	7,6	3
PG3 [19,5]	96,7	4,9	2	19,5	8,7	2	96,0	4,2	3	0,038	6,3	3

Tableau V-8 : Résultats des tests de reproduction et croissance de *P. antipodarum* lors des expositions aux sédiments dopés.

a. Comparaison des sédiments dopés avec le témoin non dopé

Lôobjectif de cette série de tests était de comparer les sensibilités des 3 espèces de test via lôexposition à un contaminant modèle : le cadmium. Lors de ces expérimentations, malgré des concentrations de dopage dépassant les 19 mg / kg, aucun effet nôa été observé pour lôensemble des traits de vie testés sur *G. fossarum* et *P. antipodarum* (Tableau V-9). Pour le chironome, seul le taux dôémergence, et seulement à la plus forte concentration est significativement diminué par rapport au témoin.

Organisme	Trait de vie testé	Critère de mesure	Test statistique utilisé	Logiciel ®	p-value
G. fossarum	Reproduction des adultes	survie	test de proportions	R	0,8788
		nombre d'embryon par femelle	ANOVA	statistica	0,605679
		nombre d'ovocyte par femelle	ANOVA	statistica	0,774560
		surfaces ovocytaires	ANOVA	statistica	0,85534
	Alimentation des mâles adultes	survie	Kruskal Wallis	statistica	0,105
		taux d'alimentation	Kruskal Wallis	statistica	0,588
	Croissance des juvéniles	survie	ANOVA	statistica	0,197617
		taux de croissance	ANOVA	statistica	0,447548
C. riparius	Croissance des larves	survie	Kruskal Wallis	statistica	0,558
		taux de croissance	ANOVA	statistica	0,636021
	Emergence	survie	Kruskal Wallis	statistica	0,160
		taux d'émergence	Cochran-Armitage régressif	XLStats	<0,0001 n'est plus significatif dès le retrait de la plus forte concentration : p= 0,317
		vitesse de développement des mâles	ANOVA	statistica	0,951748
		vitesse de développement des femelles	ANOVA	statistica	0,654265
P. antipodarum	Reproduction des adultes	survie	Kruskal Wallis	statistica	0,593
		nombre d'embryon par femelle	Kruskal Wallis	statistica	0,617
	Croissance des juvéniles	survie	Kruskal Wallis	statistica	0,772
		taux de croissance	Kruskal Wallis	statistica	0,691

Tableau V-9 : Résultats des tests statistiques effectués pour vérifier lœxistence de relations dose-réponse pour les tests sur sédiments dopés en cadmium. Les résultats significatifs, reflétant lœxistence de relations dose-réponse, sont représentés en rouge.

b. Comparaison des réponses obtenues sur sédiments dopés avec la gamme de réponse définie sur sédiments de référence

Les résultats des expérimentations menées sur sédiments dopés ont également été comparés aux SR définis sur sédiments de référence.

Les résultats obtenus sur les gammares sont parfois hors des SR, c'est le cas de la survie des adultes du test de reproduction pour PG3[0] et PG3[3,1], des adultes du test d'alimentation pour PG3[0,5], de la survie des juvéniles pour PG3[3,1], du nombre d'ovocytes par femelle pour PG3[19,5] et du taux de consommation de feuilles pour PG3[0,5] et PG3[7,8] (Figures V-10 V-11 et V-12).

En comparant les réponses des traits de vie des chironomes par rapport aux SR, il en ressort que la survie des larves des tests de croissance et d'émergence ainsi que le taux d'émergence sont affectés par la concentration en cadmium la plus élevée (19,5 mg / kg) (Figures V-13 et V-14). La vitesse de développement des femelles est également hors du référentiel, mais supérieure, pour PG3[3,1] et PG3[7,8] (Figure V-14).

A l'image des réponses obtenues pour le gammare, les traits affectés pour le mollusque ne suivent pas de relation dose réponse. Ainsi, la survie des adultes a été diminuée pour PG3[1,3] et PG3[19,5] (Figure V-15), de même que la survie des juvéniles pour PG3[3,1] et leur croissance pour PG3[0,5] (Figure V-16).

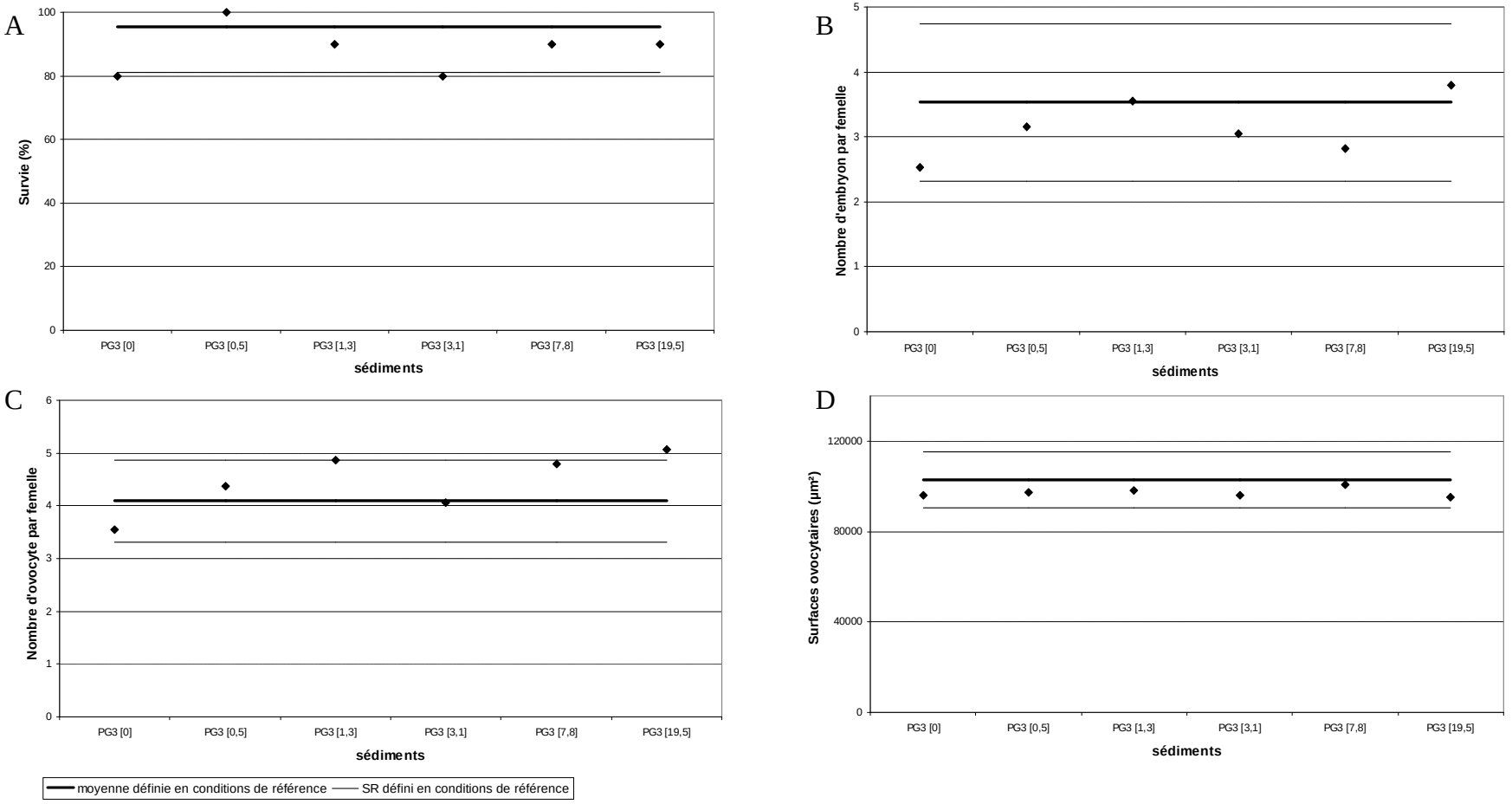


Figure V-10: Résultats des tests de reproduction des adultes *G. fossarum* exposés aux sédiments dopés positionnés par rapport à la moyenne et aux SR minimum et maximum définis en conditions de référence. A : Taux de survie ; B : Nombre d'embryon par femelle ; C : Nombre d'ovocyte par femelle ; D : Surfaces ovocytaires.

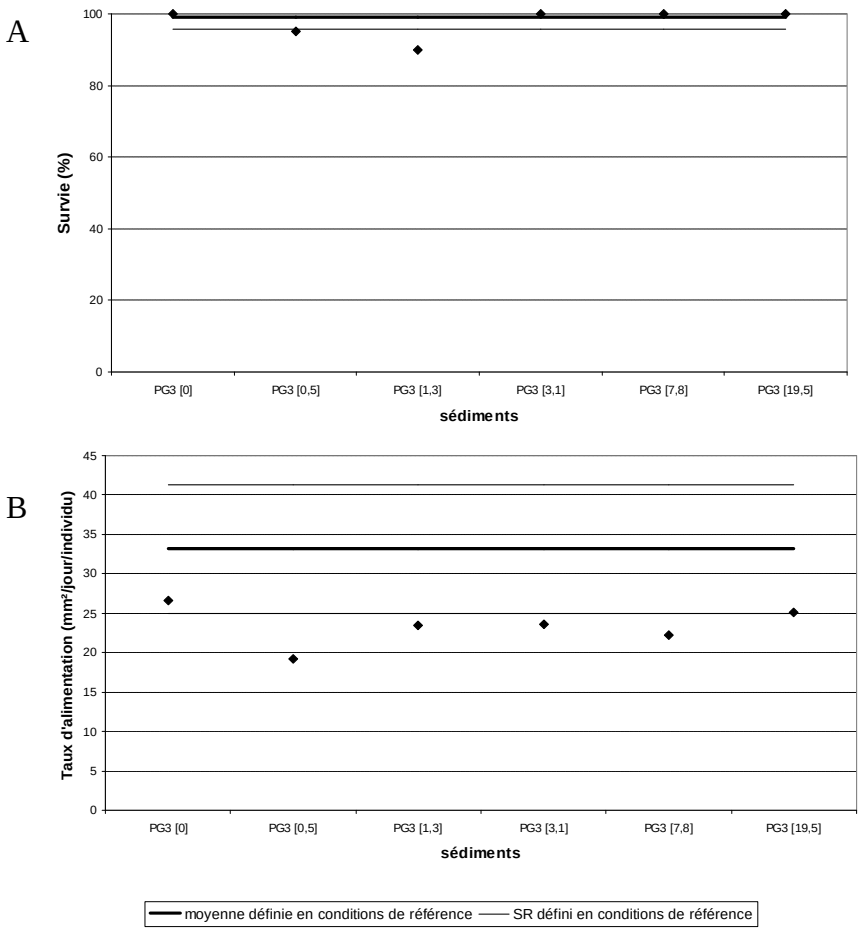


Figure V-11 : Résultats des tests d'alimentation des mâles adultes *G. fossarum* exposés aux sédiments dopés positionnés par rapport à la moyenne et aux SR minimum et maximum définis en conditions de référence. A : Taux de survie ; B : Taux de consommation de feuilles d'aulne.

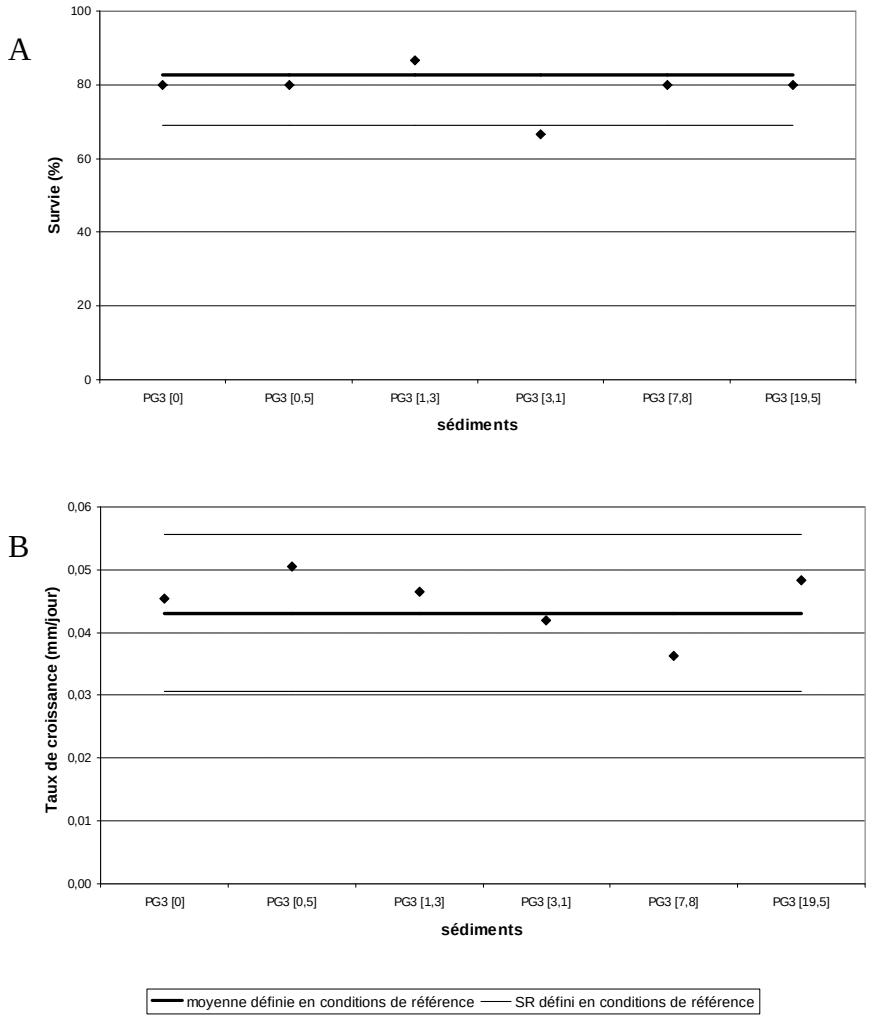


Figure V-12 : Résultats des tests de croissance des juvéniles *G. fossarum* exposés aux sédiments dopés positionnés par rapport à la moyenne et aux SR minimum et maximum définis en conditions de référence. A : Taux de survie ; B : Taux de croissance.

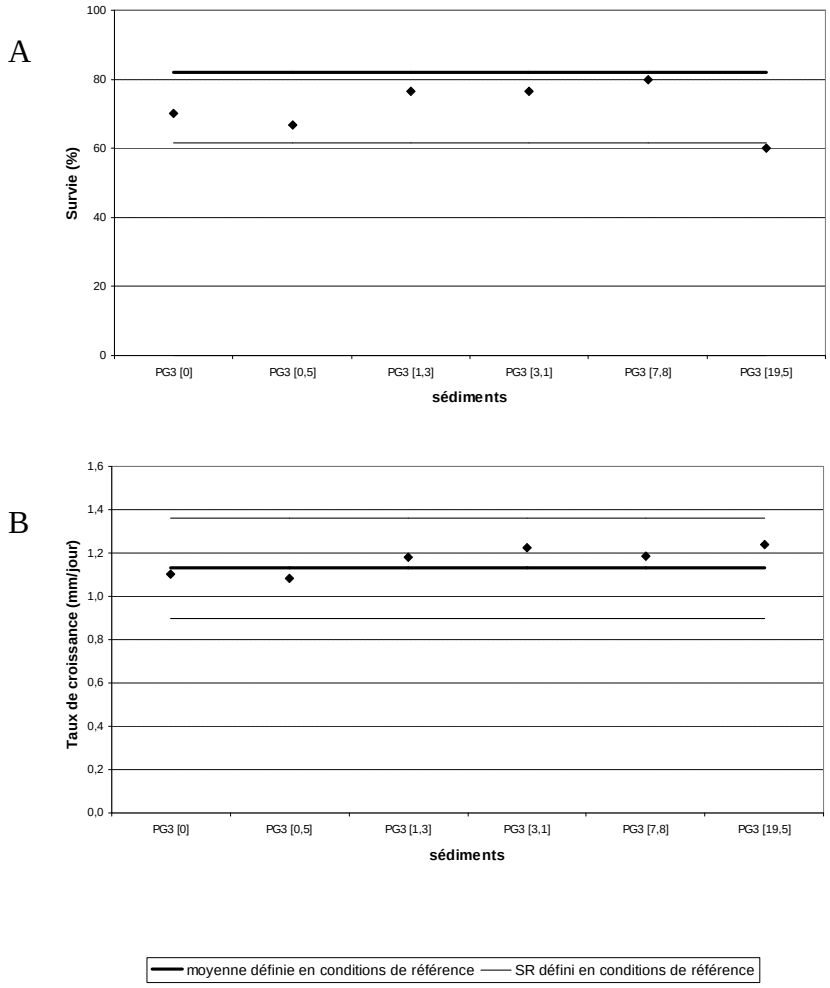


Figure V-13 : Résultats des tests de croissance des larves *C. riparius* exposés aux sédiments dopés positionnés par rapport à la moyenne et aux SR minimum et maximum définis en conditions de référence. A : Taux de survie ; B : Taux de croissance.

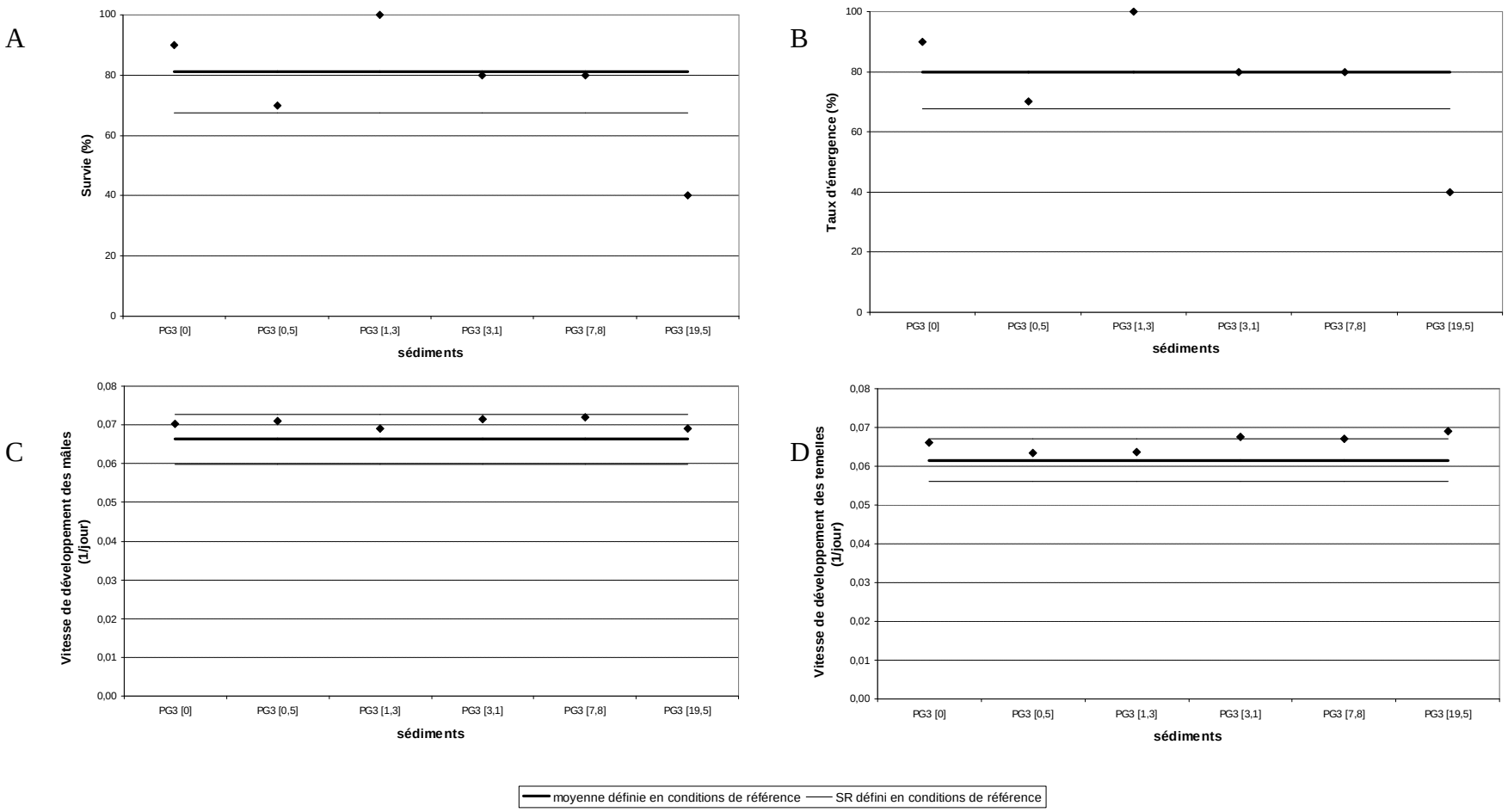


Figure V-14 : Résultats des tests d'émergence des larves *C. riparius* exposés aux sédiments dopés positionnés par rapport à la moyenne et aux SR minimum et maximum définis en conditions de référence. A : Taux de survie ; B : Taux d'émergence ; C : Vitesse de développement des mâles ; D : Vitesse de développement des femelles.

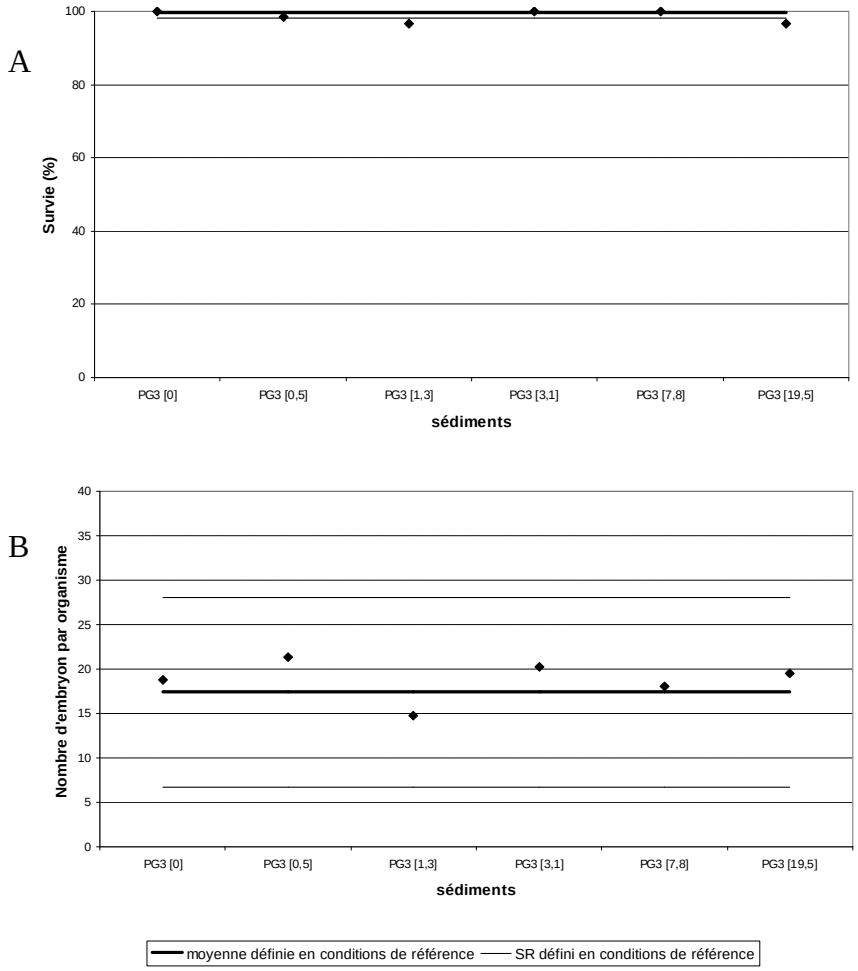


Figure V-15 : Résultats des tests de reproduction des adultes *P. antipodarum* exposés aux sédiments dopés positionnés par rapport à la moyenne et aux SR minimum et maximum définis en conditions de référence. A : Taux de survie ; B : Nombre dœmbryon par femelle.

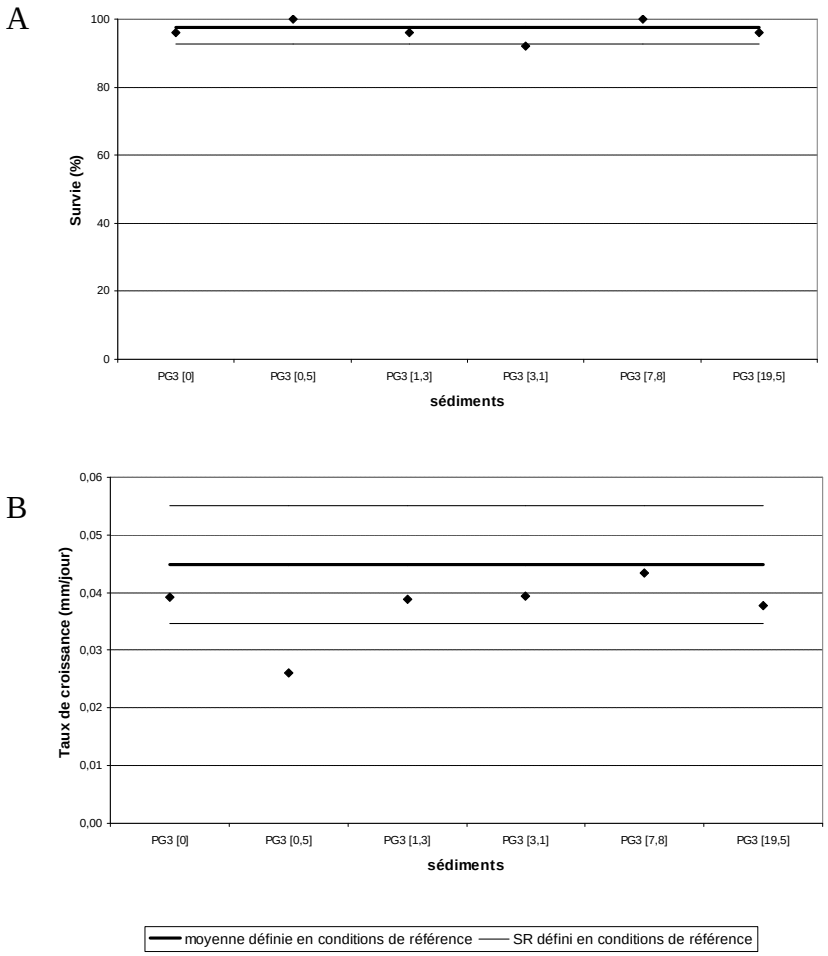


Figure V-16 : Résultats des tests de croissance des juvéniles *P. antipodarum* exposés aux sédiments dopés positionnés par rapport à la moyenne et aux SR minimum et maximum définis en conditions de référence. A : Taux de survie ; B : Taux de croissance.

4. Discussion

Les concentrations de dopage sélectionnées sont représentatives des sédiments français, allant des plus basses aux plus fortes concentrations de cadmium. La méthode de dopage mise en œuvre s'est avérée très efficace avec des rendements supérieurs à 90 %.
Les 3 espèces ont été testées pour chacun des traits sélectionnés suivant les mêmes protocoles que ceux utilisés pour la définition des seuils référentiels de réponse sur sédiments pas ou peu contaminés.

Les réponses des traits de vie obtenues pour les 5 concentrations de dopage, pour les 3 espèces, ne sont pas significativement différentes de celles du témoin non dopé PG3[0], sauf pour le critère de vitesse de développement des larves mâles et femelles de *C. riparius*, et à la plus forte concentration uniquement. Etant donné le peu d'effet du cadmium aux concentrations choisies, même les plus élevées (19,5 mg / kg), l'objectif de comparaison de sensibilité des différents traits des 3 espèces de test n'a pas été atteint comme espéré. Il est simplement possible de remarquer que cette approche d'analyse des données (comparaison de concentrations de dopage avec le témoin non dopé correspondant), montre une plus grande sensibilité du chironome par rapport aux 2 autres espèces, puisqu'il est le seul à avoir montré un effet toxique significatif à la plus forte concentration en cadmium.
Au cours d'expérimentations menées en parallèle sur les mêmes sédiments, le couplage de la DGT avec des extractions séquentielles et la mesure de la bioaccumulation dans les organismes testés a permis de rendre compte que le Cd était largement fixé par l'importante fraction carbonatée (54 %) du sédiment PG3. La fixation du Cd par les carbonates a pour effet de rendre ce métal très peu disponible pour les organismes, en particulier pour le gammare et le gastéropode par rapport au chironome. En effet, pour les gammares et les gastéropodes, la concentration interne en Cd était environ 10 fois inférieure à celle mesurée dans les chironomes pour la concentration testée la plus forte (19,5 mg / kg). En revanche ces expérimentations ont mis en évidence l'importance de l'utilisation couplée de méthodes biologiques et chimiques.
De simples dosages auraient classé ces sédiments comme très contaminés au regard des fortes concentrations de Cd alors que la biologie permet de montrer qu'une forte concentration d'un contaminant n'est pas nécessairement synonyme de toxicité. De plus des analyses chimiques plus poussées, comme l'utilisation de DGT, ou des ultrafiltrations tangentielles (UFT),

permettent dôexpliquer les résultats biologiques observés, ce qui montre la complémentarité des mesures biologiques et chimiques effectuées.

Par ailleurs, lôapproche géochimique utilisée a permis de montrer que les gammares ont principalement été exposés au Cd retrouvé dans lôeau surnageante, que les gastéropodes ont été exposés au Cd présent dans lôeau interstitielle et que les chironomes ont été exposés majoritairement au Cd par voie trophique via les particules quôil ingère. Lôensemble de ces résultats est détaillé dans la publication de Dabrin et al. (2012) et souligne la complémentarité des différents organismes utilisés pour intégrer différentes voies dôexposition aux contaminants.

Lorsque les réponses des traits de vie aux sédiments dopés sont comparées cette fois avec les SR définis en conditions de référence, nous constatons que pour certains traits, les réponses obtenues peuvent être hors des SR, mais indépendamment de la concentration en cadmium (par exemple le taux de survie des juvéniles *P. antipodarum* à 3,1 mg / kg ou leur taux de croissance à 0,5 mg / kg). Ceci tend à montrer que le cadmium ajouté à ce sédiment, nôa pas ou peu dôimpact sur les traits suivis.
Le critère de taux dôalimentation des mâles adultes *G. fossarum* se distingue tout de même, puisquôil semble être le critère le plus sensible avec des taux dôalimentation hors des SR pour les 4 concentrations les plus faibles.

Bilan du dopage au cadmium

- Très peu dœffets toxiques observés malgré les importantes concentrations en cadmium : faible disponibilité du Cd pour les organismes (Dabrin et al., 2012).

- Objectif de comparaison de sensibilité des 3 espèces non atteint comme espéré.

- Complémentarité des mesures biologiques et chimiques.

III Interprétation des résultats et sélection des traits

Les référentiels de réponses définis ont mis en évidence une variabilité importante pour certains organismes et traits de vie, en particulier pour la reproduction du gastéropode *P. antipodarum*, mesurée par le nombre d'embryons produits par individu. La variabilité biologique naturelle est susceptible de masquer les influences des caractéristiques des sédiments (MO, granulométrie…), ainsi que d'une contamination. Effectivement, les gammes de réponse acceptables sont tellement étendues qu'il devient très difficile de distinguer ensuite un effet toxique des sédiments. Contrairement à la mesure de reproduction chez *P. antipodarum*, des traits tels que la vitesse d'émergence des adultes *C. riparius*, ou la mesure des surfaces ovocytaires de *G. fossarum*, sont très peu variables, ce qui les rend performants pour détecter des effets toxiques.

Ainsi, tous les traits tels qu'ils ont été mis en place dans ce travail, ne sont pas favorables à une application pour l'évaluation de la toxicité des sédiments. En conséquence, nous avons effectué une sélection des traits en nous basant donc sur des critères de robustesse et de simplicité de mise en œuvre des tests (Tableau V-4). Le Tableau V-10 présente la sélection des tests à laquelle a conduit notre démarche.

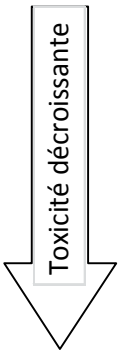
	Trait de vie				
	Survie	Croissance	Reproduction	Développement	Nutrition
G. fossarum	Taux de survie des juvéniles à 4 semaines		Nombre d'ovocyte par femelle à 3 semaines		Taux de consommation de feuilles d'aulne à 1 semaine
C. riparius		Taux de croissance des larves à 1 semaine		Taux d'émergence et vitesse de développement des adultes mâles et femelles à 4 semaines	
P. antipodarum	Taux de survie des juvéniles et des adultes à 6 semaines	Taux de croissance des juvéniles à 6 semaines			

Tableau V-10 : Tests sélectionnés pour constituer la batterie parmi ceux développés au cours de ce travail de thèse.

Lôutilisation de plusieurs espèces permet dôobtenir des résultats distincts pour un même sédiment. Cela pose la question de la synthèse des réponses des traits, et particulièrement lors de résultats contrastés. Il est possible de mettre en place un système de notation des sédiments, basé sur un rapport entre le nombre de tests ayant conduit à classer ce sédiment comme toxique sur le nombre total de tests réalisés. Pour chaque sédiment testé et pour chaque test, lôon attribue la valeur 0 si aucun effet toxique nôa été mis en évidence et 1 si un effet toxique a été observé. Pour chaque sédiment, il sôagit ensuite de calculer la moyenne des notes obtenues pour lôensemble des tests effectués. Il en résulte une note dont la valeur est comprise entre 0 et 1 (0 signifiant quôaucun effet toxique nôa été observé et 1 quôun effet toxique a été observé pour chaque test effectué, avec tous les intermédiaires possibles) (Tableau V-11). Pour chaque sédiment, nous avons calculé la note obtenue si lôon considère la batterie de tests complète (A), et réduite (B) à la sélection de tests présentés auparavant dans le tableau V-10. Ces notes sont présentées dans le tableau V-11. A partir de ces notes, nous avons effectué un classement des sédiments en fonction de leur toxicité (Tableau V-12). Ce type de classement constitue une information importante dans une démarche de priorisation des sites nécessitant une intervention (dépollution ; dragageé).

	A	B
CMA2	0,13	0,30
CAJ1	0,38	0,30
IBA1	0,38	0,30
MAR1	0,50	0,40
MOR1	0,38	0,40
VID1	0,38	0,40
AMO1	0,17	0,11
BION1	0,33	0,33
BIE1	1,00	0,67

Tableau V-11 : Notes obtenues pour les sédiments naturellement contaminés testés pour au moins un trait de chacune des trois espèces : A_ lorsque tous les tests effectués sur les invertébrés sont pris en compte ; B_ lorsque seuls les tests de la sélection réduite de tests sont pris en compte.



A	B
BIE1	BIE1
MAR1	MAR1 MOR1 VID1
CAJ1 IBA1 MOR1 VID1	BION1
BION1	CMA2 CAJ1 IBA1
AMO1	
CMA2	AMO1

Tableau V-12 : Classement des sédiments du plus toxique au moins toxique : A_ lorsque tous les tests effectués sur les invertébrés sont pris en compte ; B_ lorsque seuls les tests de la sélection réduite sont pris en compte.

Les notes obtenues pour la batterie complète et la batterie réduite sont cohérentes (notes similaires pour un grand nombre de sédiments), ce qui conforte dans l'idée qu'il est possible de réduire le nombre de tests effectués, et donc le poids expérimental, sans grande perte d'information. L'utilisation de la batterie réduite, plus simple et rapide à mettre en place et donnant des réponses similaires, est donc à favoriser par rapport à la batterie complète.

Cependant il est possible d'observer quelques différences susceptibles de modifier le classement des sites, par exemple pour les sédiments CMA2 ou IBA1 (Tableau V-11). Les différences observées sont cependant minimes avec au maximum un seul rang d'écart entre les classements effectués.
Les résultats obtenus peuvent donc être conditionnés par les tests effectués, il est donc important de savoir quels sont les objectifs visés (rapide screening de toxicité ; étude plus approfondie é) afin de déterminer dès le départ les tests qui seront effectués et pris en compte pour la notation.

Si l'utilisation de la batterie réduite de tests permet de classer les sédiments en fonction de leur toxicité, elle ne permet pas de savoir rapidement si un sédiment est toxique ou non. En effet, la batterie réduite mise en place comprend 7 tests dont la durée s'élève jusqu'à 6 semaines (tests avec *P. antipodarum*). Dans un objectif de screening rapide de la toxicité d'un site, l'idéal est d'utilisé un seul test très sensible à la contamination des sédiments, simple et rapide à mettre en place. Parmi les tests que nous avons mis en î uvre, nous en avons identifié

3 qui répondent à ces critères (sensible, simple et rapide). Il s'agit des tests chez *G. fossarum* (i) de reproduction pour le critère de nombre d'ovocytes par femelle (ii) de consommation de feuilles par les mâles et (iii) et de taux de survie des juvéniles. Un seul test étant utilisé, en cas de toxicité, la note obtenue sera systématiquement de 1. L'utilisation d'un seul test ne permet donc pas de classer les sites en fonction de leur degré de toxicité, et est donc seulement adaptée à un objectif de screening rapide de la toxicité des sédiments (le sédiment est-il toxique oui / non ?).

En conclusion, suite aux résultats observés, il est recommandé d'employer, pour un objectif de screening rapide de toxicité des sédiments l'un des tests précédemment cité, sur *G. fossarum* (nombre d'ovocytes par femelle, taux d'alimentation des mâles ou taux de survie des juvéniles). Dans le cadre d'une étude plus approfondie, il est recommandé d'utiliser la batterie réduite précédemment décrite qui permettra de classer les sédiments en fonction de leur toxicité, et donc de prioriser les actions à mener sur les différents sites de prélèvement.

Chapitre 6

Discussion générale

Des dépôts sédimentaires, souvent contaminés par divers polluants, sôaccumulent dans les zones lentiques, et en particulier au niveau de barrages et de retenues au fil de lôeau. Cette accumulation peut sôavérer problématique dôun point de vue :

1. Mécanique : par exemple en entravant le fonctionnement dôouvrages hydroélectriques.
2. Biologique : des phénomènes naturels tels que les crues, ou des opérations mécaniques telles que la restauration des milieux par lôeffacement de barrages, les dragages ou la vidange dôune retenue, entrainent souvent la remise en suspension des dépôts qui peuvent alors impacter gravement la faune et la flore en aval. La gestion des sédiments naturels en place est donc une problématique dôactualité qui soulève notamment des questions relatives à lôévaluation de leur toxicité (par exemple, pour sélectionner les méthodes les moins risquées pour le milieu pour lôévacuation de sédiments contaminés).

Lôobjectif de ce travail de thèse était donc de développer et dôadapter des biotests pour lôévaluation de la toxicité des sédiments dôeau douce, en utilisant une batterie dôinvertébrés représentatifs de nos milieux aquatiques.

Nous avons répondu à cet objectif en mettant en î uvre une approche par étape. Cette approche visait dans un premier temps à définir des référentiels de réponse des traits de vie testés pour les trois espèces, lors dôexpositions à des sédiments dits de référence (pas ou peu contaminés), présentant des caractéristiques géochimiques variées afin de sôaffranchir dôun possible effet lié aux caractéristiques intrinsèques des sédiments (contenu en MO, granulométrieé). Dans un second temps, ces tests ont été répétés lors dôexpositions à des sédiments présentant une contamination, afin dôévaluer leur sensibilité et spécificité de réponse face à des contaminations avérées des différents types (divers métaux, STEPé). Les résultats obtenus sont contrastés selon lôespèce et le trait considéré.

Ce chapitre constitue un bilan critique de la démarche suivie pour atteindre lôobjectif fixé. Il permet également de mettre en avant des perspectives à ce travail.

I La démarche

1. Intérêt des tests d'écotoxicité

La nécessité de développer des outils pour l'évaluation de la qualité des sédiments, nous a conduit à mettre en œuvre une batterie de mesures biologiques adaptées aux sédiments. Nous avons choisi des outils d'évaluation basés sur des mesures biologiques car leur utilisation présente un avantage par rapport à de simples dosages chimiques. En effet, la recherche de contaminants par dosage est souvent incomplète. Le nombre de composés chimiques retrouvés dans l'environnement, combiné aux coûts des dosages ne permet pas d'être exhaustif et contraint à limiter la recherche à des composés couramment retrouvés et / ou classés prioritaires (principalement des métaux, PCB et HAP). Les organismes vivants quant à eux peuvent détecter tout type de contaminants si tant est qu'ils y soient sensibles et que les contaminants soient biodisponibles.

Ainsi une batterie d'organismes composée d'espèces aux sensibilités différentes, est susceptible de détecter un très large spectre de composés chimiques. Par exemple, lors de nos tests, le sédiment de la Bienne (BIE1), qui était considéré peu contaminé sur la base de mesures chimiques seules, s'est montré toxique pour plusieurs traits de vie de plusieurs organismes (comme l'alimentation des gammares ou la reproduction des gastéropodes). Nous avions d'ailleurs pré-classé ce sédiment dans la catégorie « contaminé » sur la base d'indices non chimiques, en particulier les observations des gestionnaires du site qui avaient relevé de fortes mortalités de poissons lors de lâchés de sédiments.

Par ailleurs, ces travaux ont permis d'illustrer que la présence de substances chimiques dans des sédiments, même à forte concentration, ne signifie pas qu'elle constitue un risque pour les communautés benthiques (non biodisponibles). En effet, lors de notre expérimentation de dopage d'un sédiment naturel en cadmium, même à forte concentration (19,5 mg / kg), peu de variation des réponses biologiques ont été observées sur les organismes exposés. Les analyses chimiques (DGT et extractions séquentielles) ont mis en évidence que le métal s'était très fortement lié aux carbonates présents dans le sédiment, le rendant indisponible pour les organismes[4] (Dabrin et al., 2012). D'autres travaux issus de cette thèse, permettent d'illustrer les limites des dosages chimiques seuls : le sédiment du site de Port Galland sur l'Ain (PG), a

[4] Des dosages de métaux accumulés par les organismes ont été réalisés en parallèle aux biotests réalisés dans ce travail de thèse, dans le cadre du travail post-doctoral de A. Dabrin. Les résultats ne sont pas détaillés ici.

fait lôobjet de quatre campagnes de prélèvement (notées PG2 à PG5). Pour chacun des prélèvements, les concentrations des substances mesurées sont faibles et comparables dôun échantillon à lôautre. Si dans lôensemble des réponses biologiques observées pour les prélèvements 2, 3 et 5 sont cohérentes, celles observées pour PG4 (non présentées) conduisent à placer ce sédiment comme contaminé (ce qui est en désaccord avec les dosages chimiques effectués). Plusieurs pistes pour expliquer la toxicité de ce prélèvement sont envisageables, tel quôun évènement de pollution ponctuel et non détecté, mais les raisons exactes des réponses biologiques inattendues sur ce prélèvement restent inconnues. Ce résultat apparait comme surprenant puisquôil est en désaccord avec les données acquises par le laboratoire depuis plus de 10 ans sur ce site classé comme référence (Bonnet, 2000; Péry, 2003). Nos tests nous ont permis de détecter une toxicité « accidentelle », potentiellement causé par un évènement ponctuel.

Ces exemples montrent la pertinence de lôutilisation des bioessais pour lôévaluation de la qualité des sédiments, et les limites des dosages chimiques seuls. La complémentarité des deux approches est également bien illustrée, puisque des analyses chimiques plus poussées, ont permis dôexpliquer certaines réponses biologiques observées.

2. Choix et complémentarité des organismes de test

Lôutilisation de tests dôécotoxicité pour lôévaluation de la toxicité des sédiments est déjà largement répandue, et plusieurs protocoles portant sur des espèces variées ont été standardisés (ASTM, 2005; AFNOR, 2010; OCDE 233, 2010). Lôutilisation de biotests en batterie, comprenant des organismes appartenant à différents phylum, et présentant des traits écologiques et biologiques différents est déjà recommandée par plusieurs auteurs dans le cadre dôune évaluation de toxicité des sédiments (Milani et al., 2003; Höss et al., 2010; Tuikka et al., 2011). Pour ces raisons et afin dôêtre représentatifs des écosystèmes locaux, nous avons sélectionné les trois espèces *C. riparius* (insecte), *G. fossarum* (crustacé) et *P. antipodarum* (mollusque), pour les exposer aux sédiments naturels.

La variabilité de réponse des traits de chaque espèce a été évaluée lors dôexpositions à des sédiments naturels de référence. Nous avons ensuite vérifié la complémentarité des espèces et

des traits testés via des expositions à des sédiments naturels contaminés (naturellement ou artificiellement).

Nos résultats, obtenus à la fois par contamination naturelle ou artificielle (Cd), illustrent des différences de sensibilité aux toxiques entre les espèces choisies, mais aussi entre traits pour une espèce donnée (Tableau V-4). Par exemple, les mesures de taux d'alimentation ou de survie des juvéniles de *G. fossarum* sont très sensibles à la contamination des sédiments testés alors que la mesure du nombre d'embryons produits par *P. antipodarum* s'est avérée très peu sensible.

L'expérimentation de dopage en cadmium a permis d'illustrer des différences de bioaccumulation entre espèces probablement liées aux différentes voies d'exposition. En effet, *C. riparius* est l'espèce qui a le plus accumulé de Cd et s'est montré la plus sensible, probablement du fait de son comportement alimentaire impliquant l'ingestion de particules sédimentaires sur lesquelles le métal s'était fixé.

Les tests sur les gammares, pour la plupart, présentent une très grande sensibilité à tous les sédiments contaminés testés sans distinction. Si nous n'avions utilisé que ces tests, les sédiments auraient pu être désignés comme toxiques, mais nous n'aurions pas pu établir de classement des sédiments en fonction de leur toxicité. C'est l'utilisation conjointe des tests sur les trois espèces qui a permis d'établir un classement.

L'ensemble de ces résultats nous confortent dans l'utilisation des biotests en batterie sur plusieurs espèces telles que nous les avons choisies.

3. Comparaison de notre méthode avec les méthodes existantes pour tester la toxicité des sédiments

Les réponses des traits de vie de chaque espèce dépendent, non seulement de la présence de contaminant(s) et de leur biodisponibilité, mais aussi des propriétés géochimiques du sédiment (contenu en matière organique, granulométrieé). Ainsi pour être en mesure

dôinterpréter une réponse biologique à une perturbation toxique, il faut définir des conditions contrôles adaptées.

Nous avons donc choisi dôaborder le développement dôune méthodologie dôévaluation de la toxicité des sédiments en suivant une démarche par étapes. Pour rappel :

a. Définition des contrôles : gammes de réponse sur des sédiments « référence », aux caractéristiques géochimiques variées.
b. Comparaison des réponses de « référence » à celles obtenues sur des sédiments « contaminés ».

Cette approche permet la comparaison de la toxicité de différents sédiments issus du terrain, quelque soient leurs caractéristiques géochimiques (dans la limite de la gamme testée).

Notre démarche a nécessité la sélection de sédiments dits « de référence », côest-à-dire *a priori* pas ou peu contaminés et de sédiments contaminés. La sélection de sites potentiellement de références, sôest basée sur des indices de qualité des sites disponibles (hydrobiologie, localisation géographique et chimie). Si ces indications ne sont ni absolues ni exhaustives (étant donné le nombre de substances chimiques dans lôenvironnement il est impossible de tout doser), prises dans leur ensemble elles donnent une bonne indication de la qualité des sites et permettent dôeffectuer un classement *a priori* et consensuel des sédiments dans les catégories « référence » et « contaminé ».

<u>Définition des contrôles</u>

La première étape a consisté à définir la gamme de sensibilité des espèces considérées à des variations naturelles des propriétés géochimiques des sédiments. Cette étape a pour objectif principal de pouvoir se dispenser de lôutilisation systématique dôun témoin, souvent peu approprié pour les comparaisons avec le sédiment testé (sédiment reconstitué ou amont de station à tester). En effet, les sédiments contrôles ne sont jamais identiques au plan géochimique, sauf dans les approches par dopage, où lôon dispose dôun témoin non contaminé et dôune gamme de concentrations, permettent dôavoir une condition contrôle géochimiquement comparable aux conditions contaminées.

Côest sur ce point que notre approche se différencie de celles disponibles dans la littérature, souvent utilisant un sédiment contrôle prélevé sur un site proche moins contaminé (souvent en type amont), ou sédiment reconstitué et parfois les deux :

Tuikka et al. (2011) ont utilisé une méthode graduée sur leur batterie dôorganismes (*Lumbricus variegatus*, *Caenorhabditis elegans*, *Potamopyrgus antipodarum*, *Chironomus riparius*, *Danio rerio* et *Vibrio fischeri*), en définissant dans un premier temps, les réponses sur la référence du site, puis, dans un second temps, en conditions contaminées. Cette méthode ne prend pas en compte la variabilité de réponse liée aux facteurs géochimiques et donc est moins pertinente que notre approche. En effet, les auteurs soulignent le fait que leurs références ne sont pas géochimiquement comparables que les sédiments contaminés, ce qui limite la pertinence des comparaisons référence / contaminé. Cependant, les réponses biologiques observées par Tuikka et al. (2011), sur les sédiments naturels ont également été rapportées à un témoin obtenu sur un sédiment reconstitué toujours identique. Lôajout de ce témoin reconstitué, facilement reproductible, entre séries dôexpérimentations et entre laboratoires, permet de transformer les données acquises sur les sédiments contaminés en pourcentages du contrôle et présente donc lôavantage de rendre leur méthode généralisable à grande échelle.

Dans notre cas, selon lôorganisme et le trait considéré, la variabilité biologique naturelle est telle que la gamme de réponse en conditions de référence est extrêmement large. Cêest le cas chez *P. antipodarum*, espèce pour laquelle la variabilité biologique de certains traits de vie (en particulier la reproduction) est encore mal connue et peu maitrisée. Chez cet organisme, lôajout dôun sédiment témoin de type reconstitué, comme utilisé pourrait consister un réel avantage en tant que contrôle biologique de lôétat physiologique des populations exposées. Dans ce type de situation (grande variabilité biologique des traits de vie), il serait très intéressant de tester le sédiment témoin reconstitué proposé par Tuikka et al. (2011), sur les traits biologiques de nos espèces, et de replacer les réponses obtenues dans la gamme définie.
En revanche, chez *G. fossarum*, chez qui la variabilité de réponse au cours du cycle de vie est mieux connue, ce type dôapproche ne présente que peu dôavantages. Les réponses obtenues entre laboratoires peuvent être comparées sans sédiment témoin.

II Intégration dans une démarche d'évaluation du danger

Nous avons développé des outils écotoxicologiques adaptés à l'évaluation du risque associé aux sédiments contaminés. D'autres outils sont cependant disponibles, avec chacun des avantages et des inconvénients.

Nous avons déjà souligné la complémentarité des approches biologiques et chimiques. Ce constat va dans le sens du concept dit « triade » (Grapentine et al., 2002; E.C. et OME, 2007) qui a inspiré de nombreuses démarches d'évaluation de la qualité des sédiments. La démarche triade combine des analyses chimiques, écotoxicologiques et des observations *in situ* des communautés de macroinvertébrés benthiques. Elle a depuis longtemps été proposée comme méthodologie d'évaluation des risques associés aux sédiments contaminés (Long et Chapman, 1985; Chapman, 1996). Si nous avons déjà mis en évidence la complémentarité des approches chimiques et écotoxicologiques, l'intérêt de les compléter par des observations du benthos *in situ* semble évident puisque tout test de laboratoire aussi bien construit soit-il ne pourra jamais refléter la réalité du terrain dans toute sa complexité (Vignati et al., 2007). De plus, le sédiment utilisé en laboratoire est largement modifié par rapport au sédiment d'origine (ex : modification de la stratification naturelle). Les manipulations du sédiment (prélèvement, tamisage, homogénéisationé) et son stockage, peuvent altérer les concentrations en contaminants, leur biodisponibilité, et leurs caractéristiques chimiques et biologiques (Kemble et al., 1994).

Les échelles d'intégration sont différentes entre les biotests que nous avons développés (observation des réponses à l'échelle des individus) et des observations des communautés *in situ* recommandées dans les approches triadiques. Ainsi la combinaison de tests écotoxicologiques à des observations directes des effets de contaminations sur les communautés autochtones sont intéressantes. Ces deux niveaux d'observation combinés constituent un bon compromis entre pertinence écologique et compréhension mécanistique des effets des contaminants (Figure VI-1).

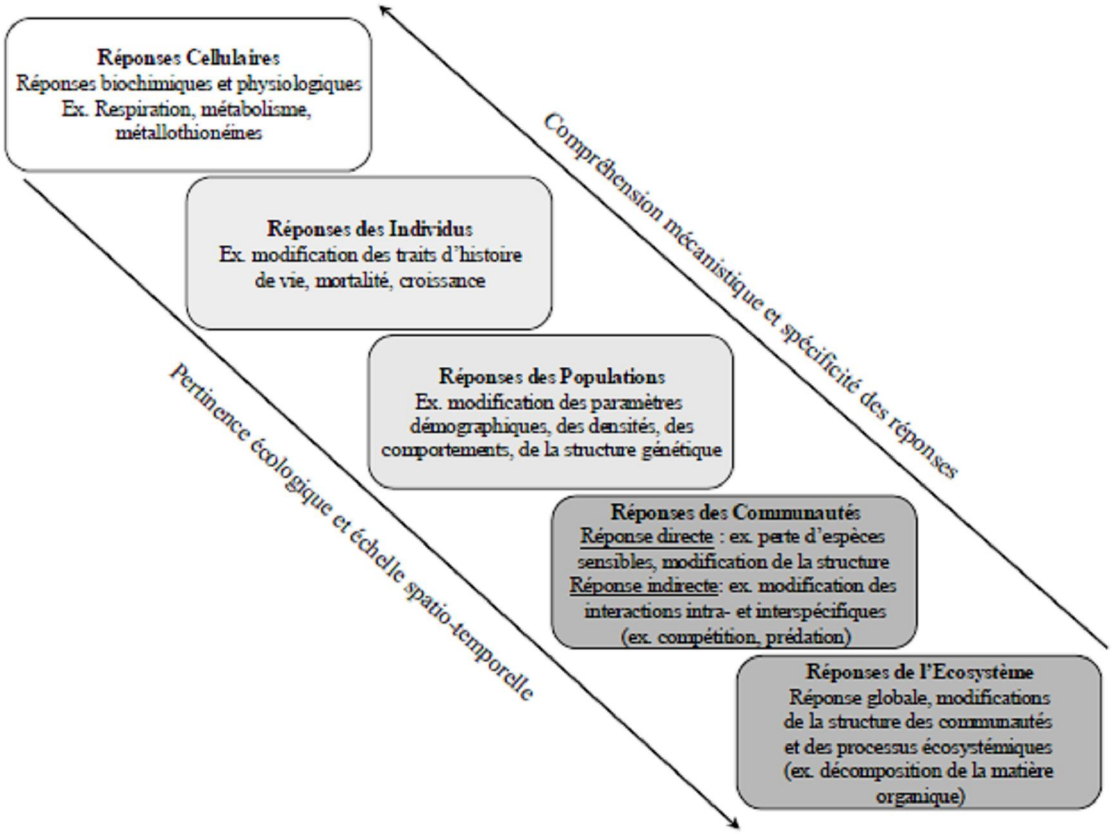


Figure VI-1 : Effet des contaminants à travers les différents niveaux d'organisation biologique (Colas, 2012).

Si nous avons choisi de nous intéresser à une échelle d'observation au niveau de l'individu, d'autres approches ont été proposées allant de l'étude de marqueurs à l'échelle infra-individuelle à l'étude des communautés dans leur ensemble. Bettinetti et al. (2012) ont passé en revue les avantages et inconvénients majeurs des principales méthodes disponibles, à plusieurs échelles d'observation, utilisant des macroinvertébrés pour la surveillance de la qualité des sédiments de lacs. D'une manière générale, plus la pertinence écologique de l'échelle d'observation est forte, moins elle permet de comprendre les mécanismes d'action des contaminants. L'utilité des tests à ces différentes échelles varie selon l'objectif visé. Ainsi dans un objectif de compréhension mécanistique d'action d'un contaminant, des tests utilisant d'une batterie biomarqueurs à une échelle sub-individuelle seront les plus appropriés (Kemble et al., 1994). Tandis que pour un objectif d'évaluation d'impact d'une contamination à long terme et à l'échelle d'un écosystème, l'étude des communautés et l'utilisation de méthodes telles que la modélisation devront être privilégiées.

La pertinence écologique de lôutilisation des biomarqueurs est fondamentale car elle permet de faire le lien entre les échelles dôobservations (sub) individuelle et populationnelle. Ce travail de changement dôéchelle est difficile mais important et passe souvent par le développement de modèles.

En ce qui nous concerne, lôobjectif était le développement de tests permettant un screening rapide de la toxicité des sédiments et de permettre de les classer en fonction de leur toxicité afin de prioriser les actions à mener sur les sites de prélèvement. Ainsi des tests de laboratoire, de courte durée sont les plus pertinents. Le choix dôune échelle dôobservation individuelle basée sur des traits de vie dôimportance écologique (tels que la reproduction), permet de conserver une pertinence écologique minimum.

Au final, quel que soit la ou les méthode(s) employée(s) (chimie et / ou biologie) et lôéchelle dôobservation (individu / communautéé), Flück et al. (2012) ont relevé un manque global dôuniformisation des méthodes en Europe, et même à lôéchelle dôun même pays (exemple de la Suisse). Il serait intéressant dôenvisager lôutilisation dôune même méthode à large échelle. Cependant, si lôon souhaite utiliser des espèces locales pour les tests écotoxicologiques, lôutilisation de chaque espèce sera géographiquement limitée à sa zone de répartition. Afin de rendre les tests généralisables à grande échelle, lôajout dôun sédiment témoin identique chez tous devient incontournable. Dans ce contexte, il serait intéressant de tester le sédiment contrôle utilisé dans lôétude de Tuikka et al. (2011) sur les tests développés.

III Conclusions

Lôobjectif de ce travail était de développer une batterie de mesures biologiques pour lôévaluation du danger associé aux sédiments contaminés.

Les moyens mis en î uvre et les conclusions tirées à chaque étape sont synthétisées dans le Tableau VI-4.

	Moyens mis en î uvre	**Principaux résultats**	**Conclusions**
Définition des référentiels de réponse	- Sélection de 8 sédiments pas ou peu contaminés (références) - Exposition de 3 espèces avec 18 critères mesurés aux 8 sédiments de référence	- Définition des référentiels de réponse pour chaque espèce et chaque trait	- Les réponses de certains traits sont extrêmement variables et non exploitables dans notre approche en lôétat (ex : reproduction de *P. antipodarum*), nécessitent des optimisations de protocoles - Un grand nombre de traits présentent un bon potentiel pour la détection dôeffets de contamination des sédiments (ex : vitesse de développement des larves *C. riparius* ; taux dôalimentation de *G. fossarum* é)
Confrontation à des sédiments contaminés	- Sélection de 11 sédiments naturellement contaminés - Dopage dôun sédiment de référence avec 5 concentrations de Cd - Exposition de 3 espèces avec 18 critères mesurés à (i) 9 sédiments naturellement contaminés (11 pour *C. riparius*) (ii) aux sédiments dopés	- Validation des tests les plus sensibles - définition dôune batterie réduite - Sélection des tests à recommander en fonction de lôobjectif	- Pour un screening rapide de toxicité avec un test rapide recommandation dôune mesure sur *G. fossarum* (taux dôalimentation ; de nombre dôovocytes par femelle ou de taux de survie des juvéniles) - Pour une étude plus approfondie recommandation de la batterie réduite

Tableau VI-1 : Synthèse des travaux de thèse, moyens mis en î uvre, résultats et conclusions

IV Perspectives

Les travaux conduits dans cette étude ouvrent à des perspectives à plus ou moins long terme.

*** A court terme, améliorations méthodologiques de la batterie :**

- Certains des tests que nous avons mis en place peuvent sans doute être optimisés par des modifications de protocoles (augmentation du nombre de réplicats testés ; maîtrise de la sélection des individus de testé)
- Il serait intéressant d'exposer les trois espèces à des sédiments supplémentaires (i) de référence afin de rendre les référentiels de réponses plus robustes et (ii) à d'autres typologies de contaminations afin de mieux cerner la sensibilité des tests et leur capacité à discriminer une contamination (par exemple forte concentration en micropolluants organiques).
- Si les tests développés sont destinés à être utilisés dans d'autres laboratoires, il est nécessaire d'évaluer les variabilités expérimentales inter-laboratoires et inter-populations afin de vérifier la possibilité de généraliser ces tests.

*** Perspectives d'usage de la batterie :**

- L'adaptation des tests *in situ* permettrait d'intégrer les variations biotiques et abiotiques naturelles et sans modification majeures du sédiment (tamisage, homogénéisation). L'information acquise ainsi serait plus pertinente écologiquement (Sibley et al., 1999).
- L'exposition d'autres espèces aux sédiments peut également être envisagée afin d'augmenter la représentativité biologique de la batterie vis-à-vis de la diversité des écosystèmes. Il peut s'agir de tests complémentaires à ceux déjà mis en î uvre (certains microbiotests[5] sur bactéries) ou visant à remplacer les espèces dont les réponses telles qu'observées actuellement sont trop variables pour être exploitées en l'état (mesure de reproduction du mollusque).

[5] Dans le cadre du projet DIESE, des microbiotests ont été développés mais en suivant une approche différence, sans a priori dans le classement des sédiments testés Burga Pérez K. F., Charlatchka R., Sahli L. et Férard J. F. (2012). New methodological improvements in the Microtox® solid phase assay. *Chemosphere* 86(1): 105-110..

Bibliographie

AFNOR. (2000). Caractérisation des boues Dosage des hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP) et des polychlorobiphéniles (PCB). In: Norme expérimentale XP X 33-012.

AFNOR. (2002). Projet de norme "Qualité de l'eau - Détermination de la toxicité des sédiments d'eau vis-à-vis de *Hyalella azteca* - Partie 1 : sédiments naturels".

AFNOR. (2010). Qualité de l'eau - Détermination de la toxicité des sédiments d'eau douce vis-à-vis de *Chironomus riparius* - Partie 1 : Sédiments naturels norme expérimentale XP T90-339-1.

Ahlf W., Hollert H., Neumann-Hensel H. et Ricking M. (2002). A guidance for the assessment and evaluation of sediment quality a German Approach based on ecotoxicological and chemical measurements. *Journal of Soils and Sediments* 2: 37-42.

Akerblom N. et Goedkoop W. (2003). Stable isotopes and fatty acids reveal that *Chironomus riparius* feeds selectively on added food in standardized toxicity tests. *Environmental Toxicology And Chemistry* 22(7): 1473-1480.

Allen H. E., FU G. et Deng B. (1993). Analysis of acid-volatile sulfide (AVS) and simultaneously extracted metals (SEM) for the estimation of potential toxicity in aquatic sediments. *Environmental Toxicology and Chemistry* 12: 1441-1453.

Alonso A. et Castro-Diez P. (2008). What explains the invading success of the aquatic mud snail *Potamopyrgus antipodarum* (Hydrobiidae, Mollusca)? *Hydrobiologia* 614(1): 107-116.

Alonso A., De Lange H. J. et Peeters E. T. H. M. (2009). Development of a feeding behavioural bioassay using the freshwater amphipod *Gammarus pulex* and the Multispecies Freshwater Biomonitor. *Chemosphere* 75: 341-346.

Antunes S. C., de Figueiredo D. R., Marques S. M., Castro B. B., Pereira R. et Goncalves F. (2007). Evaluation of water column and sediment toxicity from an abandoned uranium mine using a battery of bioassays. *Science of the Total Environment* 374(2-3): 252.

Apitz A. (2012). Conceptualizing the role of sediment in sustaining ecosystem servives: Sediment-ecosystem regional assessment (SEcoRA). *Science of the Total Environment* 415: 9-30.

Asare D. K., Sitze D. O., Monger C. H. et Sammis T. W. (2000). Impact of irrigation scheduling practices on pesticide leaching at a regional level. *Agricultural Water Management* 43: 311-325.

Ashauer R., Caravatti I., Hintermeister A. et Escher B. I. (2010). Bioaccumulation kinetics of organic xenobiotic pollutants in the freshwater invertebrate *Gammarus pulex* modeled with prediction intervals. . *Environmental Toxicology and Chemistry* 29(7): 1625-1636.

ASTM. (1991). Annual Book of ASTM Standards - Pesticides, Resource Recovery, Hazardous Substances and Oil Spill Responses, Waste Disposal, Biological Effects - Standard Guide for Conducting Sediment Toxicity Tests with Freshwater Invertebrates E1383-90. Philadelphie, PA.

ASTM. (1995). Annual Book of ASTM Standards - Pesticides, Resource Recovery, Hazardous Substances and Oil Spill Responses, Waste Disposal, Biological Effects - Standards Test Methods for Measuring the Toxicity of Sediment-associated Contaminants with Freshwater Invertebrates - E1706-95. Philadelphie, PA.

ASTM. (2002). Standard test method for measuring the toxicity of sediment-associated contaminants with freshwater invertebrates E 1706-04.

ASTM. (2003). Standard guide for collection, characterization, and manipulation of sediments for toxicological testing and for selection of samplers used to collect benthic invertebrates. E 1391 - 03. Philadelphia, PA, USA:American Society for Testing and Materials.

ASTM. (2005). Standard Test Method for Mesuring the Toxicity of Sediment-Associated Contaminants with Freshwater Invertebrates. E 1706-05.

Audry S. (2003). Bilan géochimique du transport des éléments traces métalliques dans le système fluvial anthropisé Lot-Garonne-Gironde: *Université Bordeaux 1*.

Babut M. et Perrodin Y. (2001). Evaluation écotoxicologique de sédiments contaminés ou de matériaux de dragage (I) Présentation et justification de la démarche.

Baker J. H. et Bradnam L. A. (1976). The role of bacteria in the Nutrition of Aquatic Detritivores. *Oecologia* 24: 95-104.

Banta G. T. et Andersen O. (2003). Bioturbation and the fate sediment pollutants. Experimental case studies of selected infauna species. . *Vie Milieu* 53: 233-248.

Barnard J. L. et Barnard C. M. (1983). Freshwater Amphipod of the world- I. Evolutionary patterns. *Hayfield associates ed*. Virginia.

Benoit D. A., Sibley P. K., Juenemann J. L. et Ankley G. T. (1997). *Chironomus tentans* life-cycle test: design and evaluation for use in assessing toxicity of contaminated sediments. *Environmental Toxicology and Chemistry* 16: 1165-1176.

Bervoets L., Meregalli G., De Cooman W., Goddeeris B. et Blust R. (2004). Caged midge larvae (*Chironomus riparius*) for the assessment of metal bioaccumulation from sediments in situ. *Environmental Toxicology And Chemistry* 23: 443-454.

Bettinetti R., Ponti B., Marziali L. et Rossaro B. (2012). Biomonitoring of lake sediments using benthic macroinvertebrates. *Trends in Analytical Chemistry* 36: 92-102.

Bilotta G. S. et Brazier R. E. (2008). Understanding the influence of suspended solids on water quality and aquatic biota. *Water Research* 42: 2849-2861.

Blanchet-Tournier M. F. (1980). Mue et vitellogénèse chez le crustacé amphipode *Orchestia gammarellus* (PALLAS) : Contrôles endocrines et interactions. : *Université Pierre et Marie Curie, Paris, France*.

Blockwell S. J., Taylor E. J., Jones I. et Pascoe D. (1998). The Influence of FreshWater Pollutants and Interaction with *Asellus aquaticus* (L.) on the Feeding Activity of *Gammarus pulex* (L.). *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 34: 41-47.

Bollache L. et Cezilly F. (2004). State-dependent pairing behaviour in male Gammarus pulex (L.) (Crustacea, Amphipoda): Effects of time left to moult and prior pairing status. . *Behavioural Processes* 66(2): 131-137.

Bonnet C. (2000). Développement de bioessais sur sédiments et applications à l'étude, en laboratoire, de la toxicité des sédiments dulçaquicoles contaminés:Thèse, *Université Paul Verlaine, Metz*.

Bourg A. C. M. et Loch J. P. G. (1995). Mobilization of heavy metals as affected by pH and redox conditions. In: Biogenodynamics of pollutants in soils and sediments, (W. Salomons etW. M. Stigliani, eds). Berlin, DEU, 87-102.

Broekhuizen N., Parkyn S. et Miller D. (2001). Fine sediment effects on feeding and growth in the invertebrate grazers *Potamopyrgus antipodarum* (Gastropoda, Hydribiidae) and *Deleatidium sp.* (Ephemeroptera, Leptophlebiidae). *Hydrobiologia* 457: 125-132.

Brownawell B. J. et Farrington J. W. (1986). Biogeochemistry of PCBs in interstitial waters of a coastal marine sediment. *Geochimica et Cosmochimica Acta* 50(1): 157-169.

Bundschuh M., Hahn T., Gessner M. O. et Schulz R. (2009). Antibiotics as a chemical stressor affecting an aquatic decomposer-detritivore system. *Environmental Toxicology And Chemistry* 28(1): 197-203.

Burga Pérez K. F., Charlatchka R., Sahli L. et Férard J. F. (2012). New methodological improvements in the Microtox® solid phase assay. *Chemosphere* 86(1): 105-110.

Burton J. G. A. (2002). Sediment quality criteria in use around the world. *Limnology and Oceanography* 3(2): 65-76.

Cairns J., Bidwell J. R. et Arnegard M. E. (1996). Toxicity testing with communities. Microcosms, mesocosms, and whole-system manipulations. *Reviews on Environmental Contamination and Toxicology* 147: 45-69.

Cairns M. A., Nebeker A. V., Gakstater J. H. et Griffis W. L. (1984). Toxicity of copper-spiked sediments to freshwater invertebrates. *Environmental Toxicology and Chemistry* 3: 435-445.

Calow P. (1978). The evolution of life-cycles strategies in freshwater gastropods. *Malacologia* 17(2): 351-364.

Campbell P. G. C. (1995). Interactions between trace metals and organisms. A critique of the free-ion activity model. In: Metal speciation and bioavailability in aquatic systems, Vol. 3, (A. Teissier etD. R. Turner, eds). Oxford, GBR:IUPAC Series and Analytical and Physical Chemistry of Environmental Systems, 45-102.

Campy M. et Meybeck M. (1995). Les sédiments lacustres. In: Limnologie générale, (R. Pourriot etM. Meybeck, eds). Paris, FRA:Masson, 185-226.

Casiot C., Egal M., Elbaz-Poulichet F., Bruneel O., Bancon-Montigny C., Cordier M. A., Gomez E. et Aliaume C. (2009). Hydrological and geochemical control of metals and arsenic in a Mediterranean river contaminated by acid mine drainage (the Amous River, France); preliminary assessment of impacts on fish (*Leuciscus cephalus*). *Applied Geochemistry* 24(787-799).

Chapman P. M. (1992). Current approaches to developing sediment quality criteria. . *Environmental Toxicology And Chemistry* 8.

Chapman P. M. (1996). Presentation and interpretation of sediment quality triad data. *Ecotoxicology* 5: 327-339.

Chapman P. M., Dexter R. N. et Long E. R. (1987). Synoptic measures of sediment contamination, toxicity and infaunal community composition (the sediment quality trid) in San Francisco Bay. *Marine Ecology -Progress Series* 37: 75-96.

Chapman P. M., Wang F., Janssen C., Persoone G. et Allen H. E. (1998). Ecotoxicology of metals in aquatic sediments: binding and release, bioavailability, risk assessment, and remediation. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 55: 2221-2243.

Charles S., Ferreol M., Chaumot A. et Péry A. R. R. (2004). Food availability effect on population dynamics of the midge *Chironomus riparius*: a Leslie modeling approach. *Ecological Modelling* 175: 217-229.

Chevreux E. et Fage L., eds. (1970). Faune de France, Tome 9 : Amphipodes. Nendeln/Liechtenstein.

Chiou C. T., Freed V. H., Schmeddling D. W. et Kohnert R. L. (1977). Partition coefficient and bioaccumulation of selected organic chemicals. *Environmental Science and Technology* 11(5): 475-478.

Ciarelli S. et Van Straalen N. M. (2000). Influence of bioturbation by the amphipod *Corophium volutator* on fluoranthene uptake in the marine polychaete *Nereis virens*. *Environmental Toxicology And Chemistry* 19(6): 1575-1581.

Ciarelli S., Van Straalen N. M., Klap V. A. et Van Wezel A. P. (1999). Effects of sediment bioturbation by the estuarine amphipod *Corophium volutator* on fluoranthene

resuspension and transfer into the mussel (*Mytilus edulis*). *Environmental Toxicology And Chemistry* 18(2): 318-328.

Ciutat A. et Boudou A. (2003). Bioturbation effects on cadmium and zinc transfers from a contaminated sediment and on metal bioavailability to benthic bivalves. *Environmental Toxicology And Chemistry* 22(7): 1574-1581.

Colas F. (2012). Outils de diagnose structurelle et fonctionnelle pour la bioévaluation de la qualité des sédiments associés à la présence de barrages. Approche intégrée de la population au processus écosystémique. Thèse, Metz: *Université de Lorraine*.

Cold A. et Forbes V. E. (2004). Consequences of a short pulse of pesticide exposure for survival and reproduction of *Gammarus pulex*. *Aquatic Toxicology* 67(3): 287-299.

Costa F. O., Neuparth T., Correia A. D. et Costa M. H. (2005). Multi-level assessment of chronic toxicity of estuarine sediments with the amphipod *Gammarus locusta*: II. Organism and population-level endpoints. *Marine Environmental Research* 60: 93-110.

Coulaud R., Geffard O., Xuereb B., Lacaze E., Quéau H., Garric J., Charles S. et Chaumot A. (2011). In situ feeding assay with Gammarus fossarum (Crustacea): Modelling the influence of confounding factors to improve water quality biomonitoring. *Water Research* 45: 6417-6429.

Coulthard T. J. et Macklin M. G. (2003). Modeling long-term contamination in river systems from historical metal mining. . *Geology* 31: 451-454.

Crane M., Sildanchandra W., Kheir R. et Callaghan A. (2002). Relashionship between biomarker activity and developmental endpoints in *Chironomus riparius* Meigen exposed to an organophosphate insecticide. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 53: 361-369.

Credland P. F. (1973). The Taxonomic Status of *Chironomus riparius* Meigen and *Chironomus thummi* Kieffer (Diptera: Chironomidae). *Journal of Natural History* 7: 209-216.

CTGREF. (1980). Etude des sédiments - Méthodes de prélèvement et d'analyses pratiquées au laboratoire de sédimentologie.Ministère de l'Agriculture, centre technique du génie rural des eaux et des forêts_ rapport interne.

Curry L. (1962). A study of the Ecology and Taxonomy of Freshwater Midges (Diptera Tendipedidae) of Michigan with Special Reference to Their Role in the "Turnover" of Radioactive substances in the Hydrosol. *Rapport 2, Atomic Energy Commission and National Institutes of Health, Central Michigan University, Depatment of Biology, Mount Pleasant, MI*: 103-149.

Dabrin A., Durand C. L., Garric J., Geffard O., Ferrari B. J. D. et Coquery M. (2012). Coupling geochemical and biological approaches to assess the availability of cadmium in freshwater sediment. *Science of the Total Environment* 424: 308-315.

Dangles O. J. et Guérold F. A. (2000). Structural and functional responses of benthic macroinvertebrates to acid precipitation in two forested headwater streams (Vosges Mountains, northeastern France). *Hydrobiologia* 418(1-3): 25-31.

Davies-Colley R. J., Hickey C. W., Quinn M. J. et Ryan P. A. (1992). Effects of clay discharges on streams. Optical properties and ephilithon. *Hydrobiologia* 248: 215-234.

Davies-Colley R. J. et Smith D. G. (2001). Turbidity suspended sediment, and water clarity: a review. . *Journal of the American Water Resources Association* 37: 1085-1101.

Day K. E., Kirby R. S. et Reynoldson T. B. (1994). Sexual dimorphism in *Chironomus riparius* (Meigen): impact on interpretation of growth in whole-sediment toxicity tests. *Environmental Toxicology and Chemistry* 13: 35-39.

De Lange H. J., De Haas E. M., Maas H. et Peeters E. T. H. M. (2005). Contaminated sediments and bioassay responses of three macroinvertebrates, the midge larva

Chironomus riparius, the water louse *Asellus aquaticus* and the mayfly nymph *Ephoron virgo*. *Chemosphere* 61: 1700-1709.

De Lange H. J., Sperber V. et Peeters E. T. H. M. (2006). Avoidance of polycyclic aromatic hydrocarbon-contaminated sediments by the freshwater invertebrates *Gammarus pulex* and *Asellus aquaticus*. *Environmental Toxicology and Chemistry* 25(2): 452-457.

Dedourge-Geffard O., Palais F., Biagianti-Risbourg S., Geffard O. et Geffard A. (2009). Effects of metals on feeding rate and digestive enzymes in *Gammarus fossarum* : An *in situ* experiment. *Chemosphere* 77: 1569-1576.

Depledge M. H. et Galloway T. S. (2005). Healthy animals, healthy ecosystems. *Frontiers in Ecology and the Environment* 3(5): 251-258.

Desrosiers M., Babut M. P., Pelletier M., Bélanger C., Thibodeau S. et Martel L. (2010). Efficiency of Sediment Quality Guidelines for Predicting Toxicity: The Case of the St. Lawrence River. *Integrated Environmental Assessment and Management* 6(2): 225-239.

Di Toro D. M., Mahony J. D., Hansen D. J., Hicks B., Redmond M. S., Scott K. J. et Mayr S. M. (1990). Toxicity of cadmium in sediments: the role of acid volatile sulfide. *Environmental Toxicology And Chemistry* 9: 1487-1502.

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. et Paquin P. R. (1991). Technical basis for establishing sediment quality criteria for nonionic organic chemicals using equilibrium partitioning. *Environmental Toxicology and Chemistry* 10: 1541-1583.

Dorgelo J. (1987). Density fluctuations in populations (1982-1986) and biological observations of *Potamopyrgus jenkinsi* in two trophically differing lakes. *Hydrobiological Bulletin* 21(1): 95-110.

Dorgelo J. (1988). Growth in a freshwater snail under laboratory conditions in relation to eutrophication. *Hydrobiologia* 157: 125-127.

Dorgelo J. et Leonards P. E. G. (2001). Relationship between C/N ratio of food types and growth rate in the snail *Potamopyrgus jenkinsi* (E.A. Smith). *Journal of the North American Benthological Society* 20: 60-67.

Dorgelo J., Meester H. et Van Velzen C. (1995). Effects of diet and heavy metals on growth rate and fertility in the deposit-feeding snail *Potamopyrgus jenkinsi* (Smith) (Gastropoda: Hydrobiidae). *Hydrobiologia* 316(3): 199.

Downe A. E. R. (1973). Some factors influencing insemination in laboratory swarms of *Chironomus riparius* (Diptera: Chironomidae). *The Canadian Entomologist* 105: 291-298.

Ducrot V. (2005). Compréhension et modélisation des relations entre les caractéristiques biologiques et écologiques et la sensibilité aux contaminants des communautés d'invertébrés benthiques : perspectives pour l'évaluation des effets des substances chimiques.: Thèse, *Paul Verlaine, Metz*.

Ducrot V., Cognat C., Mons R., Mouthon J. et Garric J. (2006). Development of rearing and testing protocols for a new freshwater sediment test species: The gastropod *Valvata piscinalis*. *Chemosphere* 62: 1272-1281.

Duft M., Schmitt C., Bachmann J., Brandelik C., Schulte-Oehlmann U. et Oehlmann J. (2007). Prosobranch snails as test organisms for the assessment of endocrine active chemicalsï ï an overview and a guideline proposal for a reproduction test with the freshwater mudsnail *Potamopyrgus antipodarum* *Ecotoxicology* 16: 169-182.

Duft M., Schulte-Oehlmann U., Tillmann M., Markert B. et Oehlmann J. (2003). Toxicity of triphenyltin and tributyltin to the freshwater mudsnail *Potamopyrgus antipodarum* in a new sediment biotest. *Environmental Toxicology and Chemistry* 22(1): 145-152.

Duft M., Schulte-Oehlmann U., Weltje L., Tillmann M. et Oehlmann J. (2003). Stimulated embryo production as a parameter of estrogenic exposure via sediments in the freshwater mudsnail *Potamopyrgus antipodarum*. *Aquatic Toxicology* 64(4): 437.

E.C. et OME. (2007). Canada-Ontario Decision-Making Framework for Assessment of Great Lakes Contaminated Sediment.:Environnement Canada, Ontario Ministry of the Environment, Toronto.

Environmental Protection Agency U. S. (1998). METHOD 7473 - Mercury in solids and solutions by thermal decomposition, amalgamation, and atomic absorption spectrophotometry.

Environmental Protection Agency U. S. (2000). Methods for measuring the toxicity and bioaccumulation of sediment-associated contaminants with freshwater invertebrates EPA 600/R-99/064. second edition.

EPA (2001). Methods for Assessing the Chronic Toxicity of Marine and Estuarine Sediment-associated Contaminants with the Amphipod *Leptocheirus plumulosus*ð First Edition. EPA/600/R-01/020. Washington, D.C.

EPA. (2000). Methods for measuring the toxicity and bioaccumulation of sediment-associated contaminants with freshwater invertebrates EPA 600/R-99/064. second edition.

Estebe A., Thevenot D. R., Boudries H. et Mouchel J. M. (1997). Urban runoff impacts on particulate metal and hydrocarbon concentrations in river Seine: Suspended solid and sediment transport. . *Water Science and Technology* 36: 185-193.

European Community. (2000). Directive 2000/60/EC of the European Parliament and the council of 23 October 2000 establishing a framework for Community action in the field of water policy. *Official Journal of the European Community* 327: 1-73.

Faria M. S., Nogueira A. J. A. et Soares A. M. V. M. (2007). The use of *Chironomus riparius* larvae to assess effects of pesticides from rice fields in adjacent freshwater ecosystems. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 67: 218-226.

Faria M. S., Ré A., Malcato J., Silva P. C. L. D., Pestana J., Agra A. R., Nogueira A. J. A. et Soares A. M. V. M. (2006). Biological and functional responses of in situ bioassays with *Chironomus riparius* larvae to assess river water quality and contamination. *Science of the Total Environment* 371: 125-137.

Felten V. (2003). Effets de lôacidification des ruisseaux vosgiens sur la biologie, lôécologie et lôécophysiologie de *Gammarus fossarum* Koch, 1835 (Crustacea Amphipoda) : Approche intégrée à différents niveaux dôorganisation: Thèse, *Université Paul Verlaine, Metz*.

Fialkowski W., Fialkowska E., Smith B. D. et Rainbow P. S. (2003). Biomonitoring survey of trace metal pollution in streams of a catchment draining a zinc and lead mining area of Upper Silesia, Poland using the amphipod *Gammarus fossarum*. *International Review of Hydrobiology* 88(2): 187-200.

Flück R., Campiche S., De Alencastro L. P., Ferrari B. J. D., Rossi L., Santiago S., Werner I. et Chèvre N. (2012). Surveillance de ma qualité des sédiments en Suisse. Etat actuel des méthodes disponibles et mise en place de recommandations. *Aqua & Gas* 4: 18-22.

Ford A. T., Fernandes T. F., Rider S. A., Read P. A., Robinson C. D. et Davies I. M. (2003). Measuring sublethal impacts of pollution on reproductive output of marine Crustacea. *Marine Ecology Progress Series* 265: 303-309.

Forrow D. M. et Maltby L. (2000). toward a mechanistic understanding of contaminant-induced changes in detritus processing in streams: Direct and indirect effects on detritivore feeding. *Environmental Toxicology and Chemistry* 19(8): 2100-2106.

Forster S. (1996). Spatial and temporal distribution of oxidation events occurring below the sediment-water interface. *Marine Ecology* 17(1-3): 309-319.

Förstner U. (1989). Contaminated sediments. Berlin, DEU: Springer-Verlag.

Förstner U. (1990). Inorganic sediment chemistry and elemental speciation. In: Sediments: chemistry and toxicity of in-place pollutants, (R. Baudo, J. P. Giesy etH. Muntau, eds). Chelsea, MI, USA:Lewis Publishers, 61-105.

Förstner U. et Salomons W. (2010). Sediment research, management and policy. *Journal of Soils and Sediments* 10: 1440-1452.

Förstner U. et Wittmann G. T. W. (1979). Metal pollution in the aquatic environment. (Springer-Verlag, ed). New-York, 475.

Fretter V. et Graham A. (1994). British Prosobranch molluscs. Their fonctional anatomy and ecology. London: Ray Society.

Gale S. A., King C. K. et Hyne R. V. (2006). Chronic sublethal sediment toxicity testing using the estuarine amphipod, *Melita plumulosa* (Zeidler): Evaluation using metal-spiked and field-contaminated sediments. *Environmental Toxicology and Chemistry* 25(7): 1887-1898.

Galluba S. et Oehlmann J. (2012). Widespread endocrine activity in river sediments in Hesse, Germany, assessed by a combination of in vitro and in vivo bioassays. *Journal of Soils and Sediments* 12: 252ï 264.

Gangloff M. M. (1998). The new zealand mudsnail in western North America. *Aquatic Nuisance Species Digest* 2(3): 25-30.

Garric J. et Geffard O. (2007). Mise au point de biotests au laboratoire et in situ sur des espèces représentatives du milieu naturel: crustacé *Gammarus pulex*, mollusques gastéropodes (*Potamopyrgus antipodarum*, *Valvata piscinalis*)_ rapport interne, laboratoire d'écotoxicologie, Cemagref.

Gaskell P., Brooks N. A. C. et Maltby L. (2007). Variation in the bioaccumulation of a sediment-sorbed hydrophobic compound by benthic macroinvertebrates: Patterns and mechanisms. *Environmental Science and Technology* 41: 1783-1789.

Gauss J. D., Woods P. E., Winner R. W. et Skillings J. H. (1985). Acute toxicity of copper to three life stages of *Chironomus tentans* as affected by water hardness-alkalinity. *Environmental Pollution* 37: 149-157.

Geffard O. (2001). Toxicité potentielle des sédiments marins et estuariens contaminés : évaluation chimique et biologique, biodisponibilité des contaminants sédimentaires. Thèse, Bordeaux: *Bordeaux I*.

Geffard O., Xuereb B., Chaumot A., Geffard A., Biagianti S., Noël C., Abbaci K., Garric J., Charmantier G. et Charmantier-Daures M. (2010). Ovarian Cycle and Embryonic Development in *Gammarus fossarum*: Application for Reproductive toxicity Assessment. *Environmental Toxicology and Chemistry* 29: 2249-2259.

Gerard C., Blanc A. et Costil K. (2003). *Potamopyrgus antipodarum* (Mollusca : Hydrobiidae) in continental aquatic gastropod communities: impact of salinity and trematode parasitism. *Hydrobiologia* 493(1-3): 167-172.

Gerard C. et Dussart G. B. J. (2003). Invader and invaded - colonisation by, and of, Potamopyrgus antipodarum Gray (Mollusca, Hydrobiidae). *Slugs & Snails: Agricultural, Veterinary & Environmental Perspectives* 80: 281-286.

Gerard C. et Poullain V. (2005). Variation in the response of the invasive species *Potamopyrgus antipodarum* (Smith) to natural (cyanobacterial toxin) and anthropogenic (herbicide atrazine) stressors. *Environmental Pollution* 138(1): 28-33.

Gilbert F. (2003). Bioturbation et biogéochimie des sédiments marins côtiers: cycle de l'azote et devenir de la matière organique. Habilitation à Diriger des Recherches, Université de la Méditerranée.

Gillis P. L. et Wood C. M. (2008). The effect of extreme waterbone cadmium exposure on the internal concentrations of cadmium, calcium, and sodium in *Chironomus riparius* larvae. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 71: 56-64.

Goddeeris B. R., Vermeulen A. C., De Geest E., Jacobs H., Baert B. et Ollevier F. (2001). Diapause induction in the third and fourth instar of Chironomus riparius (Diptera) from belgian lowland brooks. *Archiv für Hydrobiologie* 150: 307-327.

Gower A. M. et Buckland P. J. (1978). Water Quality and the Occurence of *Chironomus riparius* Meigen (Diptera: Chironomidae) in a Stream Receiving Sewage Effluent. *Freshwater biology* 8: 153-164.

Grapentine L. C., Anderson J. J., Boyd D., Burton G. A., DeBarros C., Johnson G., Marvin C., Milani D., Painter S., Pascoe T., Reynoldson T. B., Richman L., Solomon K. et Chapman P. (2002). A decision making framework for sediment assessment developed for the Great Lakes. *Human and Ecological Risk Assessment* 8(7): 1641-1655.

Gray L. et Ward J. (1982). Effects of sediment releases from a reservoir on stream macroinvertebrates. . *Hydrobiologia* 96: 177-184.

Gross M. Y., Maycock D. S., Thorndyke M. C. et Crane M. (2001). Abnormalities in sexual development of the amphipod *Gammarus pulex* (L.) found below sewage treatment works. *Environmental Toxicology And Chemistry* 20(8): 1792-1797.

Gust M. (2010). Développement et faisabilité de marqueurs de la perturbation endocrinienne chez des gastéropodes d'eau douce : *Potamopyrgus antipodarum* et *Valvata piscinalis* - Application au laboratoire et au terrain. Thèse, Metz : *Université Paul Verlaine*.

Gust M., Buronfosse T., Geffard O., Coquery M., Mons R., Abbaci K., Giamberini L. et Garric J. (2011). Comprehensive biological effects of a complex field poly-metallic pollution gradient on the New Zealand mudsnail *Potamopyrgus antipodarum* (Gray). *Aquatic toxicology* 101: 100-108.

Gust M., Buronfosse T., Geffard O., Mons R., Quéau H., Mouthon J. et Garric J. (2010). In situ biomonitoring freshwater quality using new zealand mudsnail *Potamopyrgus antipodarum* (gray) exposed waste water treatment plant (wwtp) effluent discharges. *Water Research* 44(15): 4517-4528.

Gust M., Buronfosse T., Geffard O., Mons R., Quéau H., Mouthon J. et Garric J. (2011). In situ biomonitoring freshwater quality using new zealand mudsnail *Potamopyrgus antipodarum* (gray) exposed waste water treatment plant (wwtp) effluent discharges. W*ater Research* 44(15): 4517-4528.

Gust M., Buronfosse T., Giamberini L., Ramil M., Mons R. et Garric J. (2009). Effects of fluoxetine on the reproduction of two prosobranch mollusks: *Potamopyrgus antipodarum* and *Valvata piscinalis*. *Environmental Pollution*.

Gust M., Buronfosse T., Mons R., Andre C., Gagne F. et Garric J. (2011). Is exposure temperature a confounding factor for assessment of reproductive parameters of the New Zealand mudsnail *Potamopyrgus antipodarum*? *Aquatic Toxicology* 101(2): 396-404.

Gust M., Mouthon J., Quéau H., Dussart C., Buronfosse T. et Garric J. (2011). Natural variability and response interpretation of fecundity, vertebrate-like sex-steroid levels and energy status in the New Zealand mudsnail *Potamopyrgus antipodarum* (Gray). *General and Comparative Endocrinology* 172(2): 243-250.

Hakanson L. et Jansson M. (1983). Principles of lake sedimentology. Berlin, DEU: Springer-Verlag.

Haynes A., Taylor B. J. R. et Varley M. E. (1985). The influence of the mobility of *Potamopyrgus jenkinsi* (Smith, E. A.) (Prosobranchia: Hydrobiidae) on its spread. Stuttgart, Allemagne: Schweizerbart.

Heywood J. et Edwards R. W. (1962). Some Aspects of the Ecology of *Potamopyrgus jenkinsi* Smith. . *Journal of Animal Ecology* 31(2): 239-250.

Hirthe G., Fisher T. C., Crane M. et Callaghan A. (2001). Short-term exposure to sub-lethal doses of lindane affects developmental parameters in *Chironomus riparius* Meigen, but has no effect on larval glutathione-S-transferase activity. *Chemosphere* 44: 583-589.

Höss S., Ahlf W., Fahnenstich C., Gilberg D., Hollert H., Melbye K., Meller M., Hammers-Wirtz M., Heininger P., Neumann-Hensel H., Ottermanns R., Ratte H.-T., Seiler T.-B., Spira D., Weber J. et Feiler U. (2010). Variability of sediment-contact tests in freshwater sediments with low-level anthropogenic contamination - Determination of toxicity thresholds. *Environmental Pollution* 158: 2999-3010.

Hylleberg J. et Siegismund H. R. (1987). Niche overlap in mud snails (hydrobiidae): freezing tolerance. . *Marine Biology* 94(3): 403-407.

INERIS. (2005). Hexachlorobenzene. In: Fiche de données toxicologiques et environnementales des substances chimiques. http://www.ineris.fr/substances/fr/

INERIS. (2010). Qualité chimique des sédiments fluviaux en France. Synthèse des bases de données disponibles (INERIS-DRC-10-105335-04971A).

INERIS. (2011). Cadmium et ses dérivés. In: Fiche de données toxicologiques et environnementales des substances chimiques. http://www.ineris.fr/substances/fr/

INRA. (2006). Analyse du carbone, de l'hydrogène et de l'azote particulaire.INRA - UMR CARRTEL - Laboratoire d'analyse Physico-chimiques.

Islam M. S. et Tanaka M. (2004). Impacts of pollution on coastal and marine ecosystems including coastal and marine fisheries and approach for management: a review and synthesis. *Marine Pollution Bulletin* 48: 624-649.

ISO. (2005). NF EN 17294-2. Application de la spectrométrie de masse avec plasma à couplage inductif (ICP-MS); partie 2 : Dosage de 62 éléments. .

ISO. (2007). 15088. Qualité de l'eau - Détermination de la toxicité aiguë des eaux résiduaires vis-à-vis des oeufs de poisson-zèbre (*Danio rerio*).

ISO. (en cours de validation). DIS 16191. Water Quality Determination of the toxic effect of sediment on the growth behaviour of *Myriophyllum aquaticum* (draft).

Jacobsen R. et Forbes V. E. (1997). Clonal variation in life-history traits and feeding rates in the gastropod, *Potamopyrgus antipodarum*: Performance across a salinity gradient. *Functional Ecology* 11(2): 260-267.

Jain C. K. et Ram D. (1997). Adsorption of metal ions on bed sediments. *Hydrological Sciences Journal* 42(5): 713-723.

Jensen A. et Forbes E. (2001). Interclonal Variation in the Acute and Delayed Toxicity of Cadmium to the European Prosobranch Gastropod *Potamopyrgus antipodarum* (Gray). *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 40(2): 230.

Jensen A., Forbes V. E. et Davis Parker J. E. (2001). variation in cadmium uptake, feeding rate, and life-history effects in the gastropod Potamopyrgus antipodarum: linking toxicant effects on individuals to the population level. *Environmental Toxicology and Chemistry* 20(11): 2503-2513.

Jobling S., Casey D., Rodgers-Gray T., Oehlmann J., Shulte-Oehlmann U., Pawlowski S., Baunbeck T., Turner A. P. et Tyler C. R. (2004). Comparative responses of mollucs and fish to environmental estrogens and an estrogenic effluent. *Aquatic Toxicology* 66: 207 - 222.

Kaiser D., Sieratowicz A., Zielke H., Oetken M., Hollert H. et Oehlmann J. (2012). Ecotoxicological effect characterisation of widely used organic UV filters. *Environmental Pollution* 163: 84-90.

Karaman G. S. et Pinkster S. (1987). Freshwater Gammarus species from Europe, North Africa and adjacent regions of Asia (Crustacea-Amphipoda). Amsterdam, PAYS-BAS: Artis Library Committee.

Karickhoff S. W. (1984). Organic pollutant sorption in aquatic systems. *Journal of Hydraulic Engineering* 110(6): 707-735.

Karickhoff S. W., Brown D. S. et Scott T. A. (1979). Sorption of hydrophobic pollutants on natural sediments. *Water Research* 13: 241-248.

Keddy C., Greene J. C. et Bonnell M. A. (1995). Review of whole-organism bioassays: soil, freshwater sediment, and freshwater assessment in canada. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 30: 221-251.

Kemble N. E., Brumbaugh W. G., Brunson E. L., Dwyer F. J., Ingersoll C. G., Monda D. P. et Woodward D. F. (1994). Toxicity of metal-contaminated sediments from the upper Clark Fork River, Montana, to aquatic invertebrates and fish in laboratory exposures. *Environmental Toxicology and Chemistry* 13(12): 1985-1997.

Kerans B. L., Dybdahl M. F., Gangloff M. M. et Jannot J. E. (2005). *Potamopyrgus antipodarum*: Distribution, density, and effects on native macroinvertebrate assemblages in the Greater Yellowstone Ecosystem. *Journal of the North American Benthological Society* 24(1): 123-138.

Kondolf G. M. (1997). Hungry water: Effects of dams and gravel mining on river channels. *Environmental Management* 21(4): 533-551.

Kukkonen J. et Landrum P. F. (1996). Distribution of organic carbon and organic xenobiotics among different particle-size fractions in sediments. *Chemosphere* 32(6): 1063-1076.

Lacaze E., Geffard O., Goyet D., Bony S. et Devaux A. (2011). Linking genotoxic responses in *Gammarus fossarum* germ cells with reproduction impairment, using the Comet assay *Environmental Research* 111(5): 626-634.

Lake R. G. et Hinch S. G. (1999). Acute effects of suspended sediment angularity on juvenille Coho salmon. . *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 56: 862-867.

Landrum P. F. et Robbins J. A. (1990). Bioavailability of sediment associated contaminants to benthic invertebrates. In: Sediments: chemistry and toxicity of in-place pollutants, (R. Baudo, J. P. Giesy etH. Muntau, eds). Chelsea, MI, USA, 237-263.

Larsson P. (1985). Contaminated sediments of lakes and oceans act as sources of chlorinated hydrocarbons for release to water and atmosphere. . *Nature* 317: 347-349.

Lassen H. H. (1979). Reproductive effort in Danish Mudsnails (Hydrobiidae). *Oecologia* 40: 365-369.

Lau S. S. S. et Chu L. M. (1999). Contaminant release from sediments in a coastal wetland. W*ater Research* 33(4): 909-918.

Loizeau J. L., Arbouille D., Santiago S. et Vernet J. P. (1994). Evaluation of a wide range laser diffraction grain size analyser for use with sediments. *Sedimentology* 41: 353-361.

Long E. R. et Chapman P. M. (1985). A sediment quality triad-measures of sediment contamination, toxicity and infaunal community composition in Puget Sound. . *Marine Pollution Bulletin* 16: 405-415.

Long E. R., Mc Donald D. D., Smith S. L. et Calder F. D. (1995). Incidence of adverse biological effects within ranges of chemical concentrations in marine and estuarine sediments. *Environmental Management* 19(1): 81-97.

MacDonald D. D., Carr R. S., Calder F. D., Long E. R. et Ingersoll C. G. (1996). Development and evaluation of sediment quality guidelines for Florida coastal waters. *Ecotoxicology* 5: 253-278.

MacDonald D. D., Ingersoll C. G. et Berger T. A. (2000). Development and evaluation of Consensus-Based Sediment Quality Guidelines for Freshwater Ecosystems. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology* 39: 20-31.

Macneil C., Dick J. T. A. et Elwood R. W. (1997). The trophic ecology of freshwater Gammarus spp. (Crustacea: Amphipoda): Problems and perspectives concerning the

functional feeding group concept. . *Biological Reviews of the Cambridge Philosophical Society* 72(3): 349-364.

MacNeil C., Elwood R. W. et Dick J. T. A. (2000). Factors influencing the importance of Gammarus spp. (Crustacea: Amphipoda) in riverine salmonid diets. *Archiv für Hydrobiologie* 149(1): 87-107.

Mäenpää K. A., Sormunen A. J. et Kukkonen J. V. K. (2003). Bioaccumulation and toxicity of sediment associated herbicides (ioxynil, pendimethalin, and bentazone) in *Lumbricus variegatus* (Oligochaeta) and *Chironomus riparius* (Insecta). *Ecotoxicologie and Environmental Safety* 56: 398-410.

Malavoi J. R., Garnier C. C., Landon N., Recking A. et Baran P. (2011). Eléments de connaissance pour la gestion du transport solide en rivière, Comprendre pour agir. Paris:Onema.

Maltby L., Boxall A. B. A., Forrow D. M., Calow P. et Betton C. I. (1995). The effects of motorway runoff on freshwater ecosystems: 2. identifying major toxicants. *Environmental Chemistry* 14(6): 1093-1101.

Maltby L. et Crane M. (1994). Responses of *Gammarus pulex* (amphipoda, crustacea) to metalliferous effluents: identification of toxic components and the importance of interpopulation variation. *Environmental Pollution* 84(1): 45-52.

Maltby L., Naylor C. et Calow P. (1990). Field deployment of a scope for growth assay involving *Gammarus pulex*, a freshwater benthic invertebrate. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 19: 292-300.

Mann R. M., Hyne R. V., Spadaro D. A. et Simpson S. L. (2009). Development and application of a rapid amphipod reproduction test for sediment-quality assessment. *Environmental Toxicology and Chemistry* 28(6): 1244-1254.

Martin J. W. et Davis G. E. (2001). An updated classification of the recent crustacea. .Los Angeles, Calif.: Natural History Museum of Los Angeles County.

Mason A. Z. et Jenkins K. D. (1995). Metal speciation and bioavailability in aquatic systems.: A. Tessier et D.R. Turner. John Wiley and Sons, Chicester.

Matthiessen P. (2008). An Assessment of Endocrine Disruption in Mollusks, and the Potential for Developing Internationally-Standardized Mollusk Lifecycle Test Guidelines. *Integrated Environmental Assessment and Management* 4: 274-284.

Mazurova E., Hilscherova K., Jalova V., Kohler H. R., Triebskorn R., Giesy J. P. et Blaha L. (2008). Endocrine effects of contaminated sediments on the freshwater snail Potamopyrgus antipodarum in vivo and in the cell bioassays in vitro. *Aquatic Toxicology* 89(3): 172-179.

Mc Cahon C. P. et Pascoe D. (1988). Culture techniques for three freshwater macroinvertebrate species and their use in toxicity tests. *Chemosphere* 17(12): 2471-2480.

Mengin N., Bougon N., Chandesris A., Oraison F., Souchon Y., Valette L. et Villeneuve B. (2009). Réseau de référence des eaux douces de surface - cours d'eau. Lyon.

Meyer J. S., Davidson W., Sundby B., Oris J. T., Lauren D. J., Förstner U. et Crosby D. G. (1994). The effects of variable redox potentials, pH and light on bioavailability in dynamic water-sediment environments. In: Bioavailability: physical, chemical and biological interactions, (J. L. Hamelink, P. F. Landrum, H. L. Bergman etW. H. Benson, eds). Boca-raton, USA:Lewis Publishers, 155-170.

Michaut P. (1968). Données biologiques sur un Gastéropode Prosobranche récemment introduit en Côte-d'Or, *Potamopyrgus jenkinsi*. *Hydrobiologia* 32: 513-527.

Milani D., Reynoldson T. B., Borgmann U. et Kolasa J. (2003). The relative sensitivity of four benthic invertebrates to metals in spiked-sediment exposures and application to

contaminated field sediment. *Environmental Toxicology and Chemistry* 22(4): 845-854.

Mouthon J. (1982). Les mollusques dulçaquicoles: Données biologiques et écologiques; Clés de détermination des principaux genres de Bivalves et de gastéropodes de France. *Conseil Supérieur de la Pêche ed*.

Mouthon J. (2001). Life cycle and population dynamics of the Asian clam *Corbicula fluminea* (Bivalvia: Corbiculidae) in the Rhône River at Creys-Malville (France). *Archiv für Hydrobiologie* 151(4): 571-589.

Mouthon J. (2011). Response of bivalve populations to drying disturbance and life history traits of two Pisidium species (Bivalvia: Sphaeriidae) in a reservoir of the French Upper Rhone river. *Annales de Limnologie - International Journal of Limnology* 47(2): 175-184.

Mouthon J. et Dubois J. P. (2001). Mollusc communities of the littoral zone of Annecy Lake (Savoie, France). Les peuplements de mollusques de la zone littorale du lac d'Annecy (Savoie, France). *Annales de Limnologie - International Journal of Limnology* 37(4): 267-276.

Narracci M., Cavallo R. A., Acquaviva M. I., Prato E. et Biandolino F. (2009). A test battery approach for ecotoxicological characterization of Mar Piccolo sediments in Taranto (Ionian Sea, Southern Italy). *Environmental Monitoring and Assessment* 148: 307-314.

Naylor C. et Rodrigues C. (1995). Development of a test method for *Chironomus riparius* using a formulated sediment. *Chemosphere* 31(5): 3291-3303.

Neuparth T., Correia A. D., Costa F. O., Lima G. et Costa M. H. (2005). Multi-level assessment of chronic toxicity of estuarine sediments with the amphipod *Gammarus locusta*: I. Biochemical endpoints. *Marine Environmental Research* 60: 69-91.

Newcomb T. W. et Flagg T. A. (1983). Some effects of Mount St. Helens ash on juvenile salmon smolts. . *US National Marine Fisheries Service Review.*: 8-12.

Nuttall P. M. et Bielby G. H. (1973). The effect of China-clay wastes on stream invertebrates. *Environmental Pollution* 5: 77-86.

OCDE. (2004). 218 - Lignes directrices de l'OCDE pour les essais de produits chimiques. In: Essai de toxicité sur les chironomes dans un système eau-sédiment chargé

OCDE. (2010). 233 - Lignes directrices de l'OCDE pour les essais de produits chimiques. In: Essai de toxicité sur les chironomes dans un système eau - sédiment chargé ou eau chargée - sédiment.

OCDE. (2010). Detailed Review Paper (DRP) on Molluscs Life-Cycle Toxicity Testing. (OECD Series on Testing and Assessment No. 121). Paris:Organisation for Economic Co-operation and Development.

OCDE. (1992). Report of the OECD Workshop on effects assessment of chemicals in sediments. Copenhagen 13th-15th May 1991.

OCDE. (2010). Detailed Review Paper (DRP) on Molluscs Life-Cycle Toxicity Testing. (OECD Series on Testing and Assessment No. 121). Paris:Organisation for Economic Co-operation and Development.

Oetken M., Nentwig G., Loffler D., Ternes T. et Oehlmann J. (2005). Effects of pharmaceuticals on aquatic invertebrates. Part I. The antiepileptic drug carbamazepine. *Archives of Environemental Contamination and Toxicology* 49: 353-361.

Oetken M., Stachel B., Pfenninger M. et Oehlmann J. (2005). Impact of a flood disaster on sediment toxicity in a major river system ï the Elbe flood 2002 as a case study. *Environmental Pollution* 134: 87-95.

Owens P. et Xu Z. (2011). Recent advances and future directions in soils and sediments research. . *Journal of Soils and Sediments, 11, 875-888* 11: 875-888.

Pacaud A. (1945). Les amphipodes de la faune nutritive des eaux douces françaises. *Bulletin Français de Pisciculture* 136: 105-119.

Pacaud A. (1952). Nouvelle revue de la distribution geographique des gammares dans les eaux continentales Francaises. *Compte Rendu des Séances de la Société de Biogéographie* 252: 95-111.

Palmer M. A., Covich A. P., Lake S., Biro P., Brooks J. J., Cole J., Dahm C., Gibert J., Goedkoop W., Martens K., Verhoeven J. et Van de Bund W. J. (2000). Linkages between Aquatic Sediment Biota and Life Above Sediments as Potential Drivers of Biodiversity and Ecological Processes. . *BioScience* 50: 1062-1075.

Pang C., Selck H., Misra S. K., Berhanu D., Dybowska A., Valsami-Jones E. et Forbes V. E. (2012). Effect directed analysis of riverine sedimentsð The usefulness of *Potamopyrgus antipodarum* for in vivo effect confirmation of endocrine disruption. *Aquatic Toxicology* 106-107: 114-122.

Pascoe D., Williams K. A. et Green D. W. J. (1989). Chronic toxicity of cadmium to Chironomus riparius Meigen - effects upon larval development and adult emergence. *Hydrobiologia* 175: 109-115.

Pedersen S., Selck H., Salvito D. et Forbes V. E. (2009). Effects of the polycyclic musk HHCB on individual- and population-level endpoints in *Potamopyrgus antipodarum*. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 72(4): 1190-1199.

Peeters E. T. H. M. et Gardeniers J. J. P. (1998). Logistic regression as a tool for defining habitat requirements of two common gammarids. *Freshwater Biology* 39(4): 605-615.

Perterson G. S., Ankley G. T. et Leonard E. N. (1996). Effect of bioturbation on metal-sulfide oxidation in surficial freshwater sediments. *Environmental Toxicology and Chemistry* 15(12): 2147-2155.

Péry A. (2003). Modélisation des effets des toxiques sur le chironome *Chironomus riparius* de l'individu à la population. Lyon: *Université Claude Bernard - Lyon 1*.

Péry A. R. R., Ducrot V., Mons R. et Garric J. (2003). Modelling toxicity and mode of action of chemicals to analyse growth and emergence tests with the midge *Chironomus riparius*. *Aquatic Toxicology* 65: 281-292.

Pery A. R. R., Ducrot V., Mons R., Miège C., Gahou J., Gorini D. et Garric J. (2003). Survival tests with *Chironomus riparius* exposed to spiked sediments can profit from DEBtox model. W*ater Research* 37: 2691 - 2699.

Pery A. R. R., Geffard A., Conrad A., Mons R. et Garric J. (2008). Assessing the risk of metal mixtures in contaminated sediments on *Chironomus riparius* based on cytosolic accumulation. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 71: 869-873.

Péry A. R. R., Gust M., Vollat B., Mons R., Ramil M., Fink G., Ternes T. et Garric J. (2008). Fluoxetine effects assessment on the life cycle of aquatic invertebrates. *Chemosphere* 73: 300 - 304.

Péry A. R. R., Mons R., Flammarion P., Lagadic L. et Garric J. (2002). A modeling approach to link food availability, growth, emergence, and reproduction for the midge *Chironomus riparius*. *Environmental Toxicology and Chemistry* 21: 2507-2513.

Péry A. R. R., Sulmon V., Mons R., Flammarion P., Lagadic L. et Garric J. (2003). A model to understand the confounding effects of natural sediments in toxicity tests with *Chironomus riparius*. *Environmental Toxicology and Chemistry* 22(10): 2476-2481.

Petersen K., Kristensen E. et Bjerregaard P. (1998). Influence of bioturbating animals on flux of cadmium into estuarine sediment. *Marine Environmental Research* 45: 403-415.

Piol M. N., Lopez A. G., Miño L. A., Dos Santos Afonso M. et Guerrero N. R. V. (2006). The impact pf particle-bound cadmium on bioavalability and bioaccumulation: a pragmatic approach. *Environmental Science and Technology* 40: 6341-6347.

Plénet S. (1999). Metal accumulation by an epigean and a hypogean freshwater amphipod: Considerations for water quality assessment. *Water Environment Research* 71(7): 1298-1309.

Pöckl M. (1995). Laboratory studies on growth, feeding, moulting and mortality in the freshwater amphipods *Gammarus fossarum* and *G. roeseli*. *Archiv für Hydrobiologie* 134(2): 223-253.

Pockl M. et Humpesch U. H. (1990). Intra- and inter-specific variations in egg survival and brood development time for Austrian populations of *Gammarus fossarum* and *G. roeseli* (Crustacea: Amphipoda). *Freshwater Biology* 23(3): 441-455.

Ponder W. E. (1988). *Potamopyrgus antipodarum* - A molluscan coloniser of europe and Australia. *Journal of Molluscan Studies* 54: 271-285.

Ponder W. F. et Lindberg D. R. (1997). Towards a phylogeny of gastropod molluscs: An analysis using morphological characters. *Zoological Journal of the Linnean Society* 119(2): 83-265.

Poté J., Haller L., Loizeau J. L., Garcia Bravo A., Sastre V. et Wildi W. (2008). Effects of a sewage treatment plant outlet pipe extension on the distribution of contaminants in the sediments of the Bay of Vidy, Lake Geneva, Switzerland. *Bioresource Technology* 99: 7122-7131.

Power E. A. et Chapman P. M. (1992). Assessing sediment quality. In: Sediment toxicity assessment, (G. A. J. Burton, ed). Chelsea, MI, USA:Lewis Publishers, 1-18.

Pratihary A. K., Naqvi S. W. A., Naik H., Thorat B. R., Narvenkar G., Manjunatha B. R. et Rao V. P. (2009). Benthic fluxes in a tropical Estuary and their role in the ecosystem. . *Estuarine, Coastal and Shelf Science* 85: 387-398.

Quinn J., Davies-Colley R., Hickey C., Vickers M. et Ryan P. (1992). Effects of clay discharges on streams. *Hydrobiologia* 248: 235-247.

R Development Core Team. (2009). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing. Vienna, Austria.

Ramade F. (1998). Dictionnaire encyclopédique des sciences de lœau. *Ediscience ed.*

Rasmussen A. D. et Andersen O. (1999). Cadmium transfer between water and sediments studied in laboratory experiment. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 363: 720-727.

Rasmussen J. B. (1984). The life-history, distribution, and production of *Chironomus riparius* and *Glyptotendipes paripes* in a prairie pond. *Hydrobiologia* 119: 65-72.

Razak I. A. A., Li A. et Christensen E. R. (1996). Association of PAHs, PCBs, ^{137} Cs, and ^{210} Pb with clay, silt, and organic carbon sediments. *Water Science and Technology* 34: 29-35.

Reynolds J. B., Simmons R. C. et Burkholder A. R. (1988). Effects of placer mining discharge on health and food habits of Arctic Grayling. *Water Resources* 25: 625-635.

Ringenary M. J., Molof A. H., Tanacredi J. T., Schreibman M. P. et Kostarelos K. (2007). Long-term sediment bioassay of lead toxicity in two generations of the marine amphipod *Elasmopus laevis*, S.I. Smith, 1873. *Environmental Toxicology and Chemistry* 26(8): 1700-1710.

Ristola T., Pellinen J., Ruokolainen M., Kostamo A. et Kukkonen J. V. K. (1999). Effect of sediment type, feeding level, and larval density on growth and development of a midge (*Chironomus riparius*). *Environmental Toxicology and Chemistry* 18(4): 756-764.

Robson G. C. M. A. (1926). Parthenogenesis in the mollusc *Paludestrina jenkinsi*. *British Library - "The world's knowledge"* 1: 65-78.

Roger E. (2006). Impact de l'hormone EE2: l'ethynyloestradiol sur la croissance et la reproduction d'un mollusque: *Potamopyrgus antipodarum*. Rapport de stage, cemagref, centre de Lyon.

Roman Y. E., De Schamphelaere K. A. C., Nguyen L. T. H. et Janssen C. R. (2007). Chronic toxicity of copper to five benthic invertebrates in laboratory-formulated sediment: Sensitivity comparison and preliminary risk assessment. *Science of the Total Environment* 387(1-3): 128-140.

Rosenberg D. M. et Wiens A. P. (1978). Effects of sedimentation on macrobenthic invertebrates on a northern Canadian river. W*ater Research* 12: 753-763.

Roth G. (1987). Contribution to the distribution and biology of *Potamopyrgus jenkinsi* (E. A. Smith, 1889) in the Rhine river catchment area (Prosobranchia: Hydrobiidae). *Archiv für Hydrobiologie* Suppl. 79: 49-68.

Roulier J. L., Belaud S. et Coquery M. (2010). Comparison of dynamic mobilization of Co, Cd and Pb in sediments using DGT and metal mobility assessed by sequential extraction. *Chemosphere* 79: 839-843.

Roux A. L. (1970). Le cycle de reproduction de deux espèces étroitement parentes de crustacés amphipodes : Gammarus pulex et G. fossarum. *Annales de Limnologie - International Journal of Limnology* 6(1): 24-49.

Roux C. (1982). Les variations du métabolisme respiratoire et de lôactivité de quelques invertébrés dulçaquicoles sous lôinfluence de divers facteurs écologiques: Université Lyon I.

Ryan P. A. (1991). Environmental effects of sediment on New Zealand streams: A review. *New Zealand Journal of Marine and Freshwater Research* 25: 207-221.

Sànchez P. et 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*. *Aquatic Toxicology* 60: 249-256.

Santschi P. H. (1988). Factors controlling the biogeochemical cycles of trace elements in fresh and coastal marine waters as revealed by radioisotopes. *Limnology and Oceanography* 33(4): 848-866.

Santshi P. H., Guo L., Means J. C. et Ravichandran M. (1999). Natural organic matter binding of trace metals and trace organic contaminants in estuaries. *Biochemistry of Gulf of Mexico estuaries* 58(1-2): 347-380.

Scarlett A., Rowland S. J., Canty M., Smith E. L. et Galloway T. S. (2007). Method for assessing the chronic toxicity of marine and estuarine sediment-associated contaminants using the amphipod *Corophium volutator*. *Marine Environmental Research* 63(5): 457-470.

Schirling M., Jungmann D., Ladewig V., Nagel R., Triebskorn R. et Köhler H. R. (2005). Endocrine Effects in Gammarus fossarum (Amphipoda): Influence of Wastewater Effluents, Temporal Variability, and Spatial aspects on Natural Populations. *Environmental Contamination and Toxicology* 49(1): 53-61.

Schmitt C., Balaam J., Leonards P., Brix R., Streck G., Tuikka A., Bervoets L., Brack W., van Hattum B., Meire P. et de Deckere E. (2010). Characterizing field sediments from three European river basins with special emphasis on endocrine effects - A recommendation for *Potamopyrgus antipodarum* as test organism. *Chemosphere* 80: 13-19.

Schmitt C., Oetken M., Dittberner O., Wagner M. et Oehlmann J. (2008). Endocrine modulation and toxic effects of two commonly used UV screens on the aquatic invertebrates *Potamopyrgus antipodarum* and *Lumbriculus variegatus*. *Environmental Pollution* 152(2): 322-329.

Schmitt C., Streck G., Lamoree M., Leonards P., Brack W. et De Deckere E. (2011). Effect Directed Analysis of riverine sediments - the usefulness of *Potamopyrgus antipodarum* for *in vivo* effect confirmation of endocrine disruption. *Aquatic Toxicology* 101: 237-243.

Schmitt C., Vogt C., Machala M. et de Deckere E. (2011). Sediment contact test with *Potamopyrgus antipodarum* in effect-directed analysesð challenges and opportunities. *Environmental Science and Pollution Research* 18: 1398ï 1404.

Schmitz E. H. (1992). Amphipoda. In: Microscopic Anatomy of invertebrates, (F. W. Harrison etA. G. Humes, eds). New York:John Wiley and Son.

Schreiber E. S. G., Glaister A., Quinn G. P. et Lake P. S. (1998). Life history and population dynamics of the exotic snail Potamopyrgus antipodarum (Prosobranchia : Hydrobiidae) in Lake Purrumbete, Victoria, Australia. *Marine and Freshwater Research* 49(1): 73-78.

Shaw E. A. et Richardson J. S. (2001). Direct and indirect effects of sediment pulse duration on stream invertebrate assemblages and rainbow trout (Oncorhynchus mykiss) growth and survival. . *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 58: 2213-2221.

Sibley P. K., Benoit D. A., Balcer M. D., Phipps G. L., West C. W., Hoke R. A. et Ankley G. T. (1999). In situ bioassay chamber for assessment of sediment toxicity and bioaccumulation using benthic invertebrates. *Environmental Toxicology and Chemistry* 18(10): 2325-2336.

Simpson M. J., Chefetz B., Deshmukh A. P. et Hatcher P. G. (2005). Comparison of polycyclic aromatic hydrocarbon distributions and sedimentary organic matter characteristics in contaminated, coastal sediments from Pensacola Bay, Florida *Marine Environmental Research* 59(2): 139-163.

Sternberg R. M., Gooding M. P., Hotchkiss A. K. et LeBlanc G. A. (2010). Environmental-endocrine control of reproductive maturation in gastropods: Implications for the mechanism of tributyltin-induced imposex in prosobranchs. *Ecotoxicology* 19(1): 4-23.

Stronkhorst J., Brils J., Batty J., Coquery M., Gardner M., Mannio J., O'Donnell C., Steenwijk J. et Frintrop P. (2004). Discussion document on sediment monitoring guidance for the EU Water Framework Directive. Version 2. EU Water Framework Directive expert group on Analysis and Monitoring of Priority Substances.

Stuijfzand S. C., Helms M., Kraak M. H. S. et Admiraal W. (2000). Interacting effects of toxicants and organic matter on the midge *Chironomus riparius* in polluted river water. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 46: 351-356.

Suedel B. C. et Rodgers Jr J. H. (1994). Responses of *Hyalella azteca* and *Chironomus tentans* to particle-size distribution and organic matter content of formulated and natural freshwater sediments. *Environmental Toxicology and Chemistry* 13: 1639-1648.

Sutcliffe D. W. (1993). Reproduction in Gammarus (crustacea, amphipoda): Female strategies. *Freshwater Forum* 3: 26-64.

Sutcliffe D. W., Carrick T. R. et Willoughby L. G. (1981). Effects of diet, body size, age and temperature on growth rates in the amphipod *Gammarus pulex*. *Freshwater Biology* 11(2): 183-214.

Tachet H., Richoux P., Bournaud M. et Usseglio-Polatera P. (2000). Invertébrés d'eau douce systématique, biologie, écologie. CNRS Editions.

Taenzler V., Bruns E., Dorgerloh M., Pfeifle V. et Weltje L. (2007). Chironomids: suitable test organisms for risk assessment investigations on the potential endocrine disrupting properties of pesticides. *Ecotoxicology* 16: 221-230.

Tassou K. T. et Schulz R. (2009). Effects of the insect growth regulator pyriproxyfen in a two-generation test with *Chironomus riparius*. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 72: 1058-1062.

Taylor K. et Owens P. (2009). Sediments in urban river basins: a review of sedimentï contaminant dynamics in an environmental system conditioned by human activities. *Journal of Soils and Sediments* 9: 281-303.

Tessier A., Carignan R. et Belzile N. (1994). Processes occurring at the sediment-water interface emphasis on trace metals. In: Chemical and biological regulation of aquatic ecosystems, (J. B. a. R. D. Vitre, ed):Lewis Publishers, 139-175.

Townes H. K. (1945). The Nearctic Species of Tendipedini (Diptera, Tendipedidae (= Chironomidae)). *American Midland Naturalist* 34: 1-206.

Townsend B. E., Lawrence J. R. et Flannagan J. F. (1981). *Chironomus tentans* (Fabricius) introduction. In: Manual for the culture of selected freshwater invertebrates, Vol. 54, (S. G. Lawrence, ed). CAN:Canadian Special Publication of Fisheries and Aquatic Sciences, 110-126.

Triffault-Bouchet G., Bernard C. et Blake G. (2005). Assessment of contaminated sediments with an indoor freshwater/ sediment microcosm assay. *Environmental Toxicology and Chemistry* 24(9): 2243-2253.

Tuikka A. I., Schmitt C., Höss S., Bandow N., Von der Ohe P. C., de Zwart D., de Deckere E., Sormunen A. J. et kukkonen J. V. K. (2011). Toxicity assessment of sediments from three European river basins using a sediment contact test battery. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 74(1): 123-131.

Usseglio-Polatera P., Bournaud M., Richoux P. et Tachet H. (2000). Biological and ecological traits of benthic freshwater macroinvertebrates: relationships and definition of groups with similar traits. . *Freshwater Biology* 43: 175 - 205.

Vale C. et Sundby B. (1998). The interactions between living organisms and metals in intertidal and subtidal sediments. Metal metabolism in aquatic environments. W. J. Langston & M. J. Bebianno, London.

Van de Bund W. J., Goedkoop W. et ohnson R. K. (1994). Effects of deposit-feeder activity on bacterial production and abundance in profundal lake sediment. J*ournal of the North American Benthological Society* 13: 532-539.

Veerasingham M. et Crane M. (1992). Impact of farm waste on freshwater invertebrate abundance and the feeding rate of *Gammarus pulex* L. *Chemosphere* 25(6): 869-874.

Vignati D. A. L., Ferrari B. J. D. et Dominik J. (2007). Laboratory-to-Field Extrapolation in Aquatic Sciences _ Conceptual frameworks are needed to narrow the gap between laboratory- and field-based research. *Environmental Science and Technology* 41(4): 1067-1073.

Vos J. H., Ooijevaar M. A. G., Postma J. F. et Admiraal W. (2000). Interaction between food availability and food quality during growth of early intar chironomid larvae. *Journal of the North American Benthological Society* 19(1): 158-168.

Vos J. H., Teunissen M., Postma J. F. et Van den Ende F. P. (2002). Particle size effect on preferential settlement and growth rate of detritivorous chironomid larvae as influenced by food level. *Archiv für Hydrobiologie* 154(1): 103-119.

Vos J. H., van den Brink P. J., van den Ende F. P., Ooijevaar M. A. G., Oosthoek A. J. P., Postma J. F. et Admiraal W. (2002). Growth response of a benthic detritivore to organic matter composition in sediments. *Journal of the North American Benthological Society* 21(3): 443-456.

Waldbusser G. G., Marinelli R. L., Whitlatch R. B. et Visscher P. T. (2004). The Effects of Infaunal Biodiversity on Biogeochemistry of Coastal Marine Sediments. *Limnology and Oceanography* 49: 1482-1492.

Watts M. M., Pascoe D. et Carroll K. (2001). Survival and precopulatory behaviour of *Gammarus pulex* (L.) exposed to two xenoestrogens. W*ater Research* 35(10): 2347-2352.

Welsh D. T. (2003). It's a dirty job but someone has to do it: The role of marine benthic macrofauna in organic matter turnover and nutrient recycling to the water column. *Chemistry and Ecology* 19: 321-342.

Welton J. S. (1979). Life-history and production of the amphipod Gammarus pulex in a Dorset chalk stream. . *Freshwater Biology* 9(3): 263-275.

Wen X., Du Q. et Tang H. (1998). Surface complexation model for the heavy metal adsorption on natural sediment. *Environmental Science and Technology* 32: 870-875.

Wenning R. J., Batley G. E., Ingersoll C. G. et Moore D. W. (2005). Use of sediment quality guidelines and related tools for the assessment of contaminated sediments (SQG). *Summary booklet of a SETAC Pellston Workshop*.

Wijnhoven S., Van Riel M. C. et Van Der Velde G. (2003). Exotic and indigenous freshwater gammarid species: Physiological tolerance to water temperature in relation to ionic content of the water. *Aquatic Ecology* 37(2): 151-158.

Winterbourn M. (1970). Population studies on the New Zealand freshwater gastropod, *Potamopyrgus antipodarum* (Gray). *Proceedings of the Malacological Society of London* 39: 139-149.

Wogram J. et Liess M. (2001). Rank ordering of macroinvertebrates species sensitivity to toxic compounds by comparison with that of Daphnia magna. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology* 67: 360-367.

Woodhead R. J., Law R. et Matthiessen J. (1999). Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in surface sediments around England and Wales, and their possible biological significance. *Marine Pollution Bulletin* 38(9): 773-790.

Wülker W. et Götz M. (1968). The Verwendung der Imaginalscheiben zur Bestimmung des Entwicklungszustandes von Chironomidenlarven. *Zeitschrift für Morphologie der Tiere* 62: 363-382.

Xuereb B. (2009). Développement de marqueurs de neurotoxicité et de perturbations endocrines chez l'amphipode d'eau douce *Gammarus fossarum*. Thèse, Metz, France: *Université Paul Verlaine*.

Xuereb B., Lefèvre E., Garric J. et Geffard O. (2009). Acetylcholinesterase activity in *Gammarus fossarum* (Crustacea Amphipoda): Linking AChE inhibition and behavioural alteration. *Aquatic Toxicology* 94(2): 114-122.

Xuereb B., Noury P., Felten V., Garric J. et Geffard O. (2007). Cholinesterase activity in *Gammarus pulex* (Crustacea Amphipoda): Characterization and effects of chlorpyrifos. *Toxicology* 236: 178ï 189.

Zaranko D. T., Farara D. G. et Thompson F. G. (1997). Another exotic mollusc in the laurentian great lakes: The new zealand native potamopyrgus antipodarum (Gray 1843) (Gastropoda, Hydrobiidae). *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences* 54(4): 809-814.

Ģiviĺ I. et Markoviĺ Z. (2007). Distribution of the species Gammarus balcanicus and Gammarus fossarum on the territory of Serbia (Central part of the Balkan peninsula). *Crustaceana* 80(1): 67-76.

Zoumis T., Schmidt A., Grigorova L. et Calmano W. (2001). Contaminants in sediments: remobilisation and demobilisation. *Science of the Total Environment* 266: 195-202.

ANNEXE 1 : BIOACCUMULATION DES METAUX PAR LES TROIS ESPECES TESTEES

Des dosages de métaux (Cr, Co, Ni, Cu, Zn, As, Cd et Pb) ont été réalisés sur les 3 espèces testées, au premier jour d'expérimentation (T0) et après 1 semaine (*G. fossarum* et *C. riparius*) ou 10 jours (*P. antipodarum*) d'exposition aux sédiments (Tfinal). Pour chaque métal, ces mesures, réalisées en triplicats, ont permis de calculer la concentration bioaccumulée par jour ($[]_{bioaccumulée}$) par les 3 espèces d'après la formule suivante :

$[]_{bioaccumulée} = ([]_{Tfinal} - []_{T0})$ / nombre de jour d'exposition

Les résultats sont présentés dans les tableaux ci-après :

Concentrations en métaux bioaccumulés (µg / g / jour)								
	Cr	**Co**	**Ni**	**Cu**	**Zn**	**As**	**Cd**	**Pb**
BB2	**0,17**	0,04	**0,14**	-0,80	-0,62	-0,01	**0,02**	**0,09**
LCB2	**0,27**	0,04	**0,20**	-0,32	-0,09	0,04	**0,01**	**0,08**
LGB2	0,13	0,02	0,10	0,45	0,38	0,01	0,00	0,07
CMC2	**0,22**	0,05	**0,28**	0,21	-0,22	0,02	**0,01**	**0,10**
NEY1	0,05	0,01	0,02	0,09	0,07	0,01	0,01	0,08
PG2	**0,19**	0,02	**0,15**	-0,15	-0,01	0,02	**0,01**	**0,09**
PG5	0,06	0,01	0,09	0,17	0,14	0,01	0,00	0,07
PG3 [0]	ND	ND	ND	ND	ND	ND	0,12	ND
PG3 [0,5]	ND	ND	ND	ND	ND	ND	0,20	ND
PG3 [1,3]	ND	ND	ND	ND	ND	ND	0,30	ND
PG3 [3,1]	ND	ND	ND	ND	ND	ND	0,44	ND
PG3 [7,8]	ND	ND	ND	ND	ND	ND	0,93	ND
PG3 [19,5]	ND	ND	ND	ND	ND	ND	1,37	ND
CMA2	**0,21**	0,04	**0,17**	-0,32	0,08	0,01	**0,01**	**0,10**
IBA1	0,13	0,05	0,16	-0,26	0,52	0,09	0,00	0,12
MOR1	0,19	0,07	0,11	0,12	1,37	0,20	0,01	0,20
MAR1	0,12	0,03	0,09	-0,36	-0,32	0,01	0,00	0,05
VID1	0,38	0,04	0,13	-0,01	1,59	0,10	0,00	0,36
CAJ1	0,08	0,05	0,08	-0,21	2,44	0,17	0,04	0,30
AMO1	0,09	0,08	0,17	0,42	2,93	0,74	0,05	10,02
BION1	0,15	0,05	0,05	0,05	0,38	0,00	-0,02	0,18
BIE1	0,07	0,03	0,14	0,32	0,28	0,03	-0,01	0,09

Métaux bioaccumulés par les mâles adultes *G. fossarum*. ND : non dosé.

Concentrations en métaux bioaccumulés (µg / g / jour)								
	Cr	**Co**	**Ni**	**Cu**	**Zn**	**As**	**Cd**	**Pb**
BB2	**0,68**	**0,12**	0,38	10,59	-7,14	0,01	0,07	**0,29**
LCB2	**1,22**	< LQ (0,750)	< LQ (0,75)	1,81	-11,12	0,23	0,01	< LQ (0,0025)
LGB2	1,70	0,15	0,74	1,13	-8,41	0,25	0,04	0,46
CMC2	**1,69**	**0,26**	1,14	4,72	-0,99	0,17	0,04	**0,71**
NEY1	0,62	0,09	0,32	0,57	-11,88	0,04	0,07	0,47
PG2	**0,87**	< LQ (0,750)	0,44	0,84	-8,46	0,06	-0,01	**0,30**
PG5	0,94	0,10	0,44	0,83	-9,97	0,05	-0,03	0,49
PG3 [0]	ND	ND	ND	ND	ND	ND	0,36	ND
PG3 [0,5]	ND	ND	ND	ND	ND	ND	1,27	ND
PG3 [1,3]	ND	ND	ND	ND	ND	ND	1,76	ND
PG3 [3,1]	ND	ND	ND	ND	ND	ND	4,77	ND
PG3 [7,8]	ND	ND	ND	ND	ND	ND	9,46	ND
PG3 [19,5]	ND	ND	ND	ND	ND	ND	25,80	ND
CMA2	**1,16**	**0,16**	0,81	0,58	-18,80	0,04	< LQ (0,15)	**0,51**
IBA1	2,03	0,40	1,12	6,20	-13,11	0,64	0,03	1,20
MOR1	2,74	0,51	0,81	10,89	16,31	1,85	0,27	5,06
MAR1	2,42	0,39	1,15	3,67	-10,63	0,31	-0,04	1,10
VID1	1,63	0,14	0,75	3,68	-13,19	0,06	-0,07	1,29
CAJ1	1,77	0,46	1,25	13,58	23,52	1,63	4,21	3,24
AMO1	2,32	0,64	1,60	20,45	44,45	15,69	3,60	125,17
BION1	0,81	0,19	0,32	1,88	-12,23	-0,09	-0,08	1,13
BIE1	1,15	0,18	0,95	5,23	-2,65	0,35	0,00	0,93
PIZ1	3,83	0,57	0,29	26,04	-14,81	3,65	0,59	4,51
JEAN1	3,24	0,61	0,97	20,41	-4,71	2,90	0,40	3,76

Métaux bioaccumulés par les larves de stade 4 de *C.riparius*. ND : non dosé.

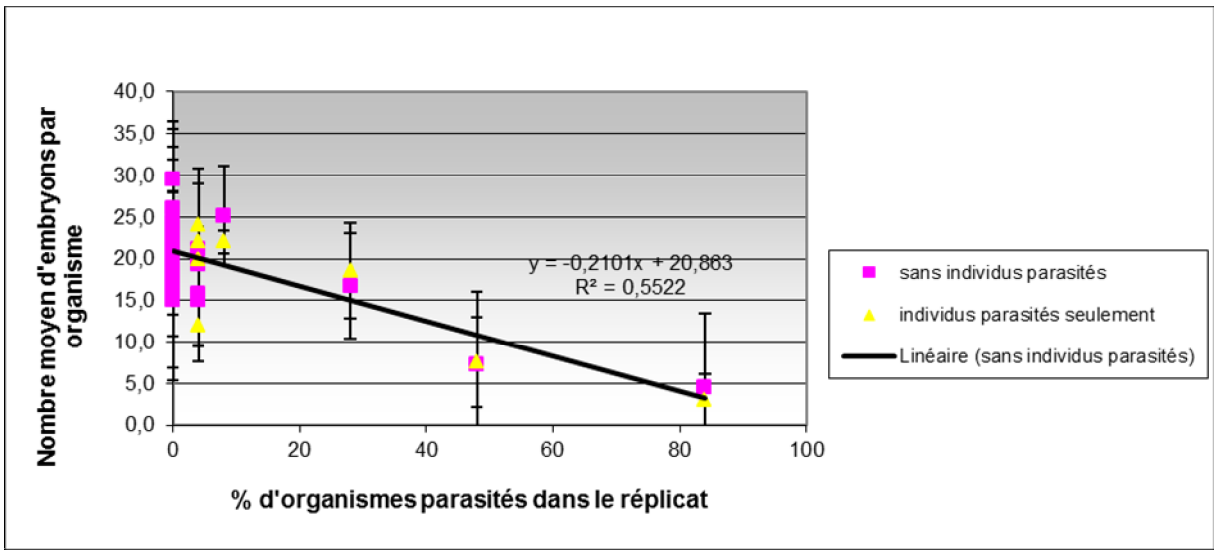
Concentrations en métaux bioaccumulés (µg / g / jour)								
	Cr	**Co**	**Ni**	**Cu**	**Zn**	**As**	**Cd**	**Pb**
BB2	0,02	0,01	0,02	1,17	0,03	0,00	0,00	0,01
LCB2	0,01	0,01	0,01	0,28	-0,01	0,00	0,00	0,00
LGB2	0,00	-0,02	-0,04	-7,53	-1,74	-0,12	-0,07	0,02
CMC2	0,02	0,02	0,04	0,67	0,02	0,02	0,00	0,01
NEY1	0,01	0,00	-0,05	-2,61	-0,97	-0,02	-0,03	0,02
PG2	0,01	0,01	0,02	1,02	0,10	0,01	0,00	0,02
PG5	-0,04	-0,02	-0,07	-8,59	-1,94	-0,22	-0,08	0,00
PG3 [0]	ND	ND	ND	ND	ND	ND	0,602	ND
PG3 [0,5]	ND	ND	ND	ND	ND	ND	0,412	ND
PG3 [1,3]	ND	ND	ND	ND	ND	ND	0,484	ND
PG3 [3,1]	ND	ND	ND	ND	ND	ND	1,020	ND
PG3 [7,8]	ND	ND	ND	ND	ND	ND	2,120	ND
PG3 [19,5]	ND	ND	ND	ND	ND	ND	3,930	ND
CMA2	0,01	0,01	0,02	0,55	0,08	0,01	0,00	0,02
IBA1	0,08	0,00	0,05	-0,72	0,07	0,04	0,01	0,07
MOR1	0,04	0,00	-0,02	-0,85	-0,29	0,01	-0,04	0,08
MAR1	0,04	-0,01	0,02	-1,23	-0,10	0,00	-0,06	0,03
VID1	0,09	0,01	0,04	-1,05	0,25	-0,07	-0,06	0,09
CAJ1	-0,01	0,01	-0,04	-1,34	0,14	0,13	-0,02	0,11
AMO1	0,02	0,08	0,00	-1,61	0,06	3,27	0,02	8,17
BION1	0,08	0,02	-0,02	-5,68	-0,62	-0,15	-0,07	0,12
BIE1	0,01	0,00	0,03	-7,59	-1,68	-0,13	-0,07	0,05

Métaux bioaccumulés par les adultes *P. antipodarum*. ND : non dosé.

ANNEXE 2 : IMPACT DU PARASITISME SUR LA REPRODUCTION DE *POTAMOPYRGUS ANTIPODARUM*

Lors de la série dœxpérimentation S1 nous avons observé la présence de nombreux vers parasites à lœintérieur de la poche embryonnaire des adultes *P. antipodarum*. Nous avons donc voulu vérifier si la présence de ces vers avait un impact sur les taux de reproduction.
Pour cela, nous avons utilisé les données issues de la série dœxpérimentation S1, mais également les données dœune série dœxpérimentation sur les mêmes sédiments menée en parallèle à S1 et avec les mêmes protocoles, mais avec une durée dœexposition de 4 semaines (non présentée dans ce manuscrit)

Le graphique suivant représente le taux de reproduction des organismes parasités (en jaune) et non parasités (en rose) pour chaque réplicat de S1 (tous sédiment confondu) en fonction du pourcentage dœorganisme parasité du réplicat. Nous constatons une diminution du nombre dœembryon par femelle *P. antipodarum* quand le pourcentage dœorganismes parasités augmente (corrélation : r^2= 0,55).



Taux de reproduction des adultes *P. antiporarum* en fonction du degré de parasitage

Les 2 béchers parasités à plus de 40% présentent un taux de reproduction très faibles, et ce pour lœensemble des organismes parasités ou non. La présence de parasite sen grand nombre dans un réplicat, même sœils ne sont pas directement dans la poche embryonnaire des adultes *P. antipodarum*, semble donc affecter leur reproduction. Il est donc nécessaire de ne pas les

prendre en compte lors de l'analyse du test de reproduction. Le bécher parasité à 28% présente un taux de reproduction correct par rapport aux non parasités, mais il se trouve cependant dans les valeurs inférieures de ces béchers pas ou peu parasité. Avec un seul bécher à ce degré de parasitage, et qui présente une tendance à diminuer le taux de reproduction, il n'est pas possible de savoir si cette tendance deviendrait significative ou non en multipliant les béchers. Il est donc préférable de l'exclure également, afin de conserver une approche conservatrice.

Tous les autres béchers (parasités à moins de 10%) sont conservés, même si au sein d'un même bécher il ne semble pas y avoir de différence de reproduction entre un individu parasité et un non parasité, par précaution, les escargots parasités seront exclus de l'analyse des béchers restant (ce qui revient à retirer 1 ou 2 organismes au maximum et nous permet de conserver un effectif statistiquement analysable).

ANNEXE 3 : DEFINITION DES SEUILS REFERENTIELS : RESULTATS OBTENUS AVEC LA SECONDE METHODE DE CALCUL

Les tableaux ci-après présentent les résultats obtenus lors du calcul de SR avec le seconde méthode de calcul présentée dans le chapitre 2. Cette méthode nœst pas applicable à lœensemble de nos données. Les traits pour lesquels cette méthode nœétait pas applicable sont grisés dans les tableaux.

	Survie, Embryons produits par les adultes 42 jours				**Survie et Croissance des juvéniles 42 jours**			
	Survie (%)		Nombre d'embryon		Survie (%)		Taux de croissance (mm/jour)	
Sédiment	tout sédiment confondu	n	tout sédiment confondu	n	tout sédiment confondu	n	tout sédiment confondu	n
médiane	100,0	21	17,4	21	98,0	24	0,0	24
p-value (ANOVA ou KW)	0,463		0,175		0,149		0,200	
moyenne	99,2	21	16,6	21	96,0	24	0,044	24
écart type	1,8	21	7,1	21	6,9	24	0,009	24
CV inter sédiments (%)	1,8	21	42,6	21	7,2	24	20,5	24
Seuil de réponse inférieur (P95%)	96,3		2,7		84,6		0,026	
Seuil de réponse supérieur (P95%)	-		30,5		-		0,061	

Résultats obtenus pour chaque trait testé sur *P.antipodarum*. Lœexistence (ou absence) de différences de réponse biologique entre les sédiments testés a été vérifiée par des tests statistiques appropriés, les résultats (p-value) sont également présentés dans ce tableau.

	Survie et Croissance 7 jours				Survie, Taux d'émergence et Vitesses de développement 28 jours							
	Survie (%)		Taux de croissance (mm/jour)		Survie (%)		Taux d'émergence (%)		Vitesse de développement des mâles (1/jour)		Vitesse de développement des femelles (1/jour)	
Sédiment	tout sédiment confondu	n	tout sédiment confondu	n	tout sédiment confondu	n	tout sédiment confondu	n	tout sédiment confondu	n	tout sédiment confondu	n
médiane	86,7	26			80,0	29	80,0	29				
p-value (ANOVA ou KW)	0,120				0,658		0,758					
moyenne	83,2	26			78,3	29	77,6	29				
écart type	15,5	26			17,5	29	17,7	29				
CV inter réplicats (%)	18,6	26			22,4	29	22,8	29				
Seuil de réponse inférieur (P95%)	57,7				49,4		48,5					
Seuil de réponse supérieur (P95%)	-				-		-					

Résultats obtenus pour chaque trait testé sur *C. riparius*. L'existence (ou absence) de différences de réponse biologique entre les sédiments testés a été vérifiée par des tests statistiques appropriés, les résultats (p-value) sont également présentés dans ce tableau.

	Survie, Embryons produits, Nombre et surface des ovocytes 21 jours								Survie et Alimentation des mâles 7 jours				Survie et Croissance des juvéniles 28 jours			
	Survie (%)		Nombre d'embryon pondéré par femelle		Nombre d'ovocyte pondéré par femelle		Surface ovocytaire (mm²)		Survie (%)		Taux d'alimentation (mm²/jour/individu)		Survie (%)		Taux de croissance (mm/jour)	
Sédiment	tout sédiment confondu	n	tout sédiment confondu	n	tout sédiment confondu	n	tout sédiment confondu	n	tout sédiment confondu	n	tout sédiment confondu	n	tout sédiment confondu	n	tout sédiment confondu	n
médiane	100,0	14			4,2	39	105729,3	38	100,0	48			80,0	38		
p-value (ANOVA ou KW)	0,626				0,100827		0,494673		0,147				0,063			
moyenne	95,1	14			4,2	39	103035	38	98,1	48			80,9	38		
écart type	7,2	14			0,9	39	13849	38	4,2	48			13,4	38		
CV inter sédiments (%)	7,5	14			21,2	39	13,4	38	4,3	48			16,5	38		
Seuil de réponse inférieur (P95%)	83,3				2,5		75891		91,1				59,0			
Seuil de réponse supérieur (P95%)	-				6,0		130178		-				-			

Résultats obtenus pour chaque trait testé sur *G. fossarum*. L'existence (ou absence) de différences de réponse biologique entre les sédiments testés a été vérifiée par des tests statistiques appropriés, les résultats (p-value) sont également présentés dans ce tableau.

Résumé

Les enjeux écologiques, réglementaires et économiques imposent que des méthodologies robustes dôévaluation des risques environnementaux des sédiments contaminés soient proposées aux gestionnaires et autres parties prenantes. Il importe par ailleurs que ces méthodologies soient organisées selon une approche graduée, qui permette de hiérarchiser et proportionner les efforts mis en î uvre pour lôévaluation, selon les risques potentiels sur les écosystèmes. Ce travail de thèse vise donc au développement dôun outil biologique pour lôévaluation du danger toxique lié à la contamination des sédiments dôeau douce, intégrables dans une démarche dôévaluation du risque. Il sôagit de mesurer la toxicité des sédiments naturels contaminés par des polluants chimiques, via la mesure des perturbations biologiques provoquées par lôexposition dôorganismes au laboratoire. Ainsi une batterie de bioessais, composée de trois espèces phylogénétiquement différentes (*G. fossarum* arthropode crustacé ; *P. antipodarum* mollusque gastéropode et *C. riparius* arthropode insecte), a été mise en place. Le développement de la batterie sôest déroulé en deux étapes principales. La première a porté sur lôévaluation de la variabilité des traits de vie des organismes exposés à une série de sédiments de qualité acceptable, et couvrant une gamme la plus large possible de granulométrie et de quantité de matière organique. La réalisation de cette étape a permis de proposer, pour chaque espèce et chacun des traits considérés, une gamme de réponse considérée comme normale, en dehors de laquelle un effet toxique chimique du sédiment est significativement mis en évidence. La seconde étape consistait à comparer les réponses des traits de vie en conditions contaminées à la gamme de réponses en conditions pas / peu contaminées préalablement définie. Ainsi, la capacité à caractériser des sédiments contaminés a été évaluée pour chaque trait de vie de chaque organisme. Les résultats obtenus montrent que certains traits ont un potentiel de discrimination fort (ex : taux dôalimentation de *G. fossarum*) alors quôil est très faible pour dôautres (ex : production dôembryons de *P. antipodarum*). Les traits au potentiel de discrimination ôintermédiaireô sont traités au cas par cas. Ils peuvent en effet être moyennement sensibles à un ensemble de contaminants, ou présenter des sensibilités spécifiques (ex : la croissance de *C. riparius* nôa répondu quôaux sédiments présentant une contamination aux pesticides). Lôexploitation des résultats a permis dôaboutir à la définition de référentiels de réponse pour chaque trait de vie testé pour les trois espèces et à des recommandations dôutilisation des tests mis en place (quels espèces / traits conserver, comment les combiner, que faudrait-il faire pour perfectionner la batterieé).

Mots clés : sédiment ï biotest ï évaluation du risque toxique

Abstract

The ecological, regulatory and economic stakes impose to propose reliable methodologies to assess the risk of contaminated sediments for the environment, following a gradual approach (which allows to rank and to proportion efforts), considering the potential risks on the ecosystems.

This work aims to develop a biological tool for the hazard assessment of contaminated freshwaters sediments. It consists in the evaluation of natural sediments toxicity contaminated by chemicals pollutants, through the measurement of biological disturbances caused to laboratory exposed organisms. Thus, a bioassay battery composed of three species (*G. fossarum* crustacean arthropod; *P. antipodarum* gastropod mollusc and *C. riparius* insect arthropod), belonging to different phyla, was built.

The battery was developed within two main steps. The first concerns the evaluation of the natural variability of organisms life-traits exposed to a good quality (not or few contaminated) sediment series, which present a range of particle size grading and organic matter content as large as possible. The second step consists in a comparison between life-traits responses in contaminated conditions and the range of responses previously obtained in control conditions. Thus, the battery capacity to discriminate was assessed on contaminated sediment for each endpoint for the three tested species.

Results show some traits with a high discriminating power (e.g. *G. fossarum* feeding rate) and on the contrary some traits with a very low discriminating power (e.g. *P. antipodarum* embryo production). Intermediates responses are treated separately. Actually, it can present median sensitivity to contaminants or specific sensitivities (e.g. *C. riparius* growth rate responded only to pesticides contaminations).

Results allow to obtain biological response thresholds for each endpoint of the three tested species, and recommendations for the use of developed tests (which species / traits to use in which conditionsé).

Key words: sediment ï bioassay ï toxicological risk assessment