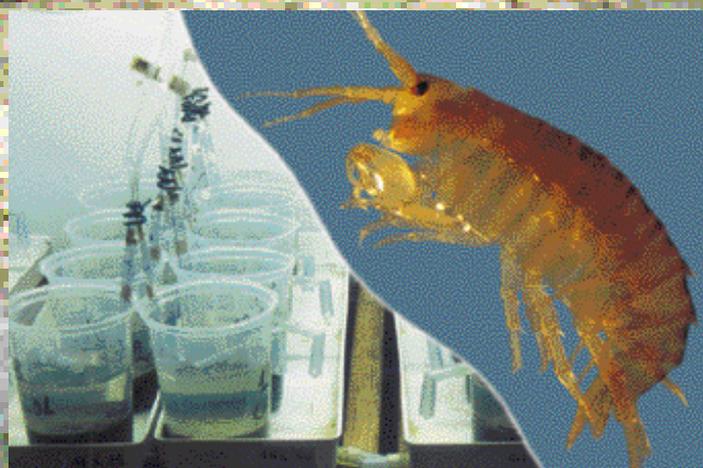


LES ÉTUDES DES AGENCES DE L'EAU N°76

B I O E S S A I S
S U R S É D I M E N T S



MÉTHODOLOGIES ET APPLICATION
À LA MESURE DE LA TOXICITÉ
DE SÉDIMENTS NATURELS

La vocation première des Agences de l'Eau est le financement de travaux dans les domaines de l'eau et de l'assainissement; il leur est nécessaire d'avoir une vision la plus précise possible des problèmes posés et des solutions adaptées.

Pour cela, elles conduisent des programmes d'études et de recherches au niveau de leur bassin, mais aussi au niveau national, de façon concertée avec la Direction de l'eau du Ministère de l'Environnement, à travers les programmes inter-Agences.

Ainsi, depuis 1977, cinq programmes ont été menés à bien. Le cinquième, portant sur la période 1997-2001, a permis notamment la réalisation du présent document, fruit d'une des études réalisées.

D'un montant de 105 millions de francs, ce cinquième programme s'intéresse aux axes suivants :

AXE 1 : La socio-économie, la planification et les institutions
Pilote : Direction de l'eau du ministère chargé de l'Environnement

AXE 2 : La connaissance et l'évaluation des milieux aquatiques
Pilote : Rhône-Méditerranée-Corse

AXE 3 : L'urbain
Pilote : Seine-Normandie

AXE 4 : Le rural
Pilote : Loire-Bretagne

AXE 5 : L'eau et la santé
Pilote : Artois-Picardie

AXE 6 : La gestion des milieux aquatiques
Pilote : Adour-Garonne

AXE 7 : Les industries, l'énergie et le transport
Pilote : Rhin-Meuse

BIOESSAIS SUR SÉDIMENTS



MÉTHODOLOGIES ET APPLICATION À LA MESURE DE LA TOXICITÉ DE SÉDIMENTS NATURELS

Document réalisé sous la direction des Agences de l'Eau
et du Ministère de l'Aménagement du Territoire et de l'Environnement

Directeur de la publication : Bernard BAUDOT

Agence de l'Eau
chargée de l'exécution : Rhône-Méditerranée-Corse

Chargé d'étude : Cemagref
Département Gestion
des Milieux Aquatiques
Groupement de Lyon
3 bis, rue Chauveau
69336 LYON cedex 09

Ont participé à l'étude : Jeanne Garric
Corinne Bonnet
Marc Bray
Bernard Migeon
Raphaël Mons
Bernard Vollat

Crédit photos : Cemagref
Agence de l'eau R.M.C - S. Stroffek

ISSN : 1161 - 0425
Tiré à 500 exemplaires / Avril 2000
Prix 150 F





SOMMAIRE

	RÉSUMÉ - SUMMARY	3
	PRÉAMBULE	5
1	INTRODUCTION	6
2	ÉVALUATION DE LA TOXICITÉ DES SÉDIMENTS	8
3	LES ORGANISMES D'ESSAI PROPOSÉS	10
4	MÉTHODES D'ESSAI	18
5	FACTEURS DE VARIATIONS DANS LA RÉPONSE TOXIQUE	24
6	ESSAIS SUR SÉDIMENTS NATURELS	28
7	CONCLUSIONS ET PERSPECTIVES	40
8	CONDITIONS D'ÉLEVAGE DE HYALELLA AZTECA	42
9	CONDITIONS D'ÉLEVAGE DE CHIRONOMUS RIPARIUS	48
	ANNEXE 1	50
	BIBLIOGRAPHIE	52





RÉSUMÉ

La mesure de la toxicité des contaminants présents dans le sédiment nécessite le développement de méthodologies spécifiques, qui permettent d'exposer des organismes du sédiment, en particulier des macro invertébrés benthiques, à des échantillons naturels ou contaminés artificiellement.

Des protocoles d'essais qui concernent différents organismes, des diptères chironomidés (*C. tentans*, *C. riparius*), un crustacé amphipode (*H. azteca*) sont proposés par l'U.S. Environmental Protection Agency, Environnement Canada ou encore l'OCDE. À partir de ces protocoles d'essais, nous avons mis en place un élevage de *C. riparius* et *H. azteca* au laboratoire d'écotoxicologie du Cemagref. Un suivi de ces élevages a été réalisé avec une évaluation des réponses à des toxiques de référence.

Les effets biologiques étudiés concernent la survie de *H. azteca* et de *C. riparius*, et la croissance (poids de *C. riparius*).

Des mesures de toxicité ont ensuite été réalisées sur plusieurs échantillons de sédiments naturels, comparativement à des effets sur des sédiments artificiels témoins. La survie moyenne des deux organismes obtenue sur sédiment artificiel est variable et de l'ordre de 70 %. Elle devra être améliorée avec une meilleure préparation du sédiment témoin, pour obtenir des survies de plus de 80 % et limiter la variabilité. La croissance des chironomes est par contre satisfaisante et il est possible de proposer une valeur moyenne dans les témoins de l'ordre de 0.96 mg (0.83-1.01) par individu après 10 jours d'essais à l'âge des organismes (entre 14j et 15j).

Différents types d'essais semi-statiques et continus ayant été réalisés, il semble que, pour *H. azteca* notamment, les essais menés en condition continue permettent d'obtenir

des résultats de survie plus satisfaisants. Ce mode d'essai, même s'il est plus lourd à initier au départ, présente de nombreux avantages : il permet de maintenir des conditions d'essais stables (oxygène, azote ammoniacal, pH...) et évite toutes les manipulations dues au renouvellement des milieux.

Sur les échantillons de sédiment naturel contaminé que nous avons pu tester, la comparaison des résultats obtenus sur *H. azteca* et chironomes met en évidence une plus grande sensibilité de l'essai amphipode.

Enfin, une comparaison entre les effets biologiques mesurés et les niveaux de contamination des sédiments testés, établis en utilisant des valeurs guide du sédiment (données nord américaines, seuil d'effets toxiques TEL, PEL) est proposée et discutée.

SUMMARY

A short review of the bioassays used to test the toxicity of sediment is presented, with a thorough examination for bioassays with *Chironomus* and *H. azteca*. The protocols of bioassays published by US EPA or Environment Canada are presented. These bioassays have been carried out in our laboratory, and the methodologies used are detailed.

The results of toxicity tests with several sampled of contaminated sediment are presented and discussed in comparison with the chemical data using known sediment quality criteria as US TEL and PEL.

Key words : bioassay, sediment, chironomus, *H. azteca*, toxicity



PRÉAMBULE

RAPPEL DU CONTEXTE D'ÉTUDE

Des travaux sur le développement de méthodes d'évaluation de la toxicité des sédiments ont été initiés depuis quelques années par les Agences de l'eau.

Ces travaux ont pour objectif principal de disposer le plus rapidement possible de méthodologies de mesure des effets toxiques des sédiments, reproductibles et fiables, applicables en laboratoire sur des prélèvements de sédiment, afin de permettre un suivi et/ou une prévision des effets toxiques des sédiments en place ou après perturbation (dragage, remise en suspension...).

Une première partie du travail a été réalisée par les Agences de l'eau, qui a abouti, sur la base de l'abondante bibliographie nord-américaine existante, à la sélection d'organismes d'essai et à la mise en œuvre de ces méthodes dans un laboratoire canadien.

Notre participation spécifique comprend donc la mise en œuvre de ces bioessais au laboratoire d'écotoxicologie du Cemagref, et leur application à quelques sédiments.

DÉROULEMENT DE L'ÉTUDE

L'étude est réalisée en 2 phases :

- une revue bibliographique des méthodes d'évaluation de la toxicité des sédiments, en particulier les essais expérimentaux en laboratoire, une présentation des recommandations qui sont actuellement publiées, et la mise en place et le suivi en laboratoire des élevages de *H. azteca* et *C. riparius*, en vue d'acquérir un savoir-faire transférable,
- la réalisation et l'exploitation de bioessais sur des sédiments prélevés dans le bassin du Rhône.



La contamination des sédiments par les molécules organiques et les métaux adsorbés sur la matière particulaire, ou en solution dans l'eau interstitielle, est maintenant un fait bien établi dans divers milieux : lacs, retenues de barrage, cours d'eau en zone industrielle et/ou agricole. Les indicateurs biologiques classiques en donnent une image (perturbation des populations, en diversité et en abondance), mais ils ne peuvent toujours en établir la cause avec certitude (perturbation toxique, physique ou encore eutrophisation).

Ce compartiment du milieu joue un rôle essentiel dans les processus physico-chimiques et biologiques qui régulent l'équilibre des écosystèmes¹. La couche superficielle des sédiments (de l'ordre de quelques centimètres) est la partie active de ce compartiment, tandis que les couches plus profondes sont passives et en place de manière plus permanente. Ces couches profondes peuvent être considérées comme un enregistrement de l'histoire de l'activité de l'écosystème, mais elles peuvent également être "ré-activées" lors de dragages ou d'événements hydrogéologiques divers.

Les processus qui contrôlent les flux continus de composés organiques et inorganiques à l'interface eau-sédiment peuvent être accélérés par l'activité biologique (et donc liés à la saison) ou par des perturbations physiques (remise en suspension lors de crues ou de dragages). Cette couche superficielle sédimentaire est ainsi beaucoup plus "active" et plus "permanente" que la colonne d'eau et permet ainsi une meilleure appréciation des perturbations liées à l'activité dans le bassin versant que cette dernière.

Ces considérations ont conduit les scientifiques à intensifier les travaux visant à une meilleure compréhension des interactions complexes entre sédiment et colonne d'eau, et sédiment et biocénoses,

ainsi qu'à l'évaluation de la contamination du sédiment et des perturbations biologiques associées.

Le développement de bioessais sur sédiment en laboratoire permet d'apporter des éléments de réponse à certaines questions soulevées lors de l'évaluation de la contamination toxique des sédiments :

- quelle est l'intensité de la contamination et quel en est l'effet sur les organismes?

et ceci sans les limitations des investigations in situ (nécessité de situation de référence, disparition d'espèces de la faune benthique possible sans contaminant toxique

-hypoxie, température, pH...),

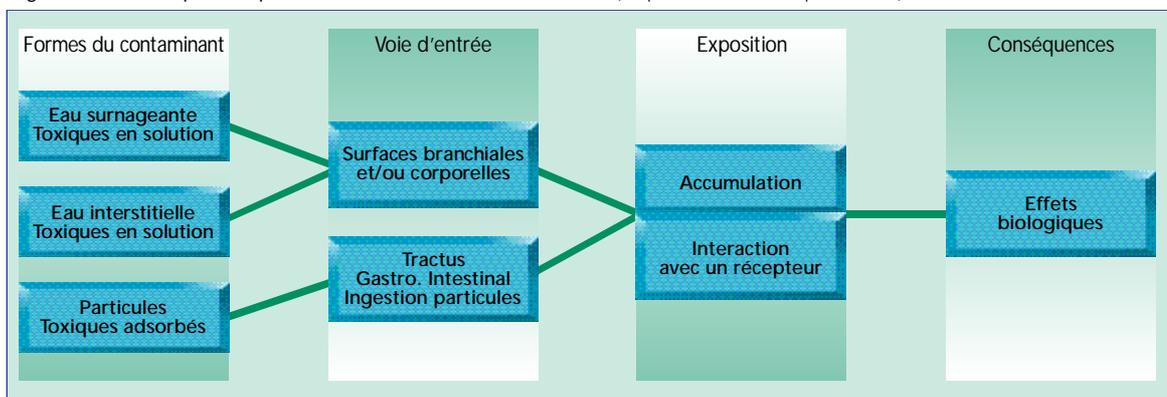
- quel effet biologique potentiel en cas de perturbation du sédiment (crue, dragage...)?

Néanmoins, si les essais en laboratoire permettent de comparer entre eux des sédiments contaminés, d'expérimenter les effets de la remise en suspension, de la dilution de sédiments ou de l'apport de contaminants particuliers, ou encore de s'intéresser aux réponses spécifiques des organismes à une contamination donnée, de nombreuses questions sont posées concernant les paramètres expérimentaux (organismes d'essai, conditions d'essai) et leur incidence sur les résultats.

Aussi nous nous attacherons à passer en revue les principaux facteurs susceptibles de modifier les résultats lors d'expérimentations de mesure des effets toxiques de sédiments contaminés et à proposer des protocoles d'élevage et d'essais.

D'une manière conceptuelle, on considère que les organismes sont exposés aux contaminants dans le sédiment via deux voies : principalement via la fraction soluble dans l'eau interstitielle mais également avec l'ingestion des substances liées aux particules (Figure 1).

Figure 1. Voies d'exposition possibles aux contaminants du sédiment (d'après Power et Chapman 1992)⁸.

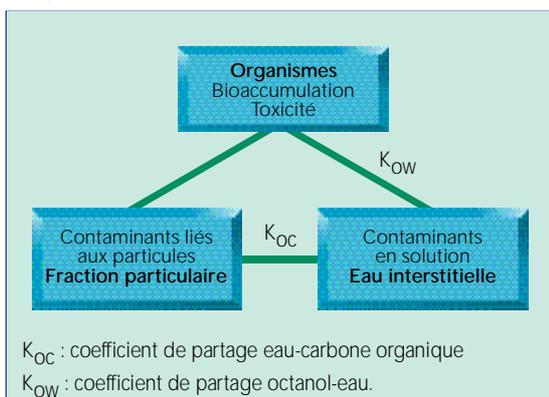


1. INTRODUCTION

Beaucoup de contaminants du sédiment sont peu solubles dans l'eau (HAPs, PCBs...) et de ce fait la réponse toxique associée à la phase particulaire peu biodisponible peut être mal corrélée avec la concentration en contaminant dans le sédiment.

Au sein du sédiment, les contaminants dans la phase solide sont en équilibre dynamique avec la phase soluble (Figure 2). Et divers auteurs (cités par Giesy et Hoke)⁸ ont montré que les concentrations de substances mesurées dans l'eau interstitielle étaient mieux corrélées à la toxicité que les concentrations de la phase particulaire. Pour les contaminants organiques non ioniques, l'équilibre de partage entre phases soluble et particulaire du sédiment est lié à la fraction en matière organique du sédiment ainsi qu'au coefficient de partage eau-particule de la substance.

Figure 2. Représentation de l'équilibre entre les différentes phases du sédiment et les organismes (d'après Giesy et Hoke 1989)⁸.



Ce modèle d'équilibre théorique dans les sédiments a permis de proposer³, pour les contaminants organiques^a non ioniques, des concentrations "sans effet" dans les sédiments, à partir des concentrations seuils^b, connues pour ces contaminants dans l'eau. Il implique que la toxicité des sédiments peut être valablement mesurée indifféremment à partir de bioessais sur l'eau interstitielle ou sur la phase particulaire, si l'on admet que la voie d'intoxication majeure est la voie respiratoire (branchiale, cutanée). Cependant ce modèle est loin d'être toujours applicable, en particulier pour les organiques ioniques ou les métaux, où de nombreux facteurs, autres que la fraction de carbone organique du sédiment, interviennent dans le contrôle de l'équilibre phase soluble - phase particulaire⁴. Dans ce cas, les essais sur sédiment "entier" permettent seuls de rendre compte des effets toxiques des différentes espèces chimiques présentes dans le sédiment.

^a avec un log de $K_{OW} > 3$

^b concentration maximale pour laquelle on attend aucun ou peu d'effet toxique.



Les sédiments jouent un rôle majeur dans le fonctionnement et la qualité des écosystèmes, mais les processus qui régulent les échanges chimiques et la biodisponibilité des contaminants à l'interface eau-sédiment peuvent être modifiés à la fois par l'activité biologique naturelle (planctonique et benthique) et par des perturbations physiques diverses (remises en suspension lors de crues, de dragages...). De ce fait, les programmes de surveillance chimique de la contamination des sédiments aussi bien que de la qualité des communautés benthiques se sont développés aux Etats Unis et au Canada pour surveiller ou prévoir l'incidence des perturbations sur le sédiment. La mise en œuvre de travaux de dragage importants (voies navigables, canaux, zones portuaires) et plus récemment, les programmes de définition de concentrations "seuils" dans le sédiment ont accéléré le développement de méthodes de mesure "biologique" des effets toxiques des sédiments, soit naturellement contaminé, soit après enrichissement artificiel.

Cependant, les sédiments sont des environnements très complexes que l'on peut décrire comme des systèmes physiques quasi-stables au sein desquels une multitude de gradients physico-chimiques et microbiologiques existent et interagissent. Les substances organiques et inorganiques d'origine naturelle et anthropogénique se partagent entre les particules, l'eau interstitielle, l'eau surnageante et les organismes.

Aussi, les échantillonnages et les manipulations de laboratoire pourront avoir un effet destructeur sur ces équilibres et, de ce fait, modifier les effets des contaminants vis-à-vis des organismes. Enfin, les conditions expérimentales telles que la qualité de l'eau surnageante, le temps de contact eau-sédiment, la durée d'exposition et la phase d'exposition pourront également altérer la réponse toxique.

Diverses approches sont actuellement utilisées pour mesurer les effets toxiques dus à la présence de contaminants dans les sédiments. Les essais de toxicité peuvent être effectués soit sur la phase solide, soit sur la phase liquide (eau interstitielle, lixiviats ou éluviats) du sédiment. Actuellement, il n'existe pas de stratégie définie pour avancer des recommandations sur la pertinence de l'utilisation de l'une ou l'autre phase dans l'évaluation de la toxicité des sédiments, du fait des nombreuses inconnues qui subsistent sur l'équilibre de partage eau-sédiment et sur la biodisponibilité des contaminants sur la phase particulaire.

2.1 ESSAIS SUR SÉDIMENTS ENTIERES

Ces méthodes sont utilisées d'une part pour évaluer le degré de toxicité de sédiments prélevés dans le milieu, en vue par exemple de définir des sites où un effort de décontamination est prioritaire, d'autre part pour établir les relations dose-réponse de certains contaminants ajoutés au sédiment. Ces relations dose-réponse permettent en particulier de définir des concentrations "seuils" ou concentrations sans effet toxique observable, utilisables par exemple comme critère de qualité du sédiment.

Les effets toxiques, évalués en terme d'effets létaux (mortalité d'individus) ou sublétaux (diminution de croissance ou de reproduction, ou perturbation du développement) sont obtenus lors des essais utilisant la totalité du sédiment, parfois après tamisage.

2. ÉVALUATION DE LA TOXICITÉ DES SÉDIMENTS

2.2 ESSAIS SUR EAU INTERSTITIELLE

Les résultats des mesures de toxicité effectuées sur l'eau interstitielle ou les éluviats permettent de déterminer le potentiel toxique des contaminants hydrosolubles sous des conditions aérobies.

L'utilisation de la phase liquide permet l'obtention de relations dose-réponse et la détermination des concentrations entraînant P % de l'effet toxique mesuré. Elle permet également de mettre en œuvre des méthodologies déjà bien décrites (bioessais sur *D. magna*, *C. dubia*, essai embryolaire poisson ou encore l'essai microtox®) et de comparer les résultats obtenus avec les données de toxicité existantes sur l'eau. Dans certains cas, la mesure de la toxicité de l'eau interstitielle permet d'obtenir une première évaluation acceptable de la toxicité du sédiment, en particulier pour les composés organiques non ioniques³, mais également pour l'ammoniac²³, qui peut être une des causes importantes de la toxicité.

Néanmoins, la sensibilité de la réponse et son réalisme par rapport aux organismes benthiques dépendra des organismes utilisés pour mesurer cette toxicité. Giesy *et al.* (1990)⁵ montrent que *D. magna* est un modèle acceptable (léthalité 48h) pour rendre compte de la toxicité de sédiments entiers vis à vis de *C. tentans* (croissance 10 jours). De même Ankley *et al.* (1991)⁶ ont comparé la sensibilité de divers organismes exposés à des eaux interstitielles et des sédiments (29) et proposent *H. azteca* comme une espèce sensible (léthalité 96h). Dans ce cas également l'eau interstitielle a donné des réponses bien corrélées avec l'information sur sédiment entier. Ces auteurs ont noté également la présence de réponses discordantes lors de leurs essais, c'est à dire la mise en évidence d'une toxicité sur l'eau interstitielle alors qu'aucune toxicité n'était mise en évidence sur le sédiment. Ces résultats peuvent être expliqués par des pH de l'eau interstitielle plus faibles que ceux mesurés dans les eaux surnageantes, ou encore à des phénomènes de dilution conduisant à une diminution de la toxicité lors de l'ajout d'eau surnageante dans les essais sur sédiment.

Des résultats opposés ont été obtenus par Harkey *et al.* (1994)⁷ qui ont montré que la biodisponibilité (mesurée par des données de bioaccumulation) de plusieurs contaminants (PAH, pesticides organochlorés) n'était pas précisément représentée par l'exposition de divers organismes (chironome, oligochète et amphipode) à la phase aqueuse du sédiment seulement. La mesure de la toxicité sur éluviats ne permet pas d'évaluer la toxicité du sédiment entier⁶.

2.3 ESSAIS SUR SÉDIMENTS "DILUÉS"

Si des relations dose-réponse peuvent être obtenues dans le cas de l'étude de la toxicité de substances pures ajoutées au sédiment, en vue par exemple de définir des concentrations "seuils" sans effet toxique observable, ceci est plus difficile avec le sédiment entier pour lequel il faudra mettre en place des méthodes de "dilution" spécifiques et délicates à mettre en œuvre. Néanmoins l'obtention d'une information sur un "taux de dilution" du sédiment en relation avec un effet toxique associé peut être utile lors de la définition de choix de méthodes de remédiation par exemple.

Peu d'informations sont disponibles sur les méthodes de "dilution" d'un sédiment, les plus appropriées et sur les artefacts susceptibles de se produire lorsque l'on manipule un sédiment pour obtenir un gradient de concentrations. Un sédiment "non contaminé", avec des caractéristiques géochimiques (carbone organique, granulométrie...) proches du sédiment à tester peut être utilisé. Certains auteurs utilisent de l'eau ou du sable. Dans tous les cas, le temps d'équilibre et les effets de la modification de l'intégrité du sédiment sur la biodisponibilité des toxiques devront être considérés.



3. LES ORGANISME

Les macroinvertébrés benthiques jouent un rôle central dans la détermination de la toxicité des sédiments. La structure des communautés benthiques est utilisée depuis longtemps comme indicateur sensible de la pollution des écosystèmes aquatiques. Il existe une littérature abondante concernant l'écologie et l'élevage de certaines espèces qui occupent une place majeure dans le fonctionnement des écosystèmes, tels que les diptères chironomidés, les tubificidés (vers aquatiques), les amphipodes (gammare, hyalles) ou les larves d'éphémères. Ces organismes sont en contact permanent ou quasi-permanent avec le substrat, l'eau interstitielle et l'eau surnageante durant tout ou partie de leur cycle de vie. De ce fait, ils rendent compte de la qualité du milieu qu'ils colonisent. Ils jouent un rôle fonctionnel dans l'écosystème en interagissant avec les différents niveaux trophiques et en participant aux transferts de nutriment, d'énergie et à la transformation de la matière organique.

Diverses revues bibliographiques (Giesy et Hoke 1989⁸, Burton 1991⁹, Reynoldson et Day 1992¹⁰, Ingersoll *et al.*, 1995¹¹) listent les organismes utilisés permettant de mesurer un niveau de toxicité des sédiments. En effet, du choix des organismes utilisés pour des mesures d'effet toxique dépendra la pertinence, le résultat et l'interprétation des essais.

Keddy *et al.* 1995¹² avaient évalué l'intérêt de plusieurs bioessais, intéressant différentes espèces d'organismes aquatiques^c, ainsi que différents critères de toxicité (survie,

croissance, reproduction). Cette évaluation a porté en grande partie sur l'existence d'une méthodologie bien définie (disponibilité, toxiques de référence, critères de validité) et sur la sensibilité et la reproductibilité des méthodes. Il en ressort qu'aucune des méthodes analysées ne satisfaisait totalement à leur exigence. En particulier aucune des méthodes considérées ne propose de toxiques de référence standard permettant d'évaluer la variabilité de réponses des essais intra-et inter laboratoire. Ce point a depuis été traité, comme nous le verrons par la suite. De plus, l'utilisation d'un sédiment témoin non contaminé est indispensable pour permettre une interprétation des essais; ce sédiment témoin pouvant être un sédiment naturel non contaminé ou encore un sédiment artificiel.

Les résultats de leur évaluation sont résumés dans le tableau 1.

A partir de leur étude, les auteurs justifient et recommandent une batterie de bioessais adaptés à une évaluation rapide de la toxicité des sédiments :

- survie et croissance de *Chironomus tentans* (10 jours),
- survie et croissance de *Hyalella azteca* (10 jours),
- survie d'*Hexagenia sp.* (10 jours).

Pour une évaluation définitive, ils proposent la prolongation de l'essai sur *Hyalella azteca* jusqu'à 28 jours afin d'atteindre la reproduction. Des essais sur la phase aqueuse du sédiment (eau interstitielle et éluatriat) sont également recommandés sur algues et sur *Ceriodaphnia dubia*.

Plus généralement, Ingersoll *et al.* (1995)¹¹ et l'US EPA

Tableau 1. Bioessais disponibles pour la mesure de la toxicité de sédiment (d'après Keddy *et al.*, 1995¹³)

Essais	Référence	Etat de la méthode
Survie et reproduction de l'amphipode <i>Hyalella azteca</i> .	ASTM 1992 (a)	Méthode disponible, critères de validité définis, pas de toxique de référence
Survie et reproduction de <i>Chironomus tentans</i> et <i>Chironomus riparius</i> ;	ASTM 1992 (a)	En développement, critères de validité définis, pas de toxique de référence
Survie et croissance d' <i>Hexagenia sp.</i>	Bedard <i>et al.</i> 1992	Méthode disponible, critères de validité définis, pas de toxique de référence
Survie et croissance de <i>Chironomus tentans</i> .	Bedard <i>et al.</i> 1992	Méthode disponible, critères de validité définis, pas de toxique de référence
Reproduction et croissance de <i>Tubifex tubifex</i> (oligochètes).	Reynoldson et Day, 1991	En développement, critères de validité définis, pas de toxique
Survie, reproduction et croissance de <i>Lumbriculus variegatus</i> (oligochètes).	Phipps <i>et al.</i> 1991	En développement, critères de validité définis, pas de toxique

SMES D'ESSAI PROPOSÉS

Tableau 2. Sélection d'organismes utilisables pour l'évaluation de la toxicité de sédiment d'eau douce (D'après Ingersoll et al.1995¹²).

	<i>Hyalella azteca</i> amphipode	<i>Diporeia</i> sp. amphipode	<i>Chironomus tentans</i>	<i>Chironomus riparius</i>	<i>Lumbriculus variegatus</i> Oligochète	<i>Tubifex tubifex</i> Oligochète	<i>Hexagenia</i> sp. Éphéméroptère	Mollusques	<i>Daphnia</i> sp. <i>Ceriodaphnia</i> sp.
Données sur la sensibilité	+	-	+	-	+	-	-	-	-
Essai inter laboratoire	+	-	+	-	-	-	-	-	-
Contact avec le sédiment	oui	oui	oui	oui	oui	oui	oui	oui	non
Elevage laboratoire	+	-	+	+	+	+	-	-	+
Identification taxonomique	+/-	+/-	+/-	+/-	+	+	+	+	oui
Importance écologique	oui	oui	oui	oui	oui	oui	oui	oui	+
Tolérance à la physico-chimie du sédiment	+	+	+/-	+	+	+	-	+	NA
Réponse/pop. in situ	+	+	+	+	+	+	+	-	+
Critères de toxicité	S, C, M	S, B, E	S, C, E	S, C, E	B, S, R	S, R	S, C	B	S, C, R
Répartition géographique	A	A?	E, A	E, A	E, A	E, A	A?	E, A	E, A

+ : données (importantes) existantes, ou NA non applicable

S : survie, C : croissance, B : bioaccumulation, E : évitement, R : reproduction, M : maturité sexuelle, E : émergence.

A : Amérique, E : Europe

(1994)¹³ ont listé les organismes (Table 2) les mieux adaptés (connus à ce jour) à l'évaluation en laboratoire de la toxicité, et susceptibles d'être utilisés pour les sédiments ; ceci sur la base des données disponibles concernant les méthodes d'essai, la réalité du contact entre les organismes et le sédiment, leur tolérance aux caractéristiques physiques du substrat, l'existence de données de toxicité inter-laboratoire, de données de sensibilité aux toxiques et d'informations sur la représentativité de leur réponse comparativement aux populations *in situ*.

D'après cette liste de critères les auteurs ont retenu l'amphipode *H. Azteca* et les deux chironomidés dans un premier temps, pour mettre en place des bioessais de toxicité sur sédiment au laboratoire, compte tenu de la disponibilité et de la relative homogénéité des méthodes de culture existantes.

Les méthodologies intéressant la mesure de la toxicité et de la bioaccumulation pour différents organismes du sédiment (dont *C. tentans*, *C. riparius*, *H. azteca* et *L. variegatus*) sont proposées dans différents documents : US. EPA (1994)¹³, ASTM (1995)¹⁴, Environnement Canada a, b (1995)^{15,16}. Elles varient quant aux procédures de culture, mais néanmoins imposent toutes la réalisation des essais avec des organismes entre 7 et 14 jours d'âge pour *H.azteca* et avec plus de 50 % des larves de *C. tentans* au 3ème stade (le reste devant être au second stade).

En Hollande, le RIZA (Institute for Inland Water Management and Waste Water Treatment) propose un protocole d'essai original sur *C. riparius*, débutant à partir

des œufs exposés à l'eau surnageante des sédiments. Après éclosion, le second stade larvaire est ensuite exposé au sédiment total¹⁷. Cette méthodologie permet d'exposer l'organisme plus longtemps et sur des phases différentes de son développement.

3.1 LES ORGANISMES RETENUS

3.1.1 ÉLÉMENTS DE LA BIOLOGIE DE HYALELLA AZTECA.

L'amphipode d'eau douce *Hyalella azteca* (crustacé) est distribué en Amérique du nord et du sud dans les lacs ou les eaux courantes permanentes tempérées, où il se reproduit et se développe rapidement à des températures assez élevées (25 °C), en présence de longues photopériodes. Il n'est pas présent en Europe. De March (1981)¹⁸ et Pennak (1989)¹⁹ ont largement décrit la répartition et le comportement de l'espèce.

C'est un organisme épibenthique détritivore qui creuse des galeries à la surface du sédiment où il se nourrit de microorganismes épiphytiques comme les bactéries, les diatomées et les algues présentes sur le sédiment. *H. azteca* est un organisme brouteur qui ne filtre pas l'eau. Son comportement et son mode de nutrition en font un organisme de

⁶ Nous ne reporterons ici que les méthodes intéressant des vertébrés inféodés au sédiment, mais les auteurs se sont intéressés également à des méthodes avec végétaux.

choix pour l'évaluation de la qualité du sédiment.

La reproduction de ces amphipodes est uniquement sexuée. Les mâles se distinguent des femelles, ils sont plus grands et présentent des gnathopodes plus larges. Le mâle s'accroche à la femelle durant l'amplexus qui se poursuit pendant 1 à 5 jours entre 22 et 25°C. La copulation a lieu après la mue de la femelle. Le mâle dépose le sperme dans une poche spécialisée (marsupium) de la femelle, où celle-ci relâche ensuite les œufs qui sont alors fertilisés. Les œufs éclosent dans cette poche juste avant que la femelle ne mue, libérant ainsi le premier stade immature. A chaque nouvel accouplement, la femelle mue et relâche les jeunes issus de l'accouplement précédent. *H. azteca* produit en moyenne 18 œufs par portée. Entre 24 et 28°C l'éclosion intervient entre 5 et 10 jours après fertilisation.

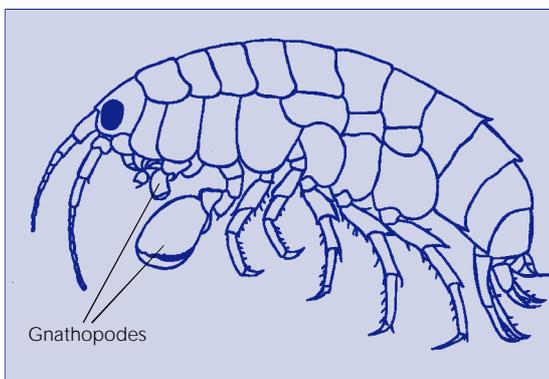
La durée d'intermue pour les femelles est de 7 à 8 jours (26-28°C). L'appariement sexuel a lieu durant l'incubation de la portée précédente.

Le cycle de vie de *H. azteca* peut être divisé en trois stades distincts : un stade immature (les 5 premières intermues), un stade juvénile (2 intermues suivantes), enfin un stade adulte (intermue 8 et suivantes). La durée des différents stades de développement et l'âge de la maturité sexuelle sont fonction des conditions de milieu. Un cycle de vie complet se déroule entre 12 et 14 semaines à 25°C. A partir d'une population de jeunes Hyalelles, la reproduction débute entre la 5ème et 6ème semaine environ, atteint un pic entre les 8ème et 12ème semaines puis décroît avec le début des mortalités d'adultes.

3.1.2 PROCÉDURES D'ÉLEVAGE

Les méthodes d'élevage décrites dans la bibliographie sont assez nombreuses et reflètent la tolérance assez large de ces organismes à divers paramètres dont la

Figure 3. *Hyalella azteca* adulte



description est proposée par l'US EPA (1994)¹³ et que nous résumerons ici.

La gamme de température tolérée par *H. azteca* pour obtenir la reproduction est de 10 à 28°C, avec une reproduction plus rapide entre 26 et 28°C. L'intensité lumineuse nécessaire varie entre 500 et 1000 Lux suivant les auteurs.

Cet organisme est également tolérant à différentes qualités d'eau. Il accepte en élevage des salinités jusqu'à 15‰, mais nécessite des concentrations en calcium d'au moins 7 mg/l. L'US EPA utilise une eau d'élevage reconstituée, avec les caractéristiques suivantes : dureté 90 à 100 mg/l de CaCO₃, alcalinité 50 à 70 mg/l CaCO₃, conductivité 330-360µS/cm, pH 7.8-8.2.

Sa tolérance à l'hypoxie est assez élevée, avec des concentrations létales (50 % de la population en 24h) de l'ordre de 0.3-0.7 mg/l à 20°C. Néanmoins la reproduction et la croissance sont significativement réduites lors d'expositions de 30 jours à 1.2mg/l d'oxygène dissous.

Concernant le substrat, *H. azteca* tolère des compositions de sédiments entre 90% de particules fines (argile et limon) et 100 % de sable. La taille des particules comme la teneur en carbone organique du sédiment d'élevage n'affectent pas la survie, la croissance ou la reproduction des organismes.

Les organismes peuvent être cultivés en condition statique ou avec renouvellement du milieu, ce qui est conseillé afin d'éviter toute chute d'oxygène dissous ou surcharge en produits de dégradation (nourriture, déchet...).

La sensibilité des organismes peut être suivie au cours du temps à l'aide d'essai d'une durée de 96h sur substance en eau seule. L'US EPA préconise les substances suivantes : NaCl, KCl, CdCl₂, et CuSO₄.

Lors d'un essai interlaboratoire avec le KCl (10 laboratoires) la CL50 96 heures moyenne obtenue sur *H. azteca* a été de 289 mg/l avec un coefficient de variation de 23 %.

3.1.3 MODE OPÉRAIRE ENTRETIEN ET CONTRÔLE DES ÉLEVAGES AU LABORATOIRE

La mise en place de l'élevage de *H. azteca* au laboratoire a été effectué à partir d'organismes en provenance d'un laboratoire d'élevage : Aquatic Research Organisms, INC.⁴, aux Etats Unis par l'intermédiaire d'un fournisseur. L'annexe n° 1 présente le détail de la méthode d'élevage. Lors de cette mise en place la sensibilité des organismes a été suivie à l'aide de toxiques de référence.

3. LES ORGANISMES D'ESSAI PROPOSÉS



Tableau 3. Toxicité de quelques substances testées dans l'eau, sur *H. azteca*, *C. tentans* et *C. riparius*.

Substances	Durée essai	CL50 <i>H. azteca</i>	CL50 <i>C. tentans</i> <i>C. riparius</i>	références
Dichloraniline	96h		7.4 mg/l	20
Lindane	96h		13 µg/	20
Fluoranthène	48h	92 µg/l	>250 µg/l	21
Fluoranthène	10 jours	30 µg/l	38 µg/l	21
Dieldrine	10 jours	7.6 µg/l	1.1 µg/l	22
Ammoniaque	10 jours		523 mg/l	23
Ammoniaque (N)	96 h	9.2 mg/l		23
Cuivre	96h	55-146 µg/l	493 µg/l	35
Cuivre	10 jours	31 µg/l	54 µg/l	22
Potassium (chlorure)	96h	289 mg/l		10
Cadmium	96h	7 µg/l		24
Zinc	96h	230µg/l		24

3.1.4 CHOIX DU TOXIQUE DE RÉFÉRENCE ET RÉSULTATS OBTENUS AU LABORATOIRE

Après une recherche bibliographique sur les données de toxicité disponibles vis à vis de substances de référence envisageables (résumées dans le tableau 3), nous avons choisi de tester nos organismes à l'aide de trois substances : sulfate de cuivre, chlorure de potassium et lindane.

Les essais²⁵ sont réalisés en conditions statiques durant 96h, à une température de 24°C±1, en milieu d'élevage, avec un support artificiel. 5 concentrations d'essai avec 5 réplicats par concentration et un témoin sont réalisés. 10 organismes sont utilisés par récipient de 100 ml. Les organismes sont nourris en début d'essai et après 48h. Pour chaque substance plusieurs essais ont pu être réalisés à une semaine d'intervalle environ sur des lots successifs d'organismes.

Les essais se sont déroulés de manière satisfaisante (mortalité dans les témoins comprise entre 0 et 7 %, O₂ à saturation).

Le tableau 4 résume les résultats obtenus (CL50 et I.C.) sur ces trois substances pour *H. azteca*.

Les résultats obtenus ont montré une bonne répétabilité des essais ainsi qu'une sensibilité satisfaisante, avec des CL50 96h du même ordre que celles disponibles dans la bibliographie.

Seul le lindane a présenté une réelle difficulté d'utilisation, compte tenu de sa faible solubilité qui a nécessité la réalisation d'une solution mère à 10mg/l (sans solvant) puis un dosage pour mesurer la concentration effectivement dissoute. Ces diverses manipulations expliquent en partie la moins bonne répétabilité de nos résultats.

Le KCl n'est pas non plus apparu satisfaisant comme toxique de référence, dans la mesure où il s'agit d'une substance peu toxique, nécessitant de fortes concentrations d'essai qui conduisent à des conductivités très élevées dans le milieu d'essai de l'ordre de 3000µS/cm.

L'utilisation du CuSO₄ comme substance de référence paraît la plus aisée à mettre en œuvre et permet l'obtention de résultats satisfaisants, mais les essais doivent être réalisés dans des conditions de dureté et de pH connues (respectivement 250-300 mg/l CaCO₃, pH 8-8.6).

²⁵ Aquatic Research Organisms. A.R.O.INC. Hampton, NH03843-1271. US

Tableau 4 . Répétabilité de la toxicité de trois substances sur *H. azteca* cultivée au laboratoire.

CL50 96h s Substance	essai 1	essai 2	essai 3	essai 4
CuSO ₄ µg/l	132 (94-186)	115 (96-138)	115 (97-136)	106 (93-121)
KCl mg/l	507 (450-572)	459 (407-517)	510 (471-551)	383 (340-431)
Lindane µg/l	19.6 (12-7-30.5)	24.8 (20.3-30.4)	39.4 (33.8-46)	/

3.2 LES ORGANISMES RETENUS : *CHIRONOMUS SP.*

3.2.1 ÉLÉMENTS DE LA BIOLOGIE DE *CHIRONOMUS TENTANS* ET *RIPARIUS*.

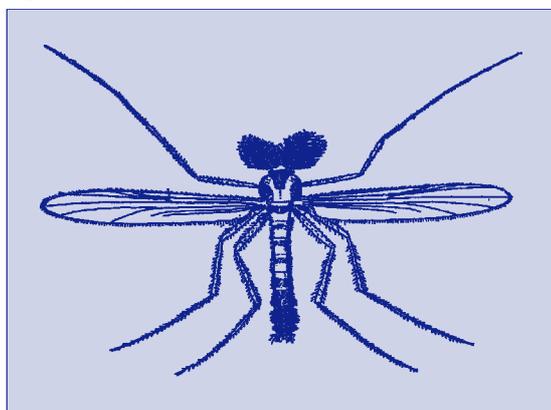
C. tentans et *C. riparius* sont des diptères de la famille des Chironomidae, du genre *Chironomus* (sous genre des *Camptochironomus*). On estime qu'il y a plus de 15000 espèces de chironomides dans le monde. Les exuvies et l'adulte permettent leur détermination spécifique. Cette détermination n'est pas possible au stade larvaire.

L'imago (l'adulte) ressemble très superficiellement aux moustiques en taille et en apparence. Le corps peut être divisé en 3 grandes parties : la tête, le thorax et l'abdomen. Chez l'adulte le mâle peut être facilement distingué des femelles à la fois par ses larges antennes à l'aspect de plumeau ou "panache" et la paire de forcipules (pinces) à l'extrémité postérieure de l'abdomen. La femelle adulte pèse approximativement deux fois plus que le mâle, et environ 30 % de sa masse est représentée par ses œufs.

Le cycle de vie des chironomides se divise en quatre stades : les œufs, le stade larvaire, le stade nymphal et le stade adulte. Seul le stade adulte est aérien, les autres stades sont aquatiques.

La masse, qui peut contenir entre 160-600 œufs, a une forme allongée sur un axe antéro-postérieur et les œufs sont scellés entre eux par un amas gélatineux. Les œufs sont le stade le moins sensible aux toxiques et, pour des températures comprises entre 19 et 22 °C, ils éclosent entre deux et trois jours après leur dépôt dans l'eau. Les

Figure 4. Imago de *Chironomus* mâle



phases du développement embryonnaire peuvent être suivies à travers le chorion transparent. Après l'éclosion des œufs et sur une courte période le premier stade larvaire reste dans la masse et consomme le matériel gélatineux. Le développement des larves de *Chironomus* se fait de façon asynchrone et une échelle de temps n'est pas adéquate pour déterminer de manière certaine le stade larvaire. Il faut se baser sur une clé de détermination morphologique comme par exemple celle de Ineichen et al.(1983)²⁶.

Pour *C. tentans* l'émergence des adultes a lieu 20 à 28 jours après l'éclosion à 20°C, elle peut être plus rapide pour *C. riparius*, dès 13 jours. La durée de vie des adultes est seulement de quelques jours (4 à 8) pendant lesquels ils se reproduisent.

L'émergence est bimodale. En effet, les mâles se développent plus vite que les femelles. L'accouplement est initié par le mâle, la copulation dure quelques secondes. Après la copulation, les spermatozoïdes sont stockés dans une paire de spermathèques où ils sont tenus séparés des ovules jusqu'à l'oviposition, 24 à 48 heures après l'accouplement.

Les œufs sont enrobés d'une substance gélatineuse et associés sous la forme d'une masse. La femelle dépose ses œufs dans l'eau où la masse prend une forme en "C" caractéristique. Chaque femelle ne produit qu'une masse d'œufs.

Le cycle larvaire des chironomides peut être décomposé en 4 stades distincts :

1. La tête, 3 segments thoraciques et 9 abdominaux, les antennes et les mandibules se distinguent facilement. Les larves mesurent alors de 0.6 à 1.2 mm de long et la largeur de la capsule céphalique varie de 0.07 à 0.1 mm (*C. riparius*, *C. tentans*). Les larves sont d'un blanc crémeux jusqu'à ce qu'elles initient leur production d'hémoglobine à la fin du stade.
2. La capsule céphalique mesure de 0.13 à 0.23 mm pour *C. riparius* (0.2-0.22 *C. tentans*). Des branchies apparaissent sur le huitième segment abdominal. Durant ce stade, la larve devient rose en raison de la production d'hémoglobine. Cette hémoglobine a une haute affinité pour l'oxygène contrairement à l'hémoglobine des vertébrés. Cette caractéristique permet aux chironomes de tolérer des niveaux d'oxygène dissous très réduit dans l'environnement.

3. LES ORGANISMES D'ESSAI PROPOSÉS

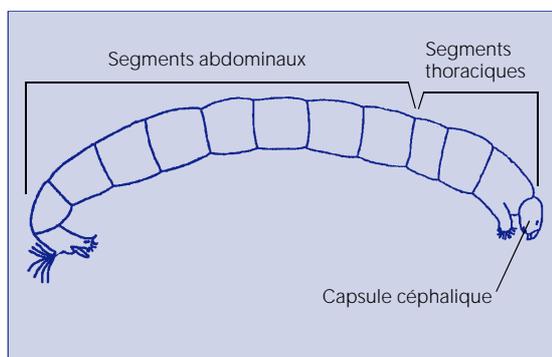


Figure 5. Larve de *Chironomus*

3. La capsule céphalique mesure de 0.25 à 0.40 mm chez *C. riparius* (0.37-0.42 chez *C. tentans*). La larve prend une couleur rouge vif typique.
4. La capsule céphalique mesure de 0.43 à 0.60 mm chez *C. riparius* (0.66-0.76 chez *C. tentans*) et se marque d'une longue bande noire. C'est à la fin de ce stade que la larve mue en nymphe.

Le dimorphisme sexuel apparaît à ce stade et les larves mâles de chironomidés pèsent en moyenne 30 % environ de moins que les femelles.

Le cycle de vie entier de *C. riparius* dure environ 4 semaines à 20°C.

Chironomus tentans a une distribution étendue et il est commun dans les zones mi-continentales de l'Amérique du nord. Il est également présent en Europe²⁷. Avec une distribution aussi large, *C. riparius* est également très commun en Europe. Ces organismes aux stades larvaires représentent une biomasse importante et une source de nourriture pour les prédateurs (poissons). Les larves de ces chironomidés sont majoritairement présentes dans les 10 premiers centimètres de substrat et très rarement en dessous de 40 cm de profondeur. Elles acceptent des tailles de particules variables, entre 0.15 et 2 mm, des températures de 0 à 33° (*C. riparius*), des concentrations en oxygène dissous entre 0.1 et 8 mg/l, des pH de 8 à 9.2 et des teneurs en carbone organique entre 1.9 e 15.5 %. (Topping 1971, cité dans US EPA¹³, ASTM 1991a²⁸).

3.2.2 PROCÉDURES D'ÉLEVAGE

Les chironomidés tolèrent une large gamme de substrats. La survie et la croissance ne sont pas affectées durant les essais de 10 jours qui ont été conduits en sédiment

reformulés, avec des tailles de particules variables. La survie est cependant réduite en sédiment artificiel avec des teneurs de carbone organique de moins de 0.9 %, si les organismes ne sont pas nourris²⁹.

Diverses méthodes d'élevage des organismes sont disponibles. Leurs principales caractéristiques les plus classiques (température, nourriture, éclairage etc...) sont résumées dans le manuel de l'US EPA (1994)¹³. Les élevages doivent permettre le démarrage d'essais sur sédiment dans les conditions standards, avec des organismes au 1er ou 2ème stade larvaire selon l'espèce. Le stade larvaire peut être déterminé à l'aide de la mesure de la longueur de la capsule céphalique. Il est conseillé de mesurer le poids et la longueur d'un échantillon d'organismes en début d'essai.

Différents substrats sont proposés pour maintenir des élevages de bonne qualité en laboratoire, du sable silicaté ou de la pulpe de papier préparée suivant diverses procédures.

Les aquariums d'élevage sontensemencés avec les larves dès leur éclosion (environ 150 à 200 larves par masse pondue). Les masses sont conservées indépendamment dans des bécjers de 100 ou 150 ml sans nourriture, à la température de 23 °C jusqu'à éclosion.

Une eau douce est utilisée, dans des aquariums de 6 à 8 litres, en renouvellement continu sur un substrat sableux (200 à 300 ml de sable). Ces aquariums sont recouverts d'un couvercle grillagé afin de conserver les adultes émergents. Les organismes sont nourris à l'aide d'une suspension de nourriture du commerce (type Tetramin®). La quantité de nourriture doit être adaptée à chaque condition de laboratoire, pour éviter toute surcharge organique dans les bacs. Certains auteurs apportent alternativement cette suspension et des algues (chlorelles).

L'émergence des adultes est obtenue après environ 3 semaines à 23 °C. Les adultes sont ensuite récupérés et conservés dans un récipient adapté (erlen-meyer) à raison d'une femelle pour trois mâles afin d'obtenir la reproduction et la ponte.

Afin de s'assurer de la qualité des organismes dans les cultures, il est conseillé de suivre régulièrement la croissance et la taille des organismes à l'aide de la mesure de la capsule céphalique.

C. riparius, autre chironomidae préconisé pour les bioessais sur sédiment, peut être élevé dans des conditions similaires à celles décrites pour *C. tentans*. A 23 °C, les émergences pour les mâles sont observés après environ 15 à 20 jours, suivis par les femelles à 18 à 23 jours, après l'éclosion³⁰.

Tableau 5. Age et taille de la capsule céphalique de *C. tentans* (23 °C) et *C. riparius*^{13,17} (20 et 23 °C)

Espèce	Stade larvaire	Nombre de jours après la ponte		Largeur de la capsule céphalique (mm)	
		23 °C	20 °C	23 °C	20 °C
<i>C. tentans</i>	1er	1 à 4.4	/	0.09 < 0.10 < 0.13	/
	2ème	4.4 à 8.5	/	0.18 < 0.20 < 0.23	/
	3ème	8.5 à 12.5	/	0.33 < 0.38 < 0.45	/
	4ème	> 12.5		0.63 < 0.67 < 0.71	
<i>C. riparius</i>	1er	0 à 3	2 à 7	0.07 < 0.10 < 0.12	0.07 - 0.107
	2ème	4 à 6	4 à 12	0.13 < 0.19 < 0.24	0.133 - 0.201
	3ème	7 à 14	8 à 19	0.26 < 0.33 < 0.40	0.257 - 0.347
	4ème	> 8	13 à 28	0.55 < 0.43 < 0.60	0.429 - 0.583

3.2.3 MODE OPÉRATOIRE ENTRETIEN ET CONTRÔLE DES ÉLEVAGES AU LABORATOIRE

La mise en place d'élevage de *C. riparius* au laboratoire a été effectuée à partir d'organismes de même origine que *H. azteca*. Contrairement à celui de *H. azteca*, le démarrage de cet élevage a été plus délicat, en particulier du fait de la difficulté de trouver une nourriture et un dosage adéquats. Des mortalités totales ont été observées au stade larvaire, en même temps que de fortes augmentations de l'ammoniac et des nitrites dans les aquariums d'élevage.

Le taux d'éclosion des masses produites est apparu également variable au cours du temps et avec la nature de la nourriture apportée.

Un élevage de masse, en aquarium alimenté en continu avec une eau naturelle sur du sable de Loire est maintenu en permanence. Cet élevage où l'ensemble du cycle de vie des organismes se réalise fournit les masses d'œufs nécessaires au démarrage d'aquarium de production contrôlée.

Un élevage en conditions plus contrôlées permet le suivi des paramètres de production (nombre de masses pondues, taux de survie, croissance...) et la production des masses d'œufs et des larves d'âge connu, nécessaires aux essais.

3. LES ORGANISMES D'ESSAI PROPOSÉS



3.2.4 CHOIX DU TOXIQUE DE RÉFÉRENCE ET RÉSULTATS OBTENUS AU LABORATOIRE

Parallèlement aux essais sur toxique de référence sur *H. azteca*, des essais identiques ont été effectués sur des larves de chironomes exposées pendant 96 h à une solution de sulfate de cuivre et de chlorure de potassium. L'élevage n'étant pas encore stabilisé, il a été difficile d'obtenir de manière régulière des organismes en nombre suffisant, et toujours du même âge. Des organismes d'âge variable suivant les essais (8 à 12 jours pour les essais avec KCl, 3 à 5 jours pour les essais avec le CuSO_4) ont été exposés dans des solutions toxiques réalisées avec l'eau d'élevage (dureté CaCO_3 250-300mg/l), dans des béchers de 300ml (10 individus par bécher). Une couche de sable a fourni un substrat aux organismes.

5 concentrations avec 4 réplicats ont été réalisées en 1997 pour chaque essai. Les résultats, qu'il faut considérer comme préliminaires du fait de l'âge variable des larves, sont résumés dans le tableau 6.

Ces premiers résultats confirment l'importance du stade larvaire utilisé lors des essais avec chironomes. Ils apparaissent en effet comme beaucoup plus hétérogènes que ceux obtenus sur *H. azteca*. Cette sensibilité relative des différents stades larvaires a été rapportée et décrite par plusieurs auteurs (voir chapitre 5, paragraphe 5.3.4).

On remarquera également la différence de sensibilité entre *H. azteca* et *Chironomus*. Des résultats similaires ont été présentés pour le KCl par l'US EPA lors d'essai inter laboratoire avec une CL_{50} 96h moyenne de 5360mg/l pour *C. tentans* et environ 300mg/l pour *H. azteca*.

Grootelaar *et al.* 1996¹⁷, utilisent le bichromate de potassium ou la 3, 4 dichloro aniline pour le suivi de la sensibilité des organismes (*C. riparius*).

La CL_{50} 96h de $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$ est comprise entre 20 et 65 mg/l et celle de la 3,4 DCA entre 4 et 12.5 mg/l.

Tableau 6. Répétabilité de la toxicité de deux substances sur *C. riparius* cultivé au laboratoire.

CL50 96h Substance	essai 1*	essai 2	essai 3
CuSO_4 µg/l	926 (682-1257)	2201 (1954-2480)	1974 (1643-2374)
KCl mg/l	2828 (2097-3814)	4267 (3545-5137)	4093 (3360-4987)

* essai préliminaire



Ces méthodes peuvent être groupées en deux parties distinctes. D'une part les procédures générales d'essai qui ont trait au conditionnement des sédiments avant l'essai (prélèvement, stockage, manipulation, mesures...) et qui peuvent être appliquées quelque soit l'organisme test, d'autre part, les procédures spécifiques à chaque organisme (conditions d'exposition, nourriture, critère d'effet toxique).

4.1 PROCÉDURES GÉNÉRALES

Plusieurs documents sont disponibles concernant ces procédures (US EPA¹³, ASTM¹⁴, Environment Canada^{15,16}). Nous présentons ci-après les principales caractéristiques des manipulations décrites dans ces documents.

Les échantillons de sédiments peuvent être récoltés par divers moyens (drague, benne, carottier) suivant les cas, et en fonction de la nécessité de conserver plus ou moins l'intégrité de la structure du sédiment. Le prélèvement est en général réalisé sur les premiers centimètres, pour la surveillance de la couche superficielle.

Les essais doivent débuter le plus rapidement possible après prélèvement. Les échantillons doivent être conservés à 4°C à l'abri de la lumière et sans couche d'air en surface, pour éviter au maximum d'éventuelles modifications chimiques du milieu²¹.

Compte tenu de la décantation, les sédiments doivent être homogénéisés avant essai avec leur eau surnageante. Le tamisage n'est en général pas recommandé car susceptible de modifier la composition du sédiment. Il est plutôt préconisé d'éliminer les grosses particules et les organismes les plus gros à l'aide de pinces. Néanmoins dans le cas de sédiment naturel, le tamisage peut être indispensable pour éliminer les organismes indigènes (par exemple sur 0.25mm). Le laboratoire utilise actuellement un tamisage à 2mm afin d'éliminer rapidement les plus gros débris avec un minimum de modifications du sédiment.

Un jour avant le début de l'essai, le sédiment est homogénéisé et déposé dans les récipients d'essai. L'eau surnageante est ajoutée en minimisant le déplacement du sédiment. Les volumes respectifs recommandés sont de 100 ml de sédiment et 175 ml d'eau.

Un renouvellement de l'eau surnageante est en général requis durant l'essai, dès la mise en place du sédiment et avant ajout des organismes et de la nourriture.

Ce renouvellement (de l'ordre de 1 à 4 fois par jour du volume d'eau) doit permettre de conserver une qualité d'eau constante au cours de l'essai. En effet, lors d'essais sur sédiment entier sans renouvellement, la qualité de l'eau surnageante se modifie très fortement. Le pH peut varier de manière importante et la conductivité et la dureté doubler lors d'exposition de 4 semaines ; on peut également noter une augmentation de produits azotés (NH₄, NO₂), susceptible d'affecter directement la survie des organismes. Selon les sédiments, l'oxygène dissous peut également chuter de manière très importante.

Les organismes d'essais sont distribués dans les récipients après 24h de mise en place du sédiment tamisé dans le système expérimental.

Des mesures régulières des paramètres physico-chimiques doivent être réalisées, et quotidiennement pour l'oxygène et la température.

Les organismes peuvent être, ou non, nourris durant les essais. La quantité de nourriture doit être ajustée afin d'éviter la surcharge du milieu en produits de dégradation et le développement de l'activité microbienne.

En fin d'essai, les organismes sont retirés du sédiment par pipettage ou tamisage. La récupération des organismes peut s'avérer délicate compte tenu de la taille et de la nature du sédiment testé.

La survie est le principal critère de toxicité aisément mesuré à l'issue des essais. Néanmoins, il est souvent utile d'y ajouter une mesure de croissance qui apparaît comme un critère de subléthalité sensible :

H. azteca : longueur de la base de la première antenne à l'extrémité du 3ème uropode le long de la courbure dorsale.

C. riparius : largeur de la capsule céphalique sur les larves survivantes, puis détermination du poids sec en rassemblant les organismes de chaque réplikat.

4. MÉTHODES D'ESSAI

4.1.1 SÉDIMENT TÉMOIN

L'utilisation d'un sédiment contrôlé est nécessaire, en particulier pour mettre en place un témoin de la qualité des organismes et des caractéristiques expérimentales de l'essai. Elle peut être également nécessaire lorsque l'on souhaite mesurer les effets toxiques d'une substance dans le sédiment. Ce support doit permettre une survie et une croissance correctes des organismes d'essai.

Plusieurs choix sont possibles :

- l'utilisation d'un sédiment naturel non contaminé. Dans ce cas, la difficulté réside dans l'évolution possible d'un tel sédiment dans les conditions naturelles au cours du temps, susceptible de modifier la réponse des organismes,
- la mise au point d'un "substrat" artificiel de qualité satisfaisante. L'US EPA propose un substrat support relativement simple à partir de sable (mélange 2:1 de sable fin -0.25 à 0.05 mm et sable grossier -0.5 à 0.25mm), d'argile (kaolinite, montmorillonite), de matière organique (humus, tourbe) et de carbonate de calcium et de magnésium pour tamponner le milieu. Tous les constituants sont mélangés sur la base de leur poids sec dans les rapports suivants : 77% de sable, 17 % argile, limon, matière organique 5 % et tampon 1 %. L'OCDE propose un mélange de 5 à 10 % de tourbe de sphaigne, 20 % kaolinite, 70 à 75 % de sable avec plus de 50 % de particules entre 50 et 200 microns. Le pH est ajusté à 7.0 +/-0.5 avec du carbonate de calcium. La teneur en carbone organique du mélange doit être autour de 2 % (+/- 0.5)

4.1.2 PROTOCOLES D'ESSAI SUR *H. AZTECA*

Le tableau 7 résume les principales caractéristiques des essais, décrites par différents auteurs et à l'origine des procédures plus standardisées proposées.

Tableau 7. Résumé des procédures d'essai utilisées pour mesurer la toxicité des sédiments entiers avec *H.azteca* (d'après US EPA 1994).

Auteurs	Nebeker et al 1984	Ingersoll and Nelson 1990	Ankley et al 1993	Burton et al 1989	Winger and Lasier 1993	Borgmann and Munawar 1989
Temp. °C	20	20	22	20-25	20-23	20-22
Photopériode	/	16-8	16-8	16-8	16-8	16-8
Récipient d'essai (ml)	1000	1000	300	300	30-300	2500
Volume sédiment (ml)	200	200	100	40-50	50-100	150
Vol. eau (ml)	800	100	175	160-200	20-150	1350
Renouvel. eau /jour	0	1-4	1-4	variable	0-2	0
Age des organismes (j)	jeune	jeune	7-14	jeune	7-14	0-7
Taille des organ. (mm)	/	1-2	/	/	1-2	/
Nombre d'organ./ récipient	15	20	10	10	3-10	20
Nombre de réplicats	/	4	3	4	5-10	2
Nourriture	RC	RC	YCT	RC	YCT, mL	TM
Aération	oui	non	non	si O ₂ <3	non	oui
Eau surnageante	naturelle	naturelle	naturelle	naturelle	reconstituée	naturelle
Durée de l'essai (j)	10	10-28	10	7	10	28
Critères d'effet	S	S, C, R	S	S	S	S, C
Critère d'acceptabilité (% survie)	/	80	80	80	80	/

RC : nourriture rat, YCT : mélange levure-cerophylle-nourriture poisson, TM : tétramin, mL : feuilles
S : survie, C : croissance, R : reproduction.

Actuellement l'US EPA¹³ recommande la procédure suivante, résumée dans le tableau 8, à laquelle ont été joints les protocoles d'essai utilisés au laboratoire pour la mesure de la toxicité des sédiments du Rhône et de la Saône (printemps et automne 97).

Avec des essais d'une durée de 28 jours, débutant avec des organismes immatures (moins de 2 semaines d'âge), il est possible d'utiliser la croissance et la maturation sexuelle comme critères d'effet toxique sublétaux. La maturation sexuelle débute après environ 24 jours à 20°C (à partir de la 6ème intermue au stade juvénile) et peut être mise en évidence par le développement du second gnathopode, dont la modification de croissance apparaît comme un indicateur fiable d'un effet sublétaux²².

4.1.3 PROTOCOLES D'ESSAI SUR CHIRONOMUS

Les tableaux 9 et 10 résument les principales caractéristiques des essais proposées par différents auteurs (Tableau 9) ainsi que la procédure recommandée par l'US EPA et le protocole actuellement utilisé au laboratoire (Tableau 10).

Tableau 8. *H. azteca*, protocole EPA et laboratoire Cemagref

	US. EPA	Laboratoire Cemagref	
		statique	continu
Type d'essai	Sédiment entier	Sédiment entier	Sédiment entier
Température °C	23° ±1	21°C+1	21°C+1
Lumière	Tube fluorescent large spectre	Tube fluorescent large spectre	Tube fluorescent large spectre
Intensité	500-1000Lux	~500 Lux	~500 Lux
Photopériode	16 J : 8N	16 J : 8N	16 J : 8N
Récipient d'essai (ml)	300 mL	400mL	400mL
Volume sédiment (ml)	100 mL	100mL	100 mL
Volume eau (ml)	175 mL	175 mL	175 mL
Renouvel. eau /jour	2 Vol /j (en continu ou intermittent)	1 vol /jour (semi statique)	30 mL/H
Age des organismes (j)	7 à 14	2 à 9	2 à 9
Nombre d'organ./ récipient	10	10	10
Nombre de réplicats	Dépend de l'essai (8 en routine)	5	3 à 5
Nourriture	YCT, 1.5ml/j	Tetramin 1 mL d'une suspension à 4g/L	
Aération	Si O ₂ <40% saturation	modérée* (>40% saturation)	Non nécessaire
Eau surnageante	Eau naturelle ou reconstituée	Naturelle (élevage)	
Qualité eau surnageante	Dureté, conductivité, pH et NH ₄ en début et fin d'essai O ₂ et T° quotidienne	Dureté, conductivité, pH et NH ₄ en début et fin d'essai O ₂ et T° quotidienne	
Durée de l'essai (j)	10	10	
Critères d'effet	Survie et croissance (optionnelle)	Survie et croissance	
Critère d'acceptabilité (% survie)	80%	80%	
Critères d'acceptabilité chimique	T°, et paramètres chimiques dans la limite de tolérance des organismes	T°, et paramètres chimiques dans la limite de tolérance des organismes	

* aération en surface, ne doit pas remettre le sédiment en suspension.

4. MÉTHODES D'ESSAI



Benoit *et al.* (1997)³³ proposent l'étude du cycle de vie de *C. tentans*, afin d'obtenir des informations sublétales quant aux effets toxiques des sédiments. L'essai initié à partir de larves de moins de 24h dure 65 jours, et permet de suivre 4 "niveaux" d'effet : survie, croissance, émergence et reproduction. Le gain de sensibilité obtenu à l'aide d'une étude de cycle de vie reste à évaluer. La ligne directrice OCDE, récemment diffusée et en cours de validation, décrit un test statique de 28 jours sur *C. riparius* dans des conditions similaires à celles proposées ci-dessus permettant la mesure de la croissance (à 10 jours) et la mesure des paramètres d'émergence (nombre d'émergents et durée d'émergence) lors d'essais sur sédiment artificiel contaminé.

4.1.4 SÉDIMENT CONTRÔLE

Les résultats sur sédiments naturels contaminés réalisés au laboratoire sont comparés aux résultats (survie et/ou croissance) obtenus sur des sédiments artificiels (témoins). Le laboratoire utilise actuellement un sable de Fontainebleau (90 % de particules avec un diamètre entre 63 et 200µm). Ce sable est conservé dans l'eau d'élevage avec un ajout de nourriture au moins 15 jours avant utilisation.

Tableau 9. Résumé des procédures d'essai utilisées pour mesurer la toxicité des sédiments entiers avec *C. tentans* et *C. riparius* (d'après US EPA 1994).

Auteurs	Nebeker et al 1984	Adams et al 1985	Ankley et al 1993	Giesy et al 1988	Wentzel et al 1977
Temp. °C	20	22	22	23	22
Photopériode	/	16-8	16-8	/	/
Réceptif d'essai (ml)	1000	3000	300	50	2000
Volume sédiment (ml)	200	250	100	7.5	1500
Vol. eau (ml)	800	2000	175	47	200
Renouvel. eau /jour	0	0-5	1-4	0	0
Age des organismes (j)	2ème	2ème	2ème	2ème	2ème
Taille des organ. (mm)	/	0.15mg	/	0.5g	6-8mm
Nombre d'organ./ réceptif	15	25	10	1	20
Nombre de réplicats	/	2	/	15	/
Nourriture	TM, CP	TM	TF	TF	non
Aération	oui	non	non	oui	non
Eau surnageante	naturelle	naturelle	naturelle	naturelle	naturelle
Durée de l'essai (j)	10	14	10	10	17
Critères d'effet	S, C	S, C	S, C	C	S, C
Critère d'acceptabilité (% survie)	NR	NR	70	NR	NR

CP : cerophylle, TM : tétramin®, TF : Tetrafin®

S : survie, C : croissance

Tableau 10. Chironomus, protocole EPA, laboratoire Cemagref, OCDE.

	US. EPA	Laboratoire Cemagref		OCDE
		semi-statique	continu	
Type d'essai	Sédiment entier avec renouvellement eau surageante	Sédiment entier avec renouvellement eau surageante	continu	statique / semi-statique
Température °C	23±1	21°C±1	21°C±1	21°C±1
Lumière	Tube fluorescent large spectre	Tube fluorescent large spectre		
Intensité	500-1000Lux	~500 Lux	~500 Lux	500-1000Lux
Photopériode	16 J : 8N	16 J : 8N	16 J : 8N	16 J : 8N
Réceptif d'essai (ml)	300 ml	400 ml	400 ml	600 ml
Volume sédiment	100 ml	100 ml	100 ml	1,5 cm
Volume eau	175 ml	175 ml	175 ml	6 cm rapport eau/sed 1/4 (cm)
Renouvel. eau /jour	2 Vol /j (en continu ou intermittent)	1 vol /jour (semi statique)	30 ml/H	si nécessaire
Age des organismes (j)	50% 3ème stade larvaire au moins et plus jeune (0 à 16j)	4 j.	4 j.	2 j.
Nombre d'organ./ réceptif	10	10	10	20
Nombre de réplicats	Dépend de l'essai (8 en routine)	5 min	5 min	
Nourriture	Tetrafin, nourriture poisson. 1.5ml/j (dont 4 mg de suspension solide)	Tetra AnilMin® 4mg/réceptif		Tetrafin ou Tetraphyll 0.5mg/ind/j (0-10) 1mg/ind/j (11-28j)
Aération	Si O ₂ <40% saturation	modérée*	modérée*	modérée*
Eau surageante	Eau naturelle ou reconstituée	Naturelle (élevage)		
Qualité eau surageante	Dureté, conductivité, pH et NH ₄ en début et fin d'essai O ₂ et T° quotidienne	Conductivité, pH, NH ₄ , NO ₂ au cours de l'essai O ₂ et T° quotidienne		pH, O ₂ et T° quotidienne
Durée de l'essai (j)	10	10	10	10 et 28
Critères d'effet	Survie et croissance (poids sec)	Survie et croissance (poids sec)		Survie, croissance, émergence
Critère d'acceptabilité (% survie)	80%	80%		80% émergence entre 13 et 28 j.
Critères d'acceptabilité chimique	T°, et paramètres chimiques dans la limite de tolérance des organismes	T°, et paramètres chimiques dans la limite de tolérance des organismes		

* aération en surface, ne doit pas remettre le sédiment en suspension.

4. MÉTHODES D'ESSAI



4.2 REPRODUCTIBILITÉ ET SENSIBILITÉ

Des essais inter laboratoire sur substances et sur sédiment entier ont été conduits par divers laboratoires, au Canada et aux Etats Unis, à l'aide des procédures d'essai décrites ci-dessus^{13,35}.

Ces essais permettent d'évaluer la reproductibilité des résultats obtenus par différents laboratoires, ainsi que la sensibilité relative des deux organismes retenus aux substances pures et aux sédiments contaminés, qui ont fait l'objet des essais.

3 types d'essai ont fait l'objet de ces études de reproductibilité : les essais sur substances de références lors desquels seule la survie en 96h des organismes a été mesurée, des essais sur sédiment artificiel contaminé (CuSO₄) et des essais sur sédiments naturels, pour lesquels ont été mesurés la survie et la croissance des organismes. Le chlorure de potassium et 4 types de sédiment ont été testés par l'ensemble des laboratoires (7 à 10 participants selon les essais) : un sédiment témoin, un sédiment contaminé à l'aide d'un ajout de cuivre permettant d'obtenir 2 sédiments (peu et fortement contaminé, enfin un sédiment naturel contaminé par des hydrocarbures aromatiques polycycliques).

La moyenne des survies et leur coefficient de variation (CV %) sont présentés ci-dessous. Dans certains cas, le minimum de survie requis (80 % chez les témoins) n'a pas été obtenu (70 % seulement).

Ces résultats, survie et poids, présentent une relation dose-réponse avec la contamination connue des sédiments testés. Néanmoins, il faut remarquer l'augmentation de la variabilité de la réponse avec la contamination lors de ces essais. La dispersion des résultats est en effet plus importante avec les sédiments contaminés, alors que la sensibilité des organismes témoins reste équivalente. Cette variabilité peut être un facteur limitant la sensibilité de détection des écarts de survie (et de contamination) entre différents sédiments.

Tableau 11 . Précision des mesures biologiques réalisées lors des essais sur *H. azteca* et *C. tentans* (d'après US EPA 1994)

	<i>Hyaella azteca</i>		<i>Chironomus tentans</i>		
	CL50 96h	% survie	CL50 96h	% survie	Poids sec mg
KCl mg/L	289 (23 %)		5360 (17.9%)		
Sédiment témoin		93 (9)		79.1 (25.1)	1.06 (38.3%)
Sédiment peu contaminé (Cu)		54.6 (36.2)		74.5 (36.7)	0.51 (49.9)
Sédiment très contaminé (Cu)		3 (256)		1.88 (233)	/
Sédiment contaminé par HPA		3.6 (121)		/	



Le plus souvent l'évaluation de la qualité du sédiment nécessite un prélèvement à l'aide de divers moyens (benne, drague, carottier). Dans tous les cas, ces méthodes, à des degrés divers, modifient la structure du sédiment et son intégrité. Ces perturbations peuvent affecter la biodisponibilité des contaminants. De ce fait, les méthodes qui permettent l'évaluation in situ de la qualité du sédiment pourront être plus fiables (demande en oxygène, chimie de l'eau interstitielle, test in situ) dans la mesure où il n'y a plus prélèvement ni manipulation. Cependant ces méthodes sont très souvent délicates ou impraticables, du fait de la nature des sites ou des besoins de l'étude, et il sera nécessaire de procéder à des prélèvements dont il faudra néanmoins évaluer les conséquences sur la "qualité du sédiment".

D'une manière générale, l'échantillonnage par benne favorise la perte des sédiments les plus fins, mais aussi des composés solubles et des volatils. Seul le carottage permet de conserver au mieux la structure du sédiment³⁶.

S'ajoutant à ce premier facteur, d'autres causes de modification de la toxicité des sédiments doivent être évoquées, dont il faudra tenir compte dans l'interprétation des résultats des mesures de toxicité. Ces causes sont de natures différentes. Elles ont trait d'une part à l'évolution de la biodisponibilité des toxiques dans le sédiment du fait des manipulations, d'autre part aux caractéristiques intrinsèques du sédiment et enfin aux conditions de la mesure elle-même.

5.1 MANIPULATION DES SÉDIMENTS

5.1.1 STOCKAGE

Toutes les méthodes de stockage, séchage, congélation ainsi que la température de stockage vont affecter la mesure de la toxicité³⁷.

Il est généralement admis que les sédiments utilisés pour les essais de toxicité ne doivent pas être congelés³⁸ mais stockés à 4°C sans air ou sous azote, et dans des délais les plus courts possibles. Malgré les risques avérés de changements dans la composition du sédiment, certains auteurs ont utilisé la congélation, recommandée en particulier pour le stockage d'échantillons en vue de l'analyse des composés organiques et des nutriments (Rochon *et al.* 1987 cité par Burton 1992³⁶).

Les conditions de stockage modifient également la chimie de l'eau interstitielle, même à la température du milieu prélevé. Des modifications, coagulation et précipitation de la matière humique ont été observées après stockage

de l'eau interstitielle durant une semaine³⁹. De récents résultats ont montré que les effets du stockage (4°C) sur la toxicité des sédiments pouvaient surtout être reliés à leur toxicité initiale plutôt qu'à leur composition (N, P, carbone organique et contaminants métalliques). En particulier, les sédiments non contaminés et non toxiques initialement ne montraient pas de toxicité après stockage. Les sédiments étudiés, des sédiments de surface, échantillonnés sur 37 stations de la côte suédoise ont montré une évolution de leur toxicité variable selon les sites et selon l'essai réalisé. Néanmoins la variation de toxicité enregistrée avec la durée de stockage restait dans les limites de la précision intra laboratoire espérée sur ces essais, avec une variation inférieure à 30 %⁴⁰.

D'une manière générale il apparaît très difficile de prévoir l'évolution de la toxicité d'un sédiment, ce qui confirme la nécessité de réaliser les mesures aussi rapidement que possible après prélèvement et de contrôler rigoureusement les conditions de stockage.

5.2 CARACTÉRISTIQUES DES SÉDIMENTS D'ESSAIS

5.2.1 CARACTÉRISTIQUES GÉOCHIMIQUES

Les propriétés géochimiques naturelles du sédiment, telles que la texture, la taille des particules, la teneur en carbone organique peuvent influencer la réponse des organismes. De ce fait, il est important d'utiliser des organismes présentant une tolérance suffisamment large à ces caractéristiques du sédiment ou de disposer de sédiment témoin similaire au sédiment testé lorsque les limites de tolérance des organismes sont dépassées dans le sédiment contaminé.

De plus, l'interprétation de la réponse toxique peut être délicate si l'on ne dispose pas de facteur de "normalisation" de la biodisponibilité des contaminants présents. Les concentrations chimiques du sédiment doivent être normalisées à l'aide d'autres facteurs que le seul poids sec, tel que le carbone organique pour les composés organiques non polaires ou les sulfures volatils pour les métaux.

5.2.2 EAU SURNAGEANTE

Le temps de contact eau-sédiment lors des essais peut affecter significativement la qualité de l'eau surnageante et en conséquence la réponse des organismes. La demande en oxygène des sédiments (chimique et biologique) peut être importante dans des sédiments

ACTEURS DE VARIATIONS NS LA RÉPONSE TOXIQUE

Tableau 12 . Toxicité aiguë 96H de l'ammoniac pour *H. azteca* (d'après Ankley et al. 1995).

Dureté CaCO ₃ mg/L	pH	CL 50 96H (IC)	
		Ammoniac total (mg N/l)	Ammoniac non ionisé (mg NH ₃ /l)
42	6.5 ± 0.04	22.8 (15.1-34.4)	0.04 (0.03-0.06)
	7.5 ± 0.22	15.5 (14.8-20.7)	0.31 (0.26-0.37)
	8.21 ± 0.31	24.0	2.24
100	6.4 ± 0.09	105 (53.7-203)	0.19 (0.10-0.36)
	7.31 ± 0.25	64 (47.8-85.7)	0.83 (0.62-1.11)
	8.3 ± 0.22	39.8 (34.4-46.0)	6.09 (5.26-7.04)
270	6.55 ± 0.06	>204	>0.37
	7.41 ± 0.16	140 (110-177)	2.14 (1.68-2.71)
	8.45 ± 0.06	35.2 (31.5-39.5)	5.38 (4.82-6.04)

riches en nutriments ou en substances réductrices et nécessiter une aération du milieu. La solubilisation de composants du sédiment, tels que les carbonates, peut augmenter la dureté et affecter la biodisponibilité de divers métaux (cadmium, cuivre). De même, des modifications du gradient redox et une augmentation de l'oxygénation peuvent diminuer le taux de sulfures dans le sédiment et induire le relargage de métaux biodisponibles⁴¹.

La qualité de l'eau surnageante, non directement liée à la présence de contaminants, et en particulier le taux d'oxygène dissous ou la présence d'ammoniac, va modifier la survie ou la croissance des organismes.

5.2.2.1 OXYGÈNE DISSOUS

La forte demande en oxygène de certains sédiments peut très rapidement entraîner une diminution drastique de la concentration en oxygène dissous du milieu, susceptible d'induire des mortalités chez les organismes d'essai.

Des essais menés sur la survie et la croissance de *H. azteca* ont montré que cet organisme avait une sensibilité à l'hypoxie comparable à celle d'autres microcrustacés couramment utilisés (*D. magna*, *D. Pulex*), avec une CL50 96h et une concentration minimale sans effet respectivement < 0.3mg/l et > 1.2 mg/l (reproduction)⁴².

5.2.2.2 AMMONIAC

Lors d'essais menés directement dans l'eau Ankley *et al.* (1995⁴³) ont mesuré la toxicité de l'ammoniac sur *H. azteca* dans des eaux de dureté différente et à plusieurs pH. Leurs résultats (Tableau 12) mettent en évidence une sensibilité importante de cet amphipode à toutes les formes de l'azote ammoniacal, en particulier dans les eaux les plus douces. Avec l'accroissement de la dureté, la toxicité de l'ammoniac diminue et devient pH-dépendante.

Les effets toxiques de l'ammoniac ont été également mesurés sur des durées d'exposition plus longues. Dans ce cas également, ils sont fonction de la concentration en ammoniac total du milieu plutôt que de la fraction d'ammoniac non ionisée. La CL50 de l'ammoniac après 4 semaines d'exposition (jeunes ou adultes) est de l'ordre de 13 mg N/l. La croissance n'apparaît pas significativement affectée par l'ammoniac⁴⁴.

La sensibilité à l'ammoniac de *C. tentans* a également été mesurée lors d'essais en continu (10 jours), mais en l'absence de substrat, et à 4 pH (6.3, 7.2, 7.8, 8.6)⁴⁵. Les organismes ont été plus sensibles à l'ammoniac total à pH élevé qu'à pH faible, suggérant une toxicité prépondérante de NH₃ pour *C. tentans*. La CL50 varie de 368 mg N/l à pH 6.5 (0.72 mg NH₃/l) à 8.24 mg N/l (13.8 mg NH₃/l) à pH 8.6.

5.2.3 ORGANISMES INDIGÈNES

Des organismes indigènes sont en général présents dans les échantillons de sédiment. La présence d'espèces proches, sur le plan taxonomique, des espèces d'essai peut rendre difficile l'interprétation. De plus, des phénomènes de compétition ou de prédation peuvent se développer. Par exemple la présence de sangsue dans les échantillons d'essai peut induire de faux positifs ou rendre le test invalide. En effet, lors d'essai où des sangsues étaient présentes dans les récipients, le taux de survie des organismes variait de 6 % à 0 %.

De même, des densités d'oligochètes équivalentes à celles trouvées dans beaucoup de sites contaminés, si elles ne modifient pas la survie des organismes, peuvent réduire la croissance de *C. riparius* (> 90%) et *H. azteca* (>60%)⁴⁶ et affecter l'interprétation des résultats des tests de toxicité basée sur les mesures terminales chroniques. Aussi il est recommandé d'enlever les organismes autochtones lorsque des tests sont conduits avec des

sédiments d'eau douce qui comportent de fortes populations d'invertébrés benthiques, spécialement des vers oligochètes. Plusieurs auteurs ont proposé d'éliminer les organismes indigènes (par chauffage, ajout d'antibiotique ou irradiation gamma).

Même si cette dernière méthode induit probablement le moins d'altération du sédiment, la croissance des *Chironomus* est accrue dans des sédiments stérilisés par autoclavage ou rayonnement gamma. Cela peut être dû au fait que *Chironomus*, qui se nourrit aussi bien de particules de sédiments que de matériel organique, trouve plus de matériel organique disponible dans les sédiments stérilisés (flores et faunes indigènes tuées, relargage de matière organique⁴⁷).

5.3 MODALITÉS DE RÉALISATION DES ESSAIS

5.3.1 MANIPULATIONS DU SÉDIMENT

Les effets de divers traitements utilisables pour l'élimination des organismes indigènes de sédiments non contaminés et contaminés ont été évalués vis à vis de leur toxicité sur trois espèces d'invertébrés benthiques (*H. azteca*, *C. riparius* et *T. tubifex*). L'effet de la congélation (-20°C) et du tamisage (2mm, 500 µm et 250 µm) a en particulier été étudié (ainsi que l'autoclavage et l'irradiation gamma) à la fois sur la chimie du sédiment (nutriments, métaux, HAP et PCB) et sur la toxicité. *H. azteca* est l'organisme le plus sensible aux effets des diverses manipulations réalisées et présente une diminution de survie dans les sédiments stérilisés. La survie du chironome *C. riparius* n'est pas affectée par les traitements, tandis que sa croissance est améliorée dans les sédiments autoclavés. La distribution des tailles de particules, les métaux, nutriments et HAP varient peu avec la manipulation ; néanmoins le tamisage le plus fin réduit la teneur en carbone organique total et la concentrations en PCBs. Le tamisage humide de sédiment à l'aide de spray ou d'eau (eau de ville) sous pression n'induit pas de pertes significatives de matériaux organiques et de contaminants⁴⁷.

5.3.2 RENOUVELLEMENT ET DÉBIT

Différentes conditions d'exposition peuvent être mises en œuvre lors des essais de toxicité du sédiment, qui sont susceptibles de modifier la réponse des organismes :

statiques, semi-statiques, par recirculation du milieu ou en continu. La comparaison de ces méthodologies a conduit dans certains cas à des différences significatives de réponse toxique^{48,49}. Les méthodes d'exposition avec renouvellement en continu de l'eau surnageante conduisent à des survies plus importantes. Ceci est probablement dû à l'élimination avec l'eau surnageante des contaminants désorbés du sédiment. Lors des essais sur sédiments entiers, l'utilisation d'un faible taux de renouvellement est recommandé (< 4 fois le volume du récipient d'essai) afin de conserver une qualité de l'eau surnageante permanente et de réduire l'élimination des contaminants du milieu d'exposition⁴⁸.

5.3.3 DURÉE D'EXPOSITION

La sensibilité des organismes à la présence de contaminants est en général d'autant plus élevée que la période d'exposition sera plus longue. En effet, la concentration de contaminants dans les sédiments peut ne pas induire de mortalité aiguë mais modifier les possibilités de développement, de croissance ou de reproduction des organismes. Il est ainsi possible de mesurer des modifications de reproduction et de croissance sur *H. azteca* pour des essais d'une durée de 28 jours, ou la croissance et l'émergence des chironomidae (*C. tentans*, *C. riparius*) après 10 à 15 jours d'exposition.

5.3.4 ÂGES DES ORGANISMES D'ESSAI

La sensibilité de *H. azteca* ne semble pas varier, au moins jusqu'à 24 à 26 jours d'âge. La toxicité du diazinon, du cuivre, zinc et cadmium est similaire lors d'exposition de 96h quelque soit l'âge des organismes d'essai (de 2 à 26 jours)²⁴.

L'utilisation d'organismes âgés de 7 à 14 jours lors des essais paraît donc représenter correctement la sensibilité des organismes.

Par contre, le premier et le second stade larvaire des chironomides sont plus sensibles que les 3 et 4ème stades. Le premier stade larvaire de *C. tentans* est de 6 à 27 fois plus sensible à une exposition aiguë au cuivre que le 4ème stade⁵⁰. De même le premier stade larvaire de *C. riparius* est 127 fois plus sensible à une exposition aiguë au cadmium que le second stade⁵¹.

Dans les essais chroniques, les premiers stades larvaires de ces organismes sont apparus aussi sensibles que les daphnies à certains composés organiques et inorganiques⁵². De ce fait, les essais sur sédiment avec *Chironomus* sp devront être réalisés systématiquement avec des organismes de même âge et taille (1er ou début du 2ème stade) pour éviter des différences importantes de sensibilité et de réponse.

5. FACTEURS DE VARIATIONS DANS LA RÉPONSE TOXIQUE



5.3.5 ALIMENTATION DES ORGANISMES

L'apport de nourriture durant les essais sur sédiment (de même que lors des essais avec des effluents ou des substances pures) peut affecter l'exposition aux toxiques ainsi que les taux d'accumulation et d'élimination.

Sans apport de nourriture, les organismes peuvent se trouver dans des conditions de jeûne sur des durées trop longues; mais l'addition de nourriture peut conduire à modifier la biodisponibilité des contaminants dans le sédiment⁵³ et favoriser le développement bactérien. De ce fait, la quantité de nourriture devra être ajustée au minimum.

Lors d'une étude sur l'effet de l'apport de nourriture sur la bioaccumulation de composés chlorés (HAP, DDT et chlordane) par les larves de *C. riparius*, Harkey *et al.* (1994)⁵⁴ ont en effet montré que la biodisponibilité des contaminants pouvait être modifiée avec l'ajout de nourriture. Mais cette modification, bioaccumulation supérieure ou inférieure chez les organismes nourris par rapport aux non nourris, a varié avec la durée d'exposition et la nature du contaminant. De ce fait, ce phénomène apparaît comme spécifique par substance, et difficilement prévisible actuellement.

Une étude systématique de définition des conditions d'essai sur sédiment pour *H. azteca* et *C. tentans* a été conduite afin de définir des conditions "optimales" visant à réduire l'apport de nourriture et le débit de renouvellement du milieu tout en conservant des qualités d'eau surnageante acceptables (O₂ dissous) et en favorisant la survie et la croissance des organismes. Les conditions d'essai testées ont varié de 0 à 4 renouvellement par jour avec des apports de nourriture de 0 à 4 mg de YCT^e /jour. Les suivis réalisés (O₂, ammoniac, survie et croissance) montrent qu'avec un apport de nourriture de 4mg/Jour et un renouvellement de milieu de 4 fois par jour, les paramètres suivis sont satisfaisants.

Le suivi des contaminants (ammoniac, cuivre, zinc et dieldrine) dans l'eau interstitielle, sous ces conditions, permet de penser que celles-ci ne diminuent pas de manière significative les concentrations d'exposition des organismes, même si dans certains cas on peut noter des concentrations plus élevées dans l'eau interstitielle en conditions statiques⁵⁵.

5.4 CONCLUSIONS

L'évaluation de la contamination des sédiments au moyen de bioessais en laboratoire est actuellement couramment réalisée dans de nombreux laboratoires aux Etats Unis, Canada et en Europe. Des programmes européens de recherche ont d'ailleurs porté sur la standardisation de quelques aspects méthodologiques de ces essais⁵⁶.

En France, si un grand nombre de travaux et une importante expérience existent sur la bioévaluation in situ de la qualité des sédiments, à notre connaissance peu d'équipes s'intéressent à la mesure de la toxicité du sédiment au laboratoire.

Cette approche est néanmoins indispensable pour évaluer les effets des contaminants sensu stricto, en s'affranchissant des variables physiques, hydrauliques et trophiques qui peuvent affecter la réponse des organismes in situ. Elle permet ainsi la comparaison de sites très différents, et un suivi dans le temps de la qualité des sédiments.

Cette approche permet également d'expérimenter en laboratoire la toxicité des substances, et est actuellement largement utilisée pour proposer des concentrations seuils dans les sédiments.

Néanmoins notre analyse bibliographique montre que ces méthodologies sont délicates à mettre en œuvre. En effet, si les méthodes biologiques à maîtriser ne sont pas très difficiles, bien que nécessitant une expérience certaine, la "manipulation" du sédiment qui est une matrice complexe et rapidement perturbée chimiquement peut entraîner des confusions importantes dans l'interprétation des résultats. Il sera donc indispensable de mettre en place et de suivre des protocoles d'essai rigoureux et reproductibles.

^e mélange de levure, cerophylle, nourriture poisson



6. ESSAIS SU

En vue de mettre en application les méthodes d'essais de toxicité du sédiment sur *H. azteca* et *C. riparius*, en cours de développement au laboratoire, plusieurs campagnes d'essai ont été réalisées sur des échantillons de sédiments prélevés sur des stations de l'Ain, du Rhône et de la Saône. D'autre part, nous avons pu réaliser des essais sur sédiments contaminés de la Moselle (M1 à M5) dont nous avons intégré les résultats au jeu de données utilisé dans les analyses statistiques.

Les essais ont été accompagnés d'analyses physico-chimiques classiques (sédiments et eau interstitielles) et d'analyses de micropolluants^f. Une mesure de la toxicité de l'eau interstitielle a été réalisée à l'aide d'un essai sur hydre (*Hydra attenuata*), simultanément aux essais sur sédiments entiers.

Conjointement à ces essais sur sédiments naturels, des essais sur sédiment contrôle artificiel ont été réalisés.

Plusieurs objectifs ont été poursuivis :

- évaluer la variabilité des survies et croissances dans les essais contrôles,
- suivre la toxicité de quelques sédiments au cours du temps,
- comparer, lorsqu'elles sont disponibles, les données chimiques et biologiques sur les mêmes prélèvements de sédiment, en relation avec les valeurs seuils publiées.

6.1 LES SÉDIMENTS TESTÉS

Le Tableau 13 récapitule les différentes stations échantillonnées.

De plus, 9 essais sur sédiment contrôle (sable) ont été effectués durant la période de l'étude.

2 modes d'essais ont été utilisés, soit en semi statique avec renouvellement de l'eau surnageante au cours de l'essai, soit en continu.

6.2 MATÉRIELS ET MÉTHODES

Tous les sédiments testés en octobre 1997 ont été prélevés par le service de la navigation, les autres ont été prélevés par le Cemagref à la benne ou la drague suivant les cas.

Après homogénéisation des échantillons prélevés, le sédiment est stocké en bocaux de verre de 2 litres, fermés hermétiquement et conservés au froid (glacière).

Les prélèvements sont ensuite stockés en chambre froide ($T^{\circ} < 7^{\circ}\text{C}$) dès leur arrivée au laboratoire le jour même. Des analyses physico-chimiques ont été réalisées sur la fraction solide et l'eau interstitielle des sédiments.

Vingt quatre heures après leur arrivée au laboratoire, les sédiments humides sont tamisés à 2 mm pour éliminer les plus gros débris.

Environ 250 ml d'eau interstitielle sont récupérées à l'aide d'une centrifugation à 10 000 g à 4°C pendant 30 mn.

100 ml de sédiment tamisés sont ensuite répartis dans chacun des 5 récipients d'essai (5 répliqués par sédiment et par organismes test) et conditionnés (mise en place l'aération, contrôle de la température) pour la suite de l'essai.

Le lendemain, les organismes tests (10 par répliqués) sont placés dans chaque récipient.

Lors de chaque série d'essai, une série témoin est réalisée à l'aide de sédiment artificiel : sable de Loire ϕ 0.5 mm dans des conditions identiques, ou sable de Fontainebleau (ϕ 016 - 0.20 mm).

Deux types d'essais ont été réalisés sur le sédiment entier, après tamisage à 2mm : un essai sur Chironomes d'une durée de 10 jours en conditions semi-statique avec aération continue du milieu, ou en continu, et un essai sur Hyalelles d'une durée de 14 jours dans les mêmes conditions (voir protocoles d'essai). Les organismes sont nourris chaque jour.

En début d'essai, l'âge des organismes varie de 4 à 5 jours pour *Chironomus* et 2 à 9 jours pour *Hyalella*.

Chaque jour, les paramètres physico-chimiques suivants ont été mesurés dans les répliqués : conductivité, température, oxygène dissous, pH, ammonium et nitrites.

^f analyses réalisées par le Laboratoire Départemental d'Analyses (L.D.A) de Valence (26)

R SÉDIMENTS NATURELS

Tableau 13 . Stations échantillonnées et mesures biologiques et chimiques disponibles

	Port Galland	Ile Barbe	Saint Bernard	Jons	Chasse sur Rhône	Saint Vallier
Dates	avril, octobre, novembre 97	avril et octobre 97	octobre 97	octobre 97	avril, octobre, décembre 97 et janvier 98	avril 1997 et janvier 98
Nombre d'essais	3 (PG1 à 3)	2 (IB 1 et 2)	1 (SB)	1 (J)	4 (CR1 à 4)	2 SV1 et 2
Rivière	Ain	Saône	Saône	Rhône	Rhône	Rhône
Station RNB	92000	59500	53800	92500	98000	10400
Physico-chimie	sédiment, eau interstitielle	sédiment, eau interstitielle				
Micro-polluants	oui (04/97, 09/97, 11/97)	oui (10/97)	oui (10/97)	oui (10/97)	oui (10/97)	
Biologie In situ	indice oligochète	indice oligochète			indice oligochète	indice oligochète
Sédiment entier	survie, taille <i>H. azteca</i> , survie, poids <i>C. riparius</i>	survie, taille <i>H. azteca</i> , survie, poids <i>C. riparius</i>	survie, taille <i>H. azteca</i> , survie, poids <i>C. riparius</i>	survie, taille <i>H. azteca</i> , survie, poids <i>C. riparius</i>	survie, taille <i>H. azteca</i> , survie, poids <i>C. riparius</i>	survie, taille <i>H. azteca</i> , survie, <i>C. riparius</i>
Eau interstitielle	Survie <i>H. attenuata</i>	Survie <i>H. attenuata</i>				

6.3 RÉSULTATS

6.3.1 CARACTÉRISTIQUES PHYSICO-CHIMIQUES DES PRÉLÈVEMENTS

Plusieurs prélèvements ont été réalisés sur la durée de l'étude, sur les mêmes stations.

La Figure 6 illustre les principales caractéristiques mesurées sur ces différents prélèvements.

Le sédiment prélevé sur l'Ain (PG) est caractérisé par une plus importante fraction carbonatée que ceux prélevés sur les différentes stations du Rhône.

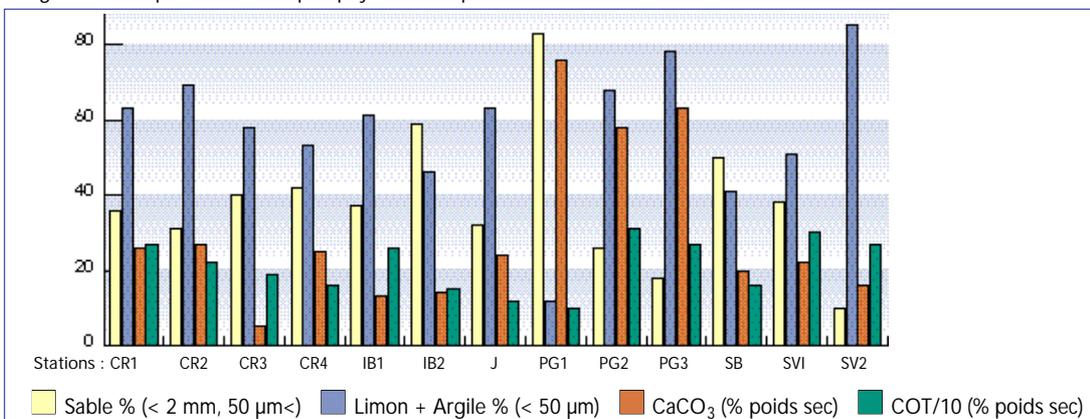
Le prélèvement PG1 sur l'Ain est également particulier

dans la mesure où la fraction sableuse a été élevée (83 %), en même temps que celle du Carbone Organique Total (% du poids sec) était la plus faible.

La teneur en COT de ces sédiments varie autour de valeurs moyennes de 2 à 3,6 % pour les plus riches (PG3). Sur cette station, suivant l'échantillon prélevé, les proportions des deux fractions granulométriques mesurées (<50µm et >50 µm) ont varié, de même que les caractéristiques chimiques, en particulier le COT.

Les sédiments prélevés sur les stations de la Saône sont ici moins riches en COT que ceux des stations du Rhône et de l'Ain. Les valeurs sont néanmoins toujours moyennes, autour de 3 %, et ne font pas ressortir de "typologie" particulière de ces stations.

Figure 6. Quelques caractéristiques physico-chimiques des sédiments testés.



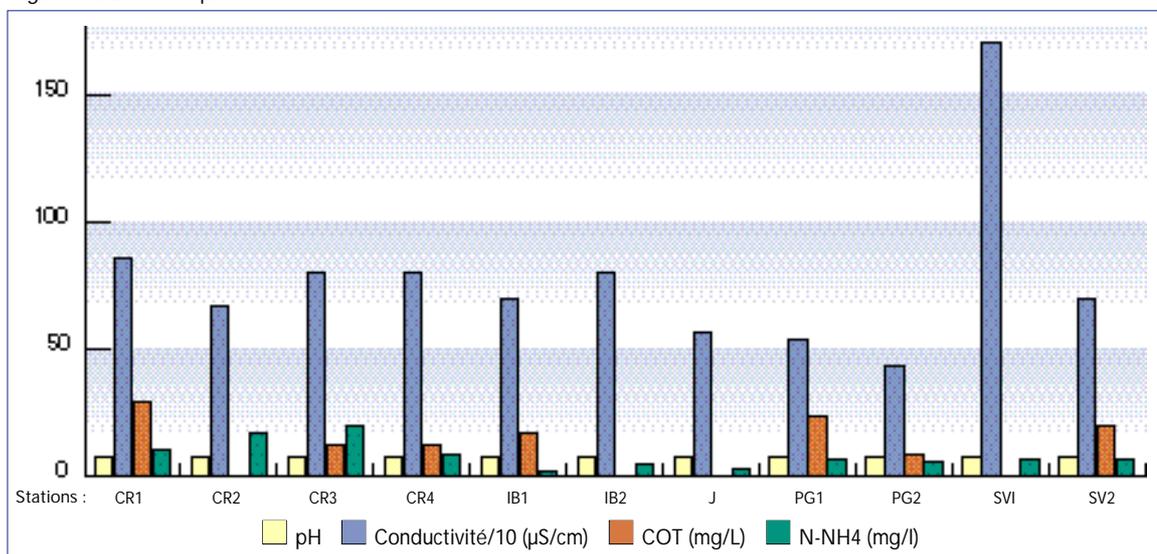
En ce qui concerne la qualité de l'eau interstitielle, la teneur en azote ammoniacal est peu élevée, sauf sur le site le plus contaminé de Chasse sur Rhône où la teneur est toujours supérieure à 10mg/l. Ces valeurs restent cependant modérées au regard d'autres sites plus contaminés (jusqu'à 60mg/l sur certaines stations de la Moselle par exemple).

Des données physico-chimiques sur les micropolluants métalliques et organiques sont disponibles sur quelques-uns des sédiments testés.

Nous avons reporté dans la Figure 7 le profil de contamination des sédiments étudiés.

Par souci de simplification, nous n'avons présenté ici que les sommes des métaux et des principales molécules organiques détectées.

Figure 7. Caractéristiques de l'eau interstitielle



6. ESSAIS SUR SÉDIMENTS NATURELS

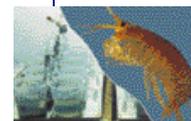
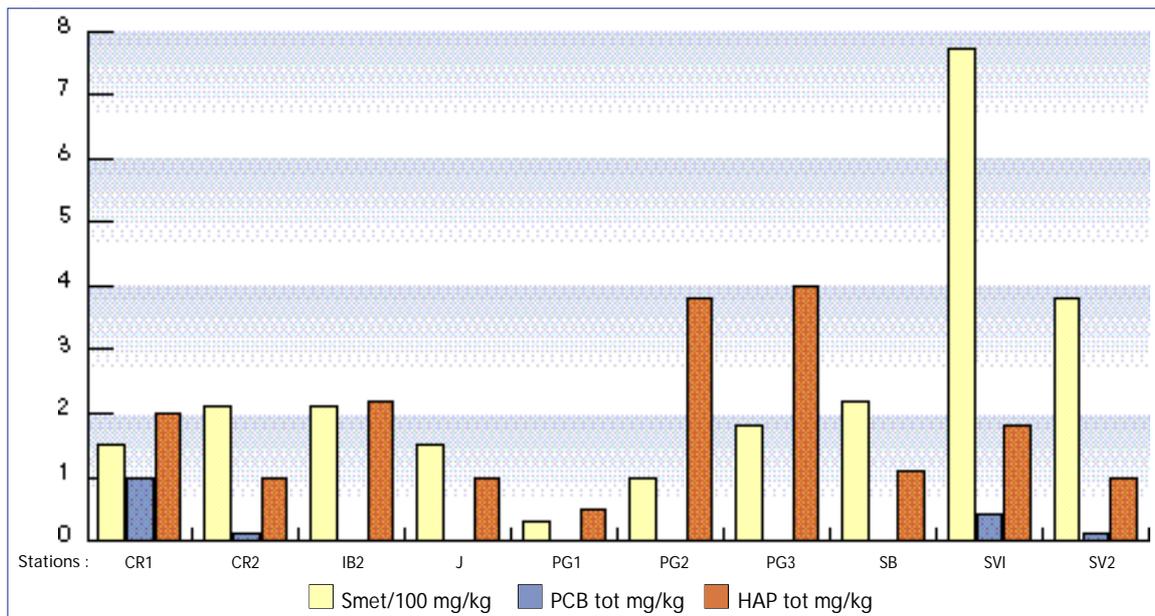


Figure 8. Profil de contamination par les micropolluants



Néanmoins, la nature de la contamination par chacune des espèces chimiques (métaux et micropolluants) devra être considérée pour une mise en relation avec la toxicité (figure 8).

Concernant les métaux, l'observation des données montre que les concentrations en arsenic et mercure sont indépendantes des concentrations métalliques totales mesurées. Inversement, les concentrations des autres éléments métalliques sont bien corrélées avec la somme des métaux.

Le site de Saint Vallier sur le Rhône se caractérise par la pollution métallique la plus importante, représentée plus particulièrement par du zinc, chrome et cuivre. Cette station présente également la plus forte concentration en cadmium (1,2 à 4 mg/kg).

La station de Port Galland présente en moyenne la plus faible contamination métallique.

D'une manière générale les niveaux de contaminations métalliques et organiques n'apparaissent pas liés entre eux dans les stations échantillonnées, non plus que les contaminations par HAPs et PCBs détectées.

Sur la station PG de l'Ain, aucune contamination par les PCBs n'est détectée dans nos échantillons. En revanche les concentrations en HAPs sur les deux derniers prélèvements effectués sont élevées.

Seules les stations du Rhône présentent des contaminations en PCBs détectables.

6.3.2 RÉSULTATS BIOLOGIQUES

Les résultats présentés concernent :

1. d'une part, l'analyse de la variabilité des résultats biologiques obtenus dans nos conditions d'essai témoin, en relation avec les paramètres les plus significatifs des essais (concentration en ammoniac, nitrites, oxygène dissous) et le mode d'essai (semi statique ou continu) susceptibles d'être des facteurs de confusion dans l'interprétation des résultats, afin de proposer des critères d'acceptabilité des essais dans nos conditions de laboratoire,
2. d'autre part, une analyse des résultats des essais sur sédiments contaminés en regard des données de contamination physico-chimique disponibles,
3. enfin, dans la mesure où nous disposons d'informations sur la toxicité de l'eau interstitielle de quelques uns des sédiments étudiés, nous en présenterons les résultats conjointement avec la toxicité de la fraction particulaire.

Tableau 14. Caractéristiques moyennes des essais chironomes et hyalelles sur "sédiment contrôlé".

Variable	Chironomes				Hyalella			
	μ		N	CV%	μ		N	CV %
T°C	20.6	0.75	43	3	20.5	0.87	26	4
pH	8.1	0.15	43	1.8	8.1	0.12	26	1.5
Cond. μ S	740	30.21	43	4.1	742	21.7	26	3
O ₂ mg/l	7.04	0.40	43	6	7.41	0.26	26	3.5
NH ₄ -N mg/l	0.48	0.40	43	83	0.24	0.12	26	50
NO ₂ -N mg/l	0.14	0.14	43	100	0.12	0.08	26	66
% mort	28.14	18.30	43	65	30.38	26.9	26	88.5
Poids mg	0.97	0.2	19	20				

Tableau 15. Qualité et résultats biologiques des essais contrôlés. Essai continu et semi continu.

	Chironomus		Hyalella	
	Continu	Semi continu	Continu	Semi continu
O ₂ mg/l	6.79 ± 0.24 (28) *	7.48 ± 0.11 (20)	7.25 ± 0.21 (16)*	7.75 ± 0.15 (15)
NH ₄ -N mg/l	0.34 ± 0.42 (28) *	0.75 ± 0.15 (15)	0.17 ± 0.06 (10)*	0.37 ± 0.12 (15)
NO ₂ -N mg/l	0.17 ± 0.16 (28)	0.1 ± 0.04 (15)	0.16 ± 0.09 (10)*	0.09 ± 0.01 (15)
% mort	30.7 ± 19.9 (28)	25.5 ± 15.03 (20)	22.5 ± 17.3 (16)*	46 ± 38.1 (15)
poids mg	0.95 ± 0.17 (11)	1.05 ± 0.23 (8)		

*significativement différents du mode semi continu (nombre de données)

6.3.2.1 Variabilité biologique observée dans les échantillons témoins : essais sur chironomes et hyalellas

Les essais menés sur sédiments contaminés sont systématiquement couplés à des essais sur substrat artificiel, constitué par du sable de granulométrie moyenne définie.

Compte tenu de la variabilité des paramètres mesurés pour chaque réplicat dans l'ensemble des essais témoins effectués (11 essais, 04/97 à 04/98), aucun des paramètres physico-chimiques étudiés ne présente d'effet significatif sur les variables biologiques mesurées sur chironomes (survie et poids) et sur hyalelles (survie) (Tableau 14). Pour tous les paramètres physico-chimiques suivis, les valeurs de conditions d'essai mesurées dans l'eau surnageante peuvent être considérées comme acceptables.

Cependant, on note une forte variabilité des résultats sur la survie par réplicat, que l'on ne peut relier à la qualité de l'eau surnageante⁹. Les résultats sur le poids des chironomes sont par contre beaucoup plus stables, dans un même essai et sur l'ensemble des essais.

On peut signaler néanmoins que le mode de réalisation des essais (semi-statique ou continu) a un effet significatif sur les paramètres de la qualité du milieu.

Le Tableau 15 présente les valeurs moyennes pour tous les essais semi-continus et continus réalisés, et leur significativité (test t, p<0.05).

En ce qui concerne *H. azteca*, la survie dans nos essais est également significativement affectée par le mode d'essai utilisé, avec des résultats plus satisfaisants pour les essais réalisés en continu.

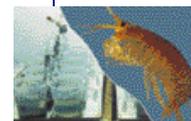
D'une manière générale, les essais en continu permettent de maintenir des conditions plus stables et en particulier de lisser les concentrations d'azote ammoniacal mesurées dans les témoins.

De plus, ils évitent surtout les manipulations nécessaires au renouvellement journalier des milieux.

Plusieurs remarques peuvent être faites à partir de ces résultats :

- L'importante variabilité des résultats de survie : pour les chironomes comme pour les hyalelles, le coefficient de variation de la mortalité sur les 5 réplicats d'un essai est élevé, de plus de 60 %, ce qui affaiblit notablement la sensibilité statistique de l'essai. La survie moyenne est de l'ordre de 70 % (chironomes : 86% max. 60 % min ; hyalella : 90% max, 50 % min), ce qui est inférieur au critère d'acceptabilité (80 %) proposé dans les protocoles de l'US EPA.

6. ESSAIS SUR SÉDIMENTS NATURELS



- Sur les 9 essais témoins réalisés, 5 passent le critère d'acceptabilité sur la survie (>70%) des témoins dans notre sédiment contrôle (4 si le pourcentage considéré est de 80 %). En ce qui concerne les hyalles, les résultats sont identiques sur seulement 8 essais témoins réalisés. Deux hypothèses peuvent être avancées pour expliquer cette qualité médiocre des contrôles :

- d'une part la difficulté à retrouver tous les organismes lors de la lecture en fin d'essai, en particulier pour les hyalles qui sont donc à tort comptés mortes,
- d'autre part la qualité insuffisante du substrat pour la survie des organismes et en particulier pour la survie des larves de chironomes.

Ce dernier point est en cours d'amélioration avec l'ensemencement préalable du sable par de la nourriture avant son utilisation comme substrat contrôle afin de fournir aux organismes une quantité de matière organique suffisante dès le début de l'essai. Les résultats préliminaires, non rapportés ici, obtenus avec ce substrat montrent une amélioration du taux de survie.

Pour ce qui est de la lecture des organismes en fin d'essai, des précautions assez lourdes doivent être prises, en particulier une filtration soigneuse des substrats.

- Les résultats sur la croissance des chironomes sont plus satisfaisants, avec un poids moyen (poids sec) par individu de l'ordre de 1mg et un coefficient de variation de l'ordre de 20 %. Cette valeur est supérieure à la valeur de 0,3mg minimum requise pour les tests sur *C. riparius*¹³,

mais identique à celle de 1,060 mg proposée par Naylor *et al.* 1997⁵⁷. dans des conditions d'essais similaires. A partir de la distribution normale des résultats obtenus jusqu'ici et en ne considérant que les essais pour lesquels la survie a été satisfaisante (>70%), on peut proposer une valeur de poids moyen de 0.96mg par individu avec l'intervalle de confiance suivant (0.83, 1.01).

6.3.2.2. Résultats des essais sur sédiments naturels

Les résultats sur la survie des organismes et sur leur croissance sont comparés au moyen de tests statistiques de comparaison de moyenne (non paramétriques ou paramétriques respectivement) et les résultats sont présentés pour chaque campagne de prélèvement. Les sédiments sont comparés entre eux ainsi qu'au sédiment contrôle.

Campagne avril 1997

4 sédiments ont été testés : PG1 (Ain), IB1 (Saône), CR1 et SV1 (Rhône), ainsi qu'un contrôle (Tem1).

Les résultats obtenus sont résumés dans le Tableau 16. Il s'agit du premier essai réalisé au laboratoire. Les pourcentages de survie obtenus sur le sédiment artificiel sont trop variables par réplicat et trop faibles pour permettre de détecter un effet toxique avec une sensibilité suffisante. Ainsi, aucune différence significative ne peut être mesurée entre les sédiments sur la survie de *Chironomus* (test de comparaison de moyenne non paramétrique de Mann Withney), et ce malgré les résultats observés sur SV1 et CR1.

Par contre, les effets sur la survie des hyalles sont significatifs pour tous les sédiments, hormis le sédiment de l'Ain qui permet quant à lui une meilleure survie des organismes que les substrats contrôles utilisés.

Campagne octobre 1997

5 sédiments ont été testés : PG2 (Ain), IB2, SB (Saône), CR2, J (Rhône), ainsi que trois contrôles (suivant les dates d'essai) : Tem2, Tem3, Tem4.

Les résultats obtenus pour tous les essais semi continus sont résumés dans le Tableau 17.

Comme précédemment, les sédiments sont comparés entre eux et à leur témoin respectif au moyen de test de comparaison de moyenne (non paramétrique de Mann Withney, ou test t pour le poids).

Tableau 16. Résultats biologiques avril 1997

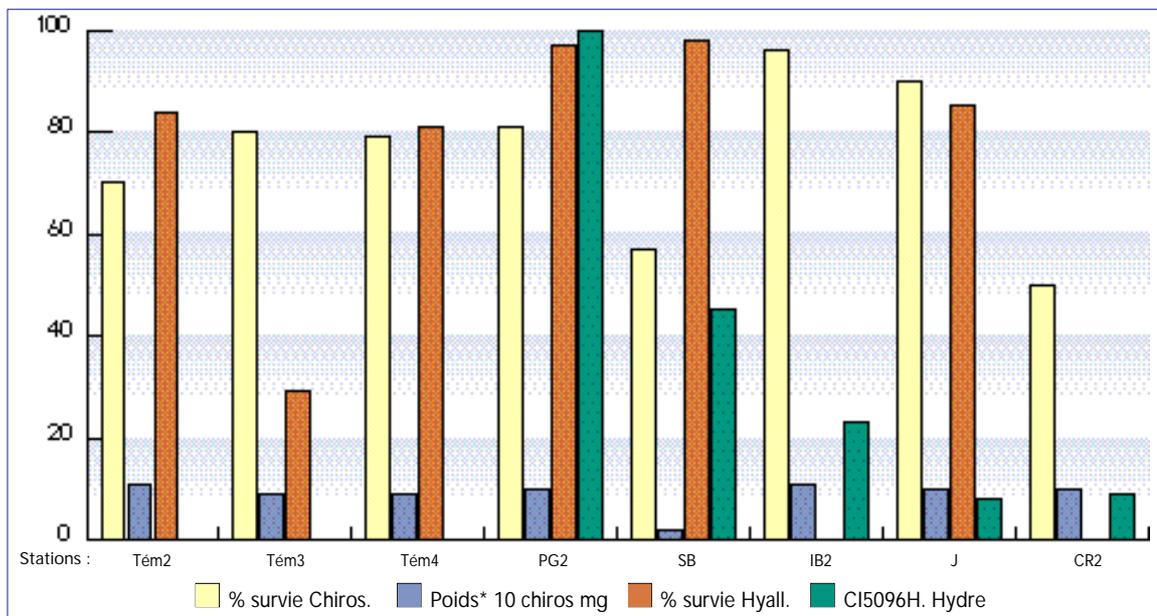
	% survie chironomes	% survie hyalles
Tem1	68	48
PG1	72	80
IB1	88	0
CR1	68	0
SV1	54	0

Tableau 17. Résultats biologiques octobre 1997

	Tem2	PG2	SB	Tem3	CR2	Tem4	IB2	J
% survie chironomes	70	83	60	80	58*	80	94	90
Poids chironomes mg	1.21	1.26	1.27	0.92	0.29*	0.92	0.66*	0.98
% survie hyalles	84	96	98	30	0	80 (continu)	0	86
CL50 96 Hydre			62.5		17.5		37.5	31.3
NOEC Hydres		100	50		10		25	10

(* significativement différent du témoin p<0.05)

Figure 9. Toxicité des sédiments (campagnes octobre 97).



Des essais sur eau interstitielle à l'aide d'un test 96h de survie sur hydre d'eau douce (*H. attenuata*) actuellement en cours de développement au laboratoire, ont été également réalisés. Nous reportons les valeurs de CL50 ou de NOEC observées.

Dans l'essai témoin Tem3 très peu de hyalles ont pu être retrouvées. Dans la mesure où un essai témoin similaire en continu, avec le même lot d'organismes commencé le même jour, a montré un taux de survie de 83 %, les essais sur sédiments naturels associés (J, IB2, CR2) peuvent être considérés comme valides.

La survie des chironomes a été satisfaisante dans tous les contrôles, de même que la croissance.

Hormis le sédiment IB2 et CR2, tous les échantillons ont permis une croissance normale des organismes dans les limites proposées précédemment (poids moyen d'un individu >0.83mg), et seul l'échantillon CR2 s'est ici révélé toxique vis à vis de tous les critères d'effet considérés : survie chironomes et hyalles et croissance chironomes.

Le sédiment IB2 affecte également de manière significative la survie des hyalles et la croissance des chironomes.

Les autres sédiments permettent une survie et croissance variable des organismes, mais toujours dans les limites d'acceptabilité fixées pour les témoins. Aucune différence significative n'est détectée entre les sédiments PG2 et SB.

Par contre, le sédiment J présente une survie des hyalles et une croissance des chironomes significativement plus faible que les sédiments PG2 et SB.

Le graphique ci-dessus résume les résultats obtenus sur ces différents sédiments, tous prélevés dans la même semaine.

Les résultats des essais réalisés sur les eaux interstitielles sont cohérents avec ceux obtenus sur le sédiment entier. Ils confirment la non toxicité du sédiment PG et détectent une toxicité significative sur tous les sédiments, y compris le sédiment SB. Avec cet essai les sédiments CR2 et J se sont avérés les plus toxiques (CL50 = 10%, dilution V/V).

Lors de cette campagne, l'ensemble des essais biologiques réalisés a permis de proposer un classement des sédiments selon le gradient de toxicité croissant suivant : PG2, SB, J, IB2, CR2.

Variations de la qualité des sédiments selon les campagnes

Les résultats des tests réalisés sur les sédiments prélevés lors des campagnes ultérieures sur PG3, CR3 et 4, SV2 sont résumés dans le Tableau 18.

La survie des chironomes a été satisfaisante dans tous les sédiments testés. Par contre, la survie des hyalles est significativement affectée dans tous les essais.

6. ESSAIS SUR SÉDIMENTS NATURELS

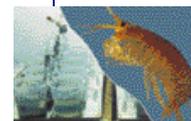
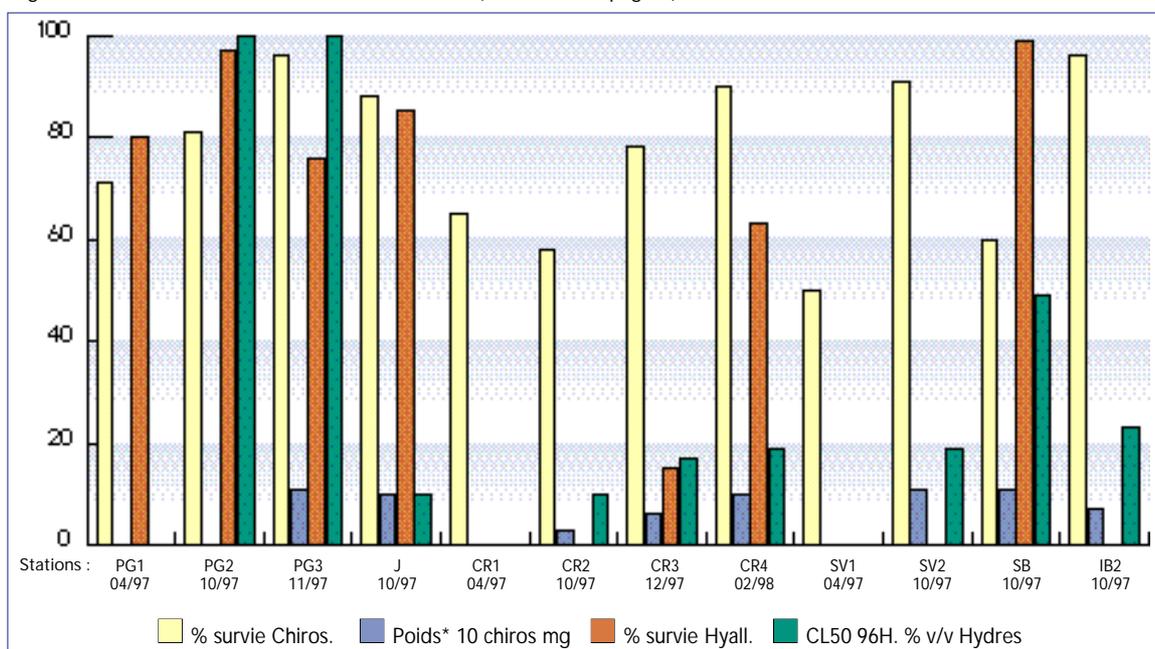


Tableau 18 . Résultats biologiques 12/97-01/98).

	T5	PG3	T6	CR3	T7	SV2	T8	CR4
% survie chironomes	72	95	60	80	40	92	66	90
Poids chironomes mg	1.08	1.25	1.11	0.59*	1.21	1.19	0.90	0.93
% survie hyalles	64	78	id.T5	14*	86	7*	86	62*
CL50 96 Hydre				17.5		18.4		17.5
NOEC Hydres		100						

(* significativement différent du témoins p<0.05)

Figure 10 . Suivi des stations : toxicité des sédiments (toutes les campagnes).



La comparaison des résultats sur les échantillons de sédiment prélevés sur les mêmes stations au cours du temps montre une certaine stabilité, avec une toxicité toujours mesurée sur les stations du Rhône (Figure 10).

Le sédiment prélevé sur la station de l'Ain n'entraîne pas d'effet toxique dans nos conditions d'essai et ce pour les trois campagnes réalisées.

Inversement, sur les stations CR et SV du Rhône et IB de la Saône, un effet toxique constant est mis en évidence et, suivant les cas, pour un ou pour plusieurs critères d'effet considérés.

6.3.2.3. Conclusions

Ces méthodes biologiques de détection de la toxicité sur les sédiments en laboratoire sont assez récentes et depuis peu implantées au laboratoire. Elles sont de plus assez délicates à mettre en œuvre du fait de la matrice complexe à laquelle elles s'adressent.

Des difficultés sont apparues pour maîtriser au laboratoire la reproductibilité des résultats en particulier dans les substrats artificiels utilisés.

Un effort doit être réalisé pour obtenir des résultats plus constants dans les contrôles, avec en particulier une amélioration des caractéristiques granulométriques et nutritives des substrats artificiels. Certains protocoles préconisent l'ajout de tourbe, sphagnum ou équivalent. Cette option reste néanmoins peu satisfaisante, dans la mesure où il est difficile voire impossible de s'assurer d'une qualité constante de celle-ci. Le "vieillisement" préalable du sable utilisé en essai, avec ajout de nourriture pour obtenir une matière organique en décomposition est actuellement en cours d'essai. Les mesures de poids des chironomes apparaissent beaucoup moins variables que la survie dans les sédiments témoins. Les organismes survivants montrent, dans les contrôles, une croissance assez homogène.

Contrairement aux problèmes rencontrés sur la survie avec les substrats contrôles, on observe des résultats beaucoup plus constants sur les sédiments naturels. Le sédiment prélevé sur l'Ain en particulier a toujours permis d'obtenir des résultats satisfaisants et constants sur tous les critères de mesure de toxicité mis en œuvre.

Les résultats que nous avons pu obtenir sur sédiments naturels contaminés mettent en évidence une plus grande sensibilité de la survie des hyalelles. Sur les 13 échantillons de sédiment naturels testés, ce critère d'effet détecte 8 échantillons toxiques contre 3 pour les chironomes, survie et croissance considérées. De ce fait, cet organisme apparaît donc actuellement le plus intéressant à utiliser, en particulier pour une première évaluation rapide de la toxicité des sédiments.

Néanmoins il nous semble indispensable de conserver une approche multi-espèce pour mesurer les dangers toxiques des sédiments, du moins tant que l'on ne disposera pas d'informations plus nombreuses sur la sensibilité des organismes benthiques, en particulier du fait de leurs modes d'exposition variés aux contaminants des sédiments tels que métaux, HAPs, solvants chlorés, pesticides.

Enfin, sur les stations échantillonnées, il ressort globalement un gradient de toxicité des sédiments, avec des effets croissants depuis les zones amont Lyon aux stations aval où l'on peut mettre en évidence de manière constante des effets biologiques significatifs plus ou moins importants selon la date de prélèvement.

6.3.3 QUALITÉ CHIMIQUE ET RÉPONSE TOXIQUE.

Les méthodes d'évaluation de la toxicité des sédiments présentées ici ont pour objectif de permettre un classement des échantillons étudiés, en particulier en relation avec la présence de contaminants plus ou moins dangereux pour les biocénoses en place. Dans la mesure où les processus contrôlant la biodisponibilité des contaminants et les phénomènes d'interaction sont loin d'être établis dans ces matrices complexes, ils permettent de donner une réponse globale à la multi-contamination tout en tenant compte des caractéristiques sédimentaires. Actuellement se mettent en place au niveau international et national des objectifs de qualité des sédiments, basés en particulier sur des concentrations par espèce chimique couplées à une probabilité d'effet biologique. Un tel exercice est délicat dans la mesure où l'on affecte des niveaux d'effets biologiques, appréciés le plus souvent sur des contaminations multiples, à des seuils de concentration par substance. Même si ces seuils sont statistiquement définis, ils restent dépendants du jeu de données d'origine. Nous avons néanmoins tenté de mettre en relation les niveaux de contamination mesurés

aux effets biologiques observés dans nos échantillons.

Sur les 10 échantillons pour lesquels nous disposons des informations suffisantes, nous avons effectué une analyse des résultats par régression linéaire multiple^h et recherché les éventuelles corrélations entre les données biologiques (respectivement % survie et poids) et les différentes variables physico-chimiques disponibles : contaminants (métaux, HAPs et PCB, ammoniac de l'eau interstitielle) et paramètres de contrôle de la biodisponibilité (tels que COT, CaCO₃).

Nous avons également utilisé dans notre approche comparative les seuils de toxicité déjà proposés pour les métaux, quelques HAPs, la somme des HAPs totaux et la somme des PCBs. Pour ce faire, nous avons considéré les "Threshold" et "Probable Effect Level" définis par Environnement Canada pour les eaux douces⁵⁸ ; ces seuils pouvant différer plus ou moins suivant les moléculesⁱ des "Effect" et "Median Range Level"⁵⁹ déterminés par la NOAA américaine sur des données d'eau douce et marine. Dans le Tableau 19 sont résumées les valeurs seuils utilisées. Les données pour les HAPs sont des valeurs américaines proposées par le FDEP⁶.

Tableau 19. Seuils de contamination toxique

mg/kg poids sec	TEL	PEL
Arsenic	5.9	17
Cadmium	0.596	3.53
Chrome	37.3	90
Cuivre	35.7	197
Plomb	35.0	91.3
Mercuré	0.174	0.486
Nickel	18.0	35.9
Zinc	123	315
µg/kg poids sec		
Phénanthrene	41.9	515
Benzo(a) anthracène	31.7	385
Benzo (a) pyrène	31.9	782
Chrysène	57.1	862
Fluoranthène	111	2355
Pyrène	53	875
HAPs faible pds moléculaire ⁵⁹	312	144
HAPs pds. moléculaire élevé ⁵⁹	655	6676
HAPs totaux ⁵⁹	1684	16770
PCBs ⁵⁹	34.1	277

6. ESSAIS SUR SÉDIMENTS NATURELS

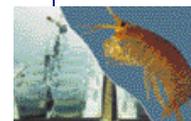


Tableau 20. Concordance toxicité et concentrations chimiques "normalisées".

	PG1	PG2	PG3	J	SB	IB2	CR1	CR2	SV1	SV2
Nbre de [] > TEL	0	1	3	4	5	3	3	5	8	8
Médiane quotient (TEL)	0.10	0.24	0.62	0.30	0.79	0.81	0.63	0.73	1.38	1.10
Médiane quotient (PEL)	0.0	0.16	0.24	0.22	0.48	0.35	0.19	0.35	0.92	0.53
Quotient	1,14	2,77	4,69	4,91	11,43	10,2	8,32	9,42	25,63	12,52
Toxicité sédiment	-	-	-	-	-	++	+	++	+	+

"- " aucun effet biologique significatif, "+" 1 effet biologique au moins significatif, "++" plus d'un effet biologique significatif

Ces concentrations seuils ont permis de calculer les rapports [concentration mesurée_{ci}] / [concentration seuil_{ci}]. Ces rapports (ou leur somme pour les métaux et les HAPs) ont été entrés comme variables explicatives éventuelles des effets biologiques. Nous utilisons la somme des concentrations en faisant l'hypothèse d'un effet principalement additif des contaminants présents dans le milieu. Cette somme des concentrations en micropolluants (métaux, HAPs, PCBs), normalisées par leur valeurs seuils TEL et PEL, permet de rendre compte de façon globale, bien qu'assez grossière, de l'état de contamination chimique du milieu associée à une probabilité d'effet toxique pour les biocénoses.

Les figures 11 a, b, c, présentent le profil de cette contamination toxique par type de micropolluants détectés et illustrent les comparaisons entre effets et niveaux de contamination toxique pour chaque échantillon.

Lorsque cette somme est supérieure à 10 (calculée pour 8 métaux, la somme des HAPs et des PCBs), on peut penser que la contamination présente peut entraîner un effet nocif sur les biocénoses les plus sensibles (quotient calculé en fonction du TEL) ou un effet toxique significatif (quotient calculé en fonction du PEL).

Plusieurs des sédiments étudiés, en particulier les sédiments du Rhône aval, sont significativement contaminés par des concentrations métalliques susceptibles de présenter une toxicité plus ou moins importante (>10). Seuls les sédiments PG2, PG3 et IB2 présentent des contaminations en HAPs suspectes d'être nocives pour les biocénoses sensibles (>1). La contamination par les PCBs n'est significative dans aucune des stations, en terme de risque toxique.

6.3.3.1 Résultats de l'analyse statistique

Sur le jeu de données disponibles, aucun facteur significatif pouvant expliquer la réponse biologique, mortalité ou croissance, ne peut être statistiquement mis en évidence, quelles que soient les variables utilisées dans la régression. On ne calcule pas non plus de corrélation significative entre les variables biologiques et les différentes variables chimiques mesurées (normalisées ou non par les concentrations seuils).

6.3.3.2 Approche par concentrations seuils

Bien que notre jeu de données soit limité (10 échantillons de sédiments étudiés avec chimie et biologie disponibles), nous avons également comparé la toxicité mesurée lors des essais avec les concentrations chimiques toxiques "normalisées" par les valeurs seuils indiquées plus haut. Le Tableau 20 synthétise les informations disponibles sur les différents sédiments étudiés :

- le nombre de valeurs supérieures au seuil TEL pour chaque sédiment,
- les valeurs médianes de la distribution des quotients, [Ci]/TELi calculés pour tous les contaminants détectés,
- les valeurs médianes de la distribution des quotients, [Ci]/PELi calculés pour tous les contaminants détectés,
- la somme des quotients.

Le Tableau 20 montre qu'il existe une certaine concordance entre les résultats biologiques et le niveau de contamination détecté. Même s'il est illusoire sur un jeu de données aussi limité, tant en nombre qu'en variété de situations échantillonnées (6 stations représentées sur les 10 sédiments du jeu de données), de proposer des données chiffrées généralisables permettant de relier effets toxiques potentiels et multi contamination, on peut remarquer que l'on détecte ici un effet toxique pour 5 sédiments sur 6 lorsque la valeur médiane de la distribution des quotients est égale ou supérieure à 0.63 (i.d. lorsque 50 % des contaminants ont une valeur égale ou supérieure à 0.63 fois le seuil de toxicité).

Seul l'échantillon de Saint Bernard, avec une médiane de 0.79, présente une réponse hors gamme dans la mesure où nous n'avons pas révélé ici de toxicité alors qu'il présente une contamination chimique équivalente ou supérieure aux autres échantillons.

^h A l'aide du logiciel Statistica, Statsoft 1996, version 5

ⁱ D'un facteur 4 environ pour les métaux, et jusqu'à un facteur 10 pour certains hydrocarbures par exemple

^j National Oceanic and Atmospheric Administration (USA)

^k Florida Department of Environmental Protection (Mac Donald 1994)

Figure 11 a. Profil de contamination et toxicité associée (métaux)

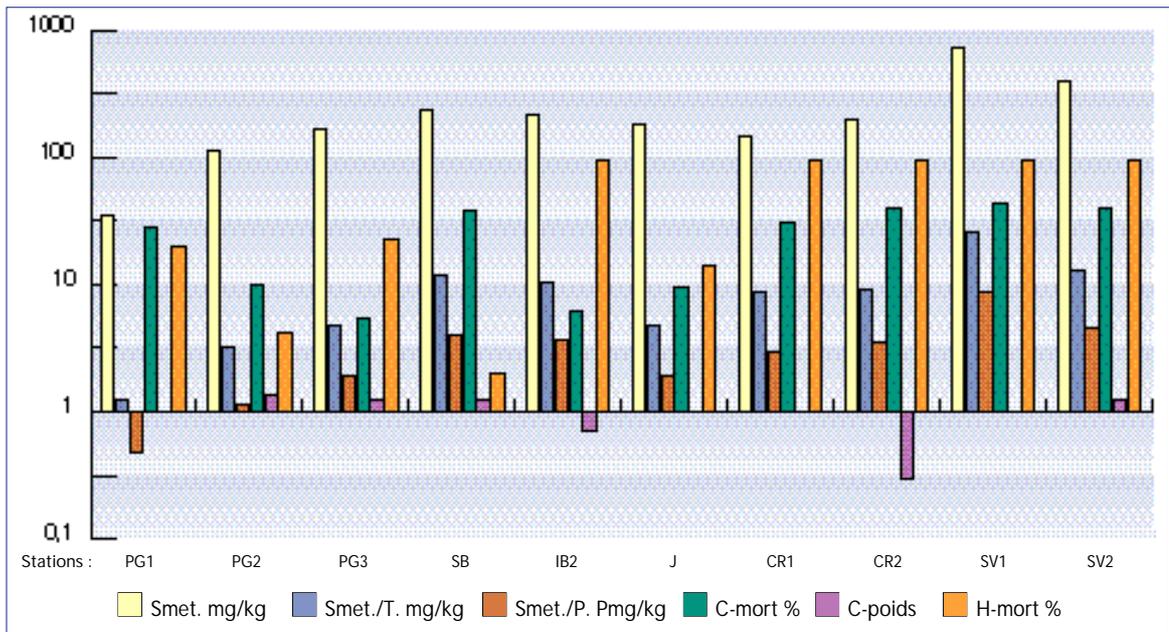
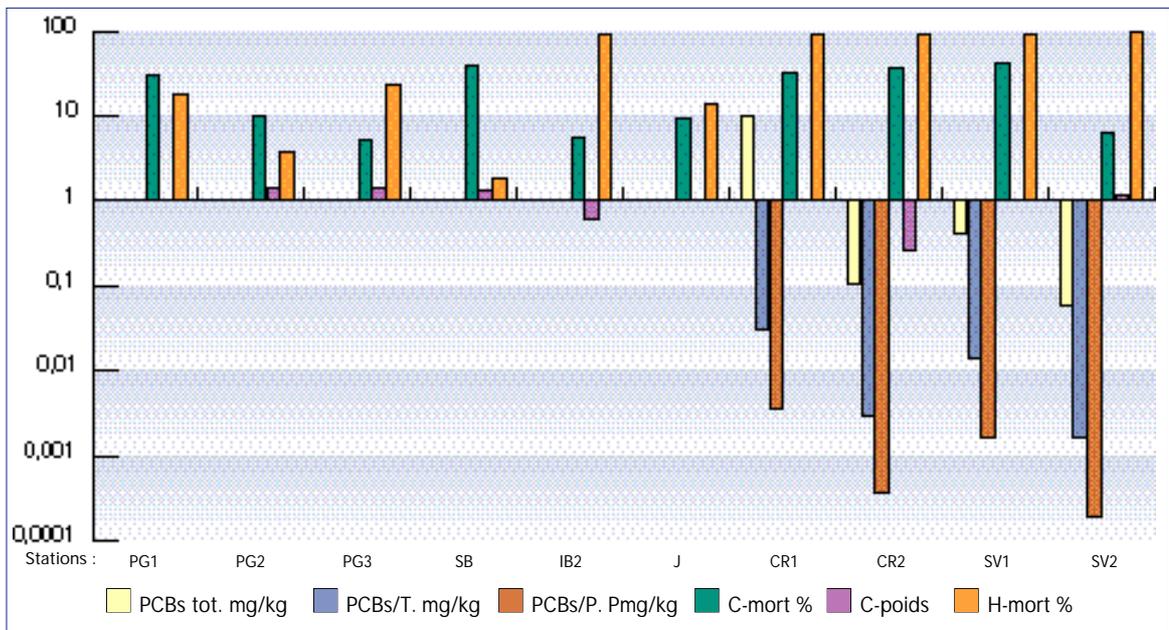


Figure 11 b. Profil de contamination et toxicité associée (PCBs totaux)



6. ESSAIS SUR SÉDIMENTS NATURELS

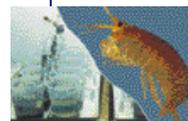
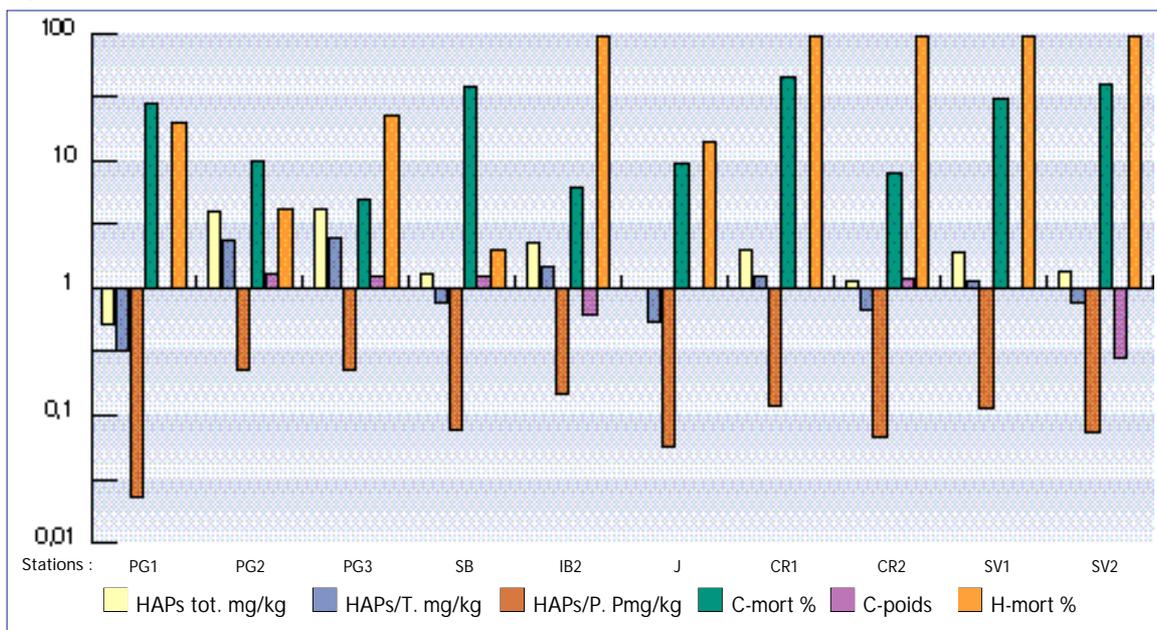


Figure 11 c. Profil de contamination et toxicité associée (HAPs totaux)



Smet =métaux, Smet/T= [Ci]/TELi (métaux), Smet/P = [Ci]/PELi; HAPs : HAPs totaux,
 HAPs/T : HAPs/TEL_{HAPTOT}, HAPs/P= HAPs/PEL_{HAPTOT}, PCBst : PCBs totaux,
 PCBs/T : PCBs/TEL_{PCBTOT}, PCBs/P : PCBs/pEL_{PCBTOT}



7. CONCLU

De cette première étude portant sur l'utilisation de méthodes d'évaluation de la toxicité en laboratoire nous pouvons faire les remarques suivantes :

La mise en place de ces essais nécessite, comme toutes les méthodologies de ce type, une maîtrise continue des élevages des organismes afin d'obtenir une stabilité suffisante des mesures biologiques utilisées lors des essais. Leur reproductibilité et leur précision dans les échantillons "témoins" sont en effet essentielles pour permettre des mesures fiables et sensibles de toxicité sur les échantillons testés.

1. Actuellement il apparaît important de réduire, autant que faire se peut compte tenu de l'hétérogénéité de la matrice testée, la variabilité des mesures effectuées et d'améliorer la qualité de la survie des organismes dans les sédiments témoins, en particulier pour *C. riparius*.

Deux possibilités :

- améliorer la qualité du sédiment artificiel; les propositions de composition de sédiment artificiel contenues dans le protocole OCDE pourraient faire l'objet d'une évaluation quant à la stabilisation des taux de survie dans les témoins,
- utiliser comme sédiment témoin, un sédiment naturel de qualité suffisante mais dont il faudrait s'assurer qu'il soit protégé des risques de contamination.

2. Les critères de toxicité actuellement suivis sur chironomes sont apparus, sur la gamme de contamination étudiée, moins sensibles que la survie des hyalelles. De ce fait *H. azteca* permet une meilleure discrimination de la toxicité des sédiments et apparaît donc actuellement le plus intéressant à utiliser, en particulier pour une première évaluation rapide de la toxicité des sédiments. Cependant, le suivi de la croissance et de la mortalité des chironomes peut s'avérer plus sensible sur des contaminations plus importantes en produits organiques bioaccumulables. Une amélioration de la sensibilité de l'essai doit néanmoins être recherchée. A ce titre, l'utilisation de critères biologiques sublétaux supplémentaires, tel que le taux et la durée d'émergence de *C. riparius* ou le taux de reproduction de *H. azteca*, peut s'avérer intéressante pour permettre une meilleure discrimination entre les sédiments. Leur mise en œuvre nécessite cependant de prolonger l'essai d'environ deux semaines.

SIONS ET PERSPECTIVES

3. Les quelques tests que nous avons effectués sur l'eau interstitielle à l'aide d'une hydre d'eau douce ont montré une bonne concordance avec les autres résultats biologiques. Ce microtest déjà utilisé pour évaluer la toxicité d'effluents industriels⁵⁰ permet une évaluation rapide de la toxicité; il permet également le calcul de paramètre de toxicité tels que les CE x % et donc une comparaison statistique des toxicités plus aisée. De ce fait, un approfondissement de ses limites de validité et de sa sensibilité (influence de l'azote ammoniacal, du Carbone Organique Dissous, de la précipitation des hydroxydes...) lors de l'utilisation sur eaux interstitielles permettrait d'en préciser l'intérêt.
4. Enfin, le jeu de données disponibles montre une certaine concordance entre la multi contamination chimique mesurée et les effets toxiques, en particulier si l'on utilise une normalisation des concentrations à l'aide des valeurs seuils. La réalisation de ce type d'essais au laboratoire permet donc de rendre compte de contamination chimique biodisponible et de proposer un classement de la toxicité des échantillons. Néanmoins, il est indispensable d'apprécier la sensibilité des méthodes et leur représentativité au regard d'effets biologiques mesurés in situ. A ce titre, il est nécessaire d'envisager la mise en œuvre de l'acquisition d'un jeu de données de bonne qualité, raisonné (différents types de contamination, différentes natures de sédiments par exemple), plus conséquent intégrant à la fois les données physico-chimiques caractérisant le sédiment, les résultats d'essais biologiques mais aussi les résultats d'indicateurs d'effet biologique in situ.



8. CONDITION D'ÉLEV

8.1 L'ORGANISME : HYALLELA AZTECA

Le laboratoire dispose d'une souche de *Hyalella azteca* fournie par Aquatic Research Organisms, INC., aux Etats-Unis.

Le premier lot est arrivé fin août 1996 par l'intermédiaire du fournisseur Charles Rivers France, spécialisé dans l'approvisionnement d'animaux de laboratoire. Le deuxième lot est arrivé fin décembre 1996, issu du transfert d'un élevage entretenu au laboratoire Analex à Laval au Québec (Canada).

8.2 CONDITIONS D'ÉLEVAGE

Température

La température retenue au laboratoire est celle généralement retenue pour le maintien de cet organisme, $23,0\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1$.

Cycle circadien

Comme les autres élevages d'invertébrés, le cycle lumière obscurité est de 16 heures de lumière pour huit heures d'obscurité.

La lumière est entièrement artificielle et fournie par des tubes de type Cool White.

De façon à éviter une trop grande dérive du pH, l'intensité lumineuse est limitée à environ 300 à 500 lux au niveau de la surface de l'eau.

Aération

Bien que *Hyalella azteca* supporte des concentrations en oxygène dissous faibles, les aquariums d'élevages sont aérés de façon permanente.

Pour prévenir toute pollution d'origine atmosphérique,

l'air est filtré sur un filtre en acétate de cellulose de $5\text{ }\mu\text{m}$ de porosité avant son entrée dans le compresseur. A la sortie du compresseur, l'air passe dans une cartouche de charbon actif d'origine animale et, avant d'arriver dans l'eau des aquariums, un dernier filtre en acétate de cellulose de porosité $0,22\text{ }\mu\text{m}$ est interposé avant la canne de verre servant au bullage proprement dit. Le bullage se fait par l'intermédiaire d'une pipette de pyrex de 1 millilitre de façon à produire des bulles de 2 à 3 mm de diamètre. Cette précaution est prise de manière à ce que les jeunes hyalles ne soient pas piégées par des microbulles venant se prendre sur la face ventrale de leur carapace. Les remous provoqués par des bulles de quelques millimètres suffisent à écarter les jeunes et ne les entraînent pas à la surface de l'eau.

Récipient d'élevage

L'élevage est réalisé dans des aquariums de 5 litres avec environ 200 organismes au démarrage.

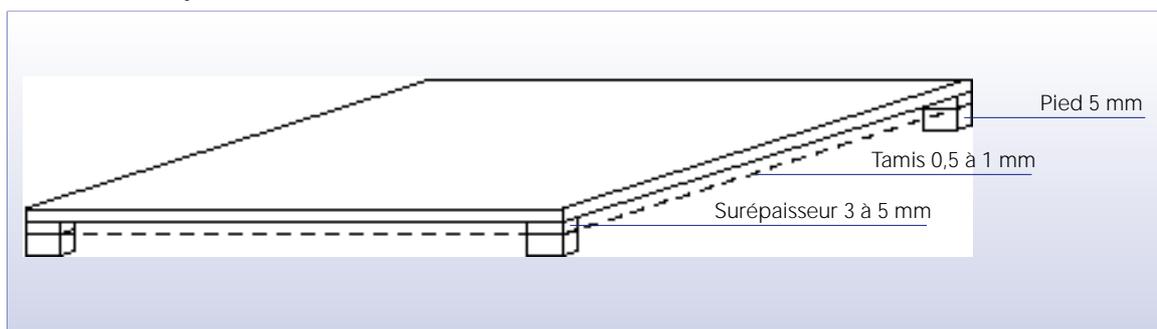
Support

Dans la nature, *Hyalella azteca* se cache dans les interstices du fond et les plantes aquatiques. Les protocoles proposés¹³ pour l'élevage de cet organisme préconisent généralement l'emploi de gaze ou de linge à fromage comme support.

Dans un premier temps, nous avons donc utilisé ce support présentant effectivement de nombreuses caches dans lesquelles se faufilaient les animaux. Cependant, ce genre de support n'apporte pas pleine satisfaction lorsque l'on veut faire un comptage régulier des jeunes. En effet, ces derniers sont très nombreux à rester piégés dans les mailles du tissu, et de plus, les déjections des adultes ont une taille voisine des jeunes hyalles jusqu'à l'âge de trois ou quatre jours et il est alors facile de les confondre.

Suite à un exemple vu dans un laboratoire canadien, nous avons développé un abri présentant à la fois une cache et

Schéma d'abri à hyallella



AGE DE HYALELLA AZTECA

un réseau permettant aux animaux de se faufler. L'abri est fabriqué en P.V.C., matériau souvent utilisé et ne présentant pas de toxicité à long terme, avec un tamis en nylon monofilament. Les éléments sont assemblés à la colle pour P.V.C. De façon à prévenir toute pollution par les solvants, l'abri une fois fabriqué est séché au moins 24 heures, il est ensuite rincé à l'eau courante pendant au moins 48 heures.

Le toit est constitué d'une plaque de PVC de 2 ou 3 mm d'épaisseur et recouvre un tamis de même dimension, tendu sur 4 cales. Un espace est ménagé entre le tamis et le toit par l'intermédiaire des 4 cales faisant une surépaisseur de 3 à 5 mm. L'ensemble de l'abri repose sur le fond de l'aquarium par des pieds de 5 mm de hauteur. La surface des abris est calculée de telle manière qu'un espace de 2 à 3 centimètres reste libre sur chacun des cotés avec le bord de l'aquarium ou l'abri le plus proche. Le fond de l'aquarium est tapissé d'abris, ceux ci devant rester petits pour une meilleure manipulation.

Le meilleur développement des populations a été enregistré en ajustant la densité des hyalles à 2 et 3 cm² d'abri par adulte, les jeunes étant retirés une fois par semaine. Au bout de quelques jours d'utilisation, les abris sont recouverts de bactéries et d'algues et les crustacés viennent rapidement en prendre possession.

Une fois par semaine, le milieu des aquariums est renouvelé en totalité et, à cette occasion, les jeunes de la semaine sont récoltés. Les abris sont alors retirés et mis dans un bac contenant une partie de l'eau prélevée dans l'aquarium. Les abris sont rincés à l'aide d'une pissette et les jeunes et les adultes réfugiés entre le toit et le tamis sont entraînés dans le bac sans dommage. Le surplus du film biologique qui s'est développé à la surface de l'abri est retiré à l'aide d'une brosse (en prenant soin de laisser une partie de cette colonisation qui s'avère bénéfique au développement des hyalles).

8.3 MILIEUX

Plusieurs milieux de culture ont été testés, naturels, semi-naturels et synthétiques. La plupart ont permis un développement satisfaisant de la population après une période d'adaptation.

Pour les milieux synthétiques, nous avons testé les deux milieux de Elendt (M4 et M7). Le milieu M4 a donné de bons résultats, qui ne sont pas sensiblement différents des résultats obtenus en milieux naturels ou semi-naturels. Le milieu M7 (utilisé en particulier pour *D. magna* et *C. dubia*) n'a pas permis d'obtenir de reproduction.

Après avoir essayé l'eau d'une rivière artificielle (mesocosme), l'élevage est actuellement entretenu dans un milieu naturel ajusté. Il s'agit d'une eau de nappe phréatique qui est diluée au 1/2 avec de l'eau ultrapure (Milli Q) ou de l'eau déminéralisée, avec un ajout de magnésium apporté sous la forme de MgSO₄. Ce milieu est aussi utilisé au laboratoire pour entretenir les élevages de *Daphnia magna* et *Ceriodaphnia dubia*.

8.3.1 MILIEUX UTILISÉS (ÉLEVAGE ET ESSAI)

	FMG	FOS
pH	7.8-8.2	7.0-8.5
Cond. µS/cm	800-900	330-460
Dureté CaCO ₃ mg/l	250/300	120-170

Le milieu FMG est constitué d'un mélange au 1/2 d'une eau de forage naturelle et d'eau déminéralisée additionnée de 1.73 mg de MgCl₂ pour 10 litres.

Le milieu FOS est constitué d'un mélange de 1/4 d'eau de forage et 3/4 d'eau osmosée.

8.4 NOURRITURE

La nourriture généralement proposée dans les protocoles américains et canadiens reprend le mélange "Y.C.T." (composé de 'levure' (y), 'Cerophyl' (c) ou broyat de feuilles séchées et nourriture à truite (t)). Ce mélange est donné en alternance avec une nourriture du commerce (pour lapin) destinée à apporter un complément de cellulose.

Compte tenu de l'expérience du laboratoire sur ce type de nourriture (résultats insuffisants sur les élevages de *D. Magna* et *C. Dubia*, composition non garantie de la nourriture pour lapin -apport possible de cuivre, mauvaise tenue dans l'eau et consommation d'oxygène) l'élevage est réalisé au laboratoire avec un apport de nourriture pour alevins (SERA Mikron) qui présente de bonnes garanties de qualité dans le temps.

C'est un aliment très énergétique qui doit être manipulé à doses bien définies. Pour garder à cet aliment toute sa valeur nutritive, celui-ci est préparé extemporanément pour la distribution.

La nourriture est distribuée chaque matin le plus tôt possible après sa préparation. La nourriture est distribuée en une seule fois pour toute la journée. Les élevages ne sont pas nourris le week-end.

La nourriture est fournie de façon croissante en fonction de l'âge. Chaque aquarium reçoit un volume croissant d'une solution à 5 g/l de SeraMikron (1 ml la 1^{ère} semaine, jusqu'à 6 ml la 6^{ème} semaine).

8.5 RÉCOLTE DES ANIMAUX D'ESSAI

Le maintien d'une densité maximale de jeune dans l'élevage est nécessaire pour assurer la qualité de l'élevage. Pour ce faire, un tri hebdomadaire est effectué à partir du moment où les jeunes commencent à être produits.

Tri

Pour effectuer le tri, les aquariums sont sortis de l'enceinte thermostatée. Un siphon est mis en place de façon à éliminer la moitié du milieu. L'eau retirée est passée sur des tamis de 450-500µm puis 250 µm avant d'être recueilli dans un récipient, ceci afin de récupérer les jeunes et les adultes éventuellement présents. L'eau restant dans le fond de l'aquarium contient les abris et la grande majorité des organismes. Une partie de cette eau est prélevée et mise dans un plateau. Les abris sont alors également transférés dans ce plateau, puis la totalité du milieu. Les animaux restant collés au fond de l'aquarium sont délicatement détachés par un jet de pissette et ajoutés à ceux se trouvant déjà dans le plateau.

L'aquarium est alors nettoyé par brossage sous un courant d'eau déminéralisée. Les abris sont retirés, un à un, du plateau et les organismes qui s'y sont réfugiés sont délogés au dessus du plateau par un jet de pissette.

Les abris sont nettoyés par brossage et remis au fond de l'aquarium avec 4 litres de milieu neuf. Les adultes sont récupérés et remis dans l'aquarium. Un apport de nourriture est alors effectué, en fonction de l'âge des organismes cultivés dans cet aquarium.

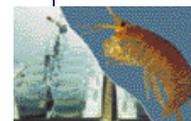
Les jeunes sont gardés dans leur milieu de naissance et clairement étiquetés de façon à connaître leur âge en vue du démarrage d'essais ultérieurs.

Démarrage de nouveaux récipients d'élevage

De façon à assurer la pérennité de l'élevage, un nouvel aquarium est commencé toutes les 6 semaines. Lorsque l'on s'est assuré que celui-ci a bien démarré, généralement 2 semaines plus tard, on peut alors supprimer l'aquarium le plus ancien. Le nombre d'aquariums fonctionnant en série est bien entendu fonction de la demande en organismes d'essai que doit assurer l'élevage.

Actuellement, nous fonctionnons avec l'estimation moyenne que 250 parents donnent environ 300 jeunes par semaine.

8. CONDITIONS D'ÉLEVAGE DE HYALELLA AZTECA



8.6 SUIVI QUALITÉ

Paramètres physico-chimiques

Les paramètres physico-chimiques classiques (pH, Conductivité, Oxygène) sont suivis régulièrement dans les aquariums d'élevage.

Paramètres biologiques

Le dénombrement du nombre de parents survivants est fait à l'occasion du tri hebdomadaire permettant de récolter les jeunes.

Lorsqu'un aquarium nouveau est mis en culture, il est démarré avec des jeunes nés pendant la même semaine. Un paramètre facile à suivre est celui des premiers amplexus. Si le développement est normal ceux-ci interviennent entre la troisième et la quatrième semaine.

Toxique de référence

Pour évaluer la sensibilité des organismes au cours du temps, l'utilisation d'un toxique de référence est préconisée. Le toxique de référence actuellement utilisé est le sulfate de cuivre.

L'essai est pratiqué en eau seulement (sans sédiment). Un support est cependant ajouté sous la forme d'un tamis nylon de 7 cm².

La durée de l'essai est fixée à 96 heures.

Les animaux utilisés sont âgés de 7 à 14 jours.

Les essais sont actuellement réalisés en milieu FOS

Modalités d'essai

Nous avons retenu 6 concentrations d'essais qui, exprimées en concentration de cuivre, sont : 20 µg/l, 47 µg/l, 109 µg/l, 200 µg/l, 400 µg/l, 800 µg/l.

- Il y a 5 réplicats par concentration. Dix animaux par réplicat.
- Les animaux sont nourris à T0.
- La température est de 23 °C ± 1 °C.
- La lumière est de 16 heures par jour.

8.7 MATÉRIEL NÉCESSAIRE ET COÛT (DURÉE) D'ESSAI

L'essai ne nécessite que du matériel courant de laboratoire : récipients en verre ou polypropylène selon les contaminants, aquarium pour élevage, aérateur, matériels de mesures physico-chimiques (cf. descriptif des conditions d'élevage).

Des pompes péristaltiques sont nécessaires en cas d'essais en continu.

Du matériel de régulation thermique est également indispensable pour assurer une température constante aux élevages mais surtout aux essais.

Le temps nécessaire à la réalisation d'un essai sur *H. azteca* est en grande partie fonction du nombre de réplicats mis en œuvre (suivi journalier des paramètres physico-chimiques).

Pour estimer sa durée, nous nous baserons sur un essai moyen de trois échantillons de 5 réplicats chacun (15 récipients).

L'essai peut être décomposé en trois phases :

- 1 . Préparation de l'essai
Tamisage du sédiment et mise en place du sédiment tamisé dans les récipients :
Mise en place de l'aération, mesure des paramètres physico-chimiques (O₂, pH, T°, conductivité), installation des organismes : 2 jours technicien
 - 2 . Suivi d'essai (tous les jours en semi-statique) O₂, pH, T°, conductivité (14 jours) : 2 jours technicien
 - 3 Arrêt de l'essai, comptage des organismes : 1 jour technicien
- Rapport d'essai : 1 jour ingénieur

FEUILLE DE SUIVI ÉLEVAGE

Aquarium, numéro : HY08
Nombre de jeunes mis en culture : 200
Milieu d'élevage : FMG
Nourriture : Sera Micron

Jour	Date	Ren.	pH	Cond.	Oxygène	Morts	Naissances
1	11/04/97	-	8,0	765	90 %	-	-
8	18/04/97	50 %	8,6	785	92 %	0	0
15	25/04/97	50 %	8,5	810	78 %	0	0
22	02/05/97	50 %	8,0	825	84 %	3	75
29	09/05/97	50 %	8,4	800	85 %	7	222
36	16/05/97	50 %	8,8	830	74 %	10	246
43	23/05/97	50 %	8,4	795	82 %	4	279
50	30/05/97	50 %	8,2	725	76 %	8	196
57	06/06/97	50 %	8,2	780	75 %	5	310

Jour = Âge de l'aquarium en jours

Date = Date du changement, tri et observations

Ren. = Pourcentage de milieu neuf

pH = mesure du pH sur milieu ancien avant changement (mesuré à 20 °C)

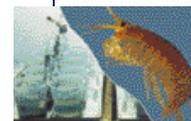
Cond. ($\mu\text{S}/\text{cm}$) = mesure de la Conductivité à 20 °C sur milieu avant changement

Oxygène = % d'oxygène dissous avant changement

Morts = Nombre de morts retrouvés lors du changement (ne concerne que les animaux mis en élevage, ne sont pas comptabilisés les jeunes nés dans la semaine et retrouvés morts)

Naissances = Nombre de jeunes retrouvés dans l'aquarium au moment du changement.

8. CONDITIONS D'ÉLEVAGE DE HYALELLA AZTECA



Résumé des conditions d'élevage

Type	Semi statique
Température	23 °C (± 1 °C)
Lumière	Photopériode 16 h. Lumière / 8 h. Obscurité
Intensité lumineuse	environ 500 lux
Aquarium d'élevage	Contenance 5 litres, remplis avec 4 litres
Eau d'élevage	Semi naturelle (dilution par eau ultrapure et apport de Mg)
Renouvellement	une fois par semaine
Aération	modérée à nulle
Nourriture	5 ml de Sera Micron à 5 g/l
Périodicité nourriture	Quotidienne sauf Samedi et Dimanche
Tri	une fois par semaine récolte des jeunes
Démarrage	Un aquarium toutes les six semaines
Nombre d'animaux	200 à 220 au démarrage (mâle / femelle 1/2)
Age des animaux	4 semaines
Substrat	abri en PVC et tamis Nylon.
Type	Alimentation en eau continue
Température	23 °C (± 1 °C)
Lumière	Photopériode 16 h. Lumière / 8 h. Obscurité
Intensité lumineuse	environ 500 lux
Aquarium d'élevage	Contenance 40 litres rempli à 22 litres
Eau d'élevage	Semi naturelle (dilution au 3/4 par eau osmosée)
Renouvellement	par moitié une fois par jour
Aération	permanente
Nourriture	0,5 g de Tetramin (Lundi, Mercredi, Vendredi). Plus une pastille de SeraOnip le Vendredi
Tri	éclaircissement de la population une fois toutes les trois semaines
Démarrage	Renouvellement permanent
Nombre d'animaux	200 à 220 après éclaircissement
Age des animaux	Plusieurs générations laissées ensemble
Substrat	abri en PVC et tamis Nylon.

Analyse du milieu d'élevage (F M G)

	mg/l
Calcium (Ca++)	79,01
Magnésium (Mg++)	23,0
Sodium (Na+)	18,0
Potassium (K+)	2,6
Ammonium (NH ₄ +))	0,0
Fer (Fe+)	0,02
Bicarbonate (HCO ₃ -)	158,7
Sulfate (SO ₄ - -)	57,0
Chlorure (Cl-)	51,1
Nitrates (NO ₃ -)	16,4
Nitrites (NO ₂ -)	0,0
Phosphates (PO ₄ -)	0,0



9. CONDITIONS D'ÉLEVAGE

Le laboratoire dispose d'une souche de *Chironomus riparius* de même origine que *Hyaella azteca* et fournie par le laboratoire d'écotoxicologie de l'INERIS.

Deux types d'élevage au laboratoire sont maintenus au laboratoire actuellement :

- l'élevage en continu, nécessitant un minimum d'entretien et de suivi,
- l'élevage en conditions semi-statiques permettant le suivi d'un certain nombre de paramètres utiles à l'amélioration de l'élevage.

9.1 ÉLEVAGE CONTINU

Dans un aquarium de 40 litres (surface env. 0,1 m²), on place un lit de sable (0,5mm) d'environ 2 cm et une hauteur d'eau d'environ 20 cm (eau d'une conductivité de 320µS/cm obtenue par mélange eau de forage/eau osmosée).

Un dôme en grillage fin évite l'envol des adultes.

L'aquarium est aéré par bullage, le renouvellement d'eau est de 1,2 litre par heure, la température est maintenue entre 20 et 25°C.

Trois masses déjà écloses sont mises en élevage dans l'aquarium.

La nourriture (aliment pour poisson en paillettes) est donnée chaque jour. Les doses évoluent avec l'âge des larves, de 150mg mixées pendant les 5 premiers jours à 0,5 g agitées de manière à réduire la taille des paillettes. Les masses sont produites sur les parois de l'aquarium et peuvent être récupérées si besoin est, les autres masses servant à réensemencer l'aquarium.

9.2 ÉLEVAGE SEMI-STATIQUE

Dans un aquarium de 5 litres (surface env. 0,04 m²), on place un lit de sable (0.5mm) d'environ 1 cm et une hauteur d'eau d'environ 9 cm (milieu FMG) d'une conductivité de 800µS/cm obtenue par mélange par moitié d'eau de forage et d'eau osmosée, complétée par 1,732g de sulfate de magnésium heptahydraté pour 10 l de milieu).

Un dôme en grillage fin évite l'envol des adultes.

L'aquarium est aéré par bullage, la température est maintenue à 21 °C ± 1 °C ; les aquariums sont conservés dans une armoire thermostatée.

L'éclairage dispensé pendant 16 heures par jour est d'environ 500 lux.

Deux masses déjà écloses sont mises en élevage dans l'aquarium pour son démarrage.

La nourriture (aliment pour poisson en paillettes) est donnée chaque jour. Les doses évoluent avec l'âge des larves, de 50mg mixées pendant les 5 premiers jours à 150 mg agitées de manière à réduire la taille des paillettes.

Au bout de 18 jours environ les adultes émergent. Ceux ci sont aspirés et placés dans une bouteille de 2 litres contenant un fond de milieu pour favoriser la ponte. Celle ci est placée dans l'armoire.

Les masses pondues dans les bouteilles sont aspirées, placées de façon individuelle dans des piluliers avec du milieu FMG et mises dans l'armoire thermostatée.

Un suivi des émergences (rapport mâle/femelle), du nombre de masses produites et de l'éclosion de celles-ci peut être effectué pour évaluer la qualité de production de l'élevage lorsque nécessaire.

Méthode de culture

	Semi-statique	Continu
Renouvellement	3 fois par semaine par moitié	Renouvellement 20ml/mn
Température	21°C ± 1	20 à 25°C
Lumière	16h/8h (J/N) environ 500 lux	Lumière du jour
Réceptacles	5 litres	25 litres
Age des organismes	Age connu	Mélange des générations
Fréquence des départs	10 jours	
Age au départ	larves de 24 h	larves de 24 h
Qualité de l'eau	Reconstituée (FMG)	Naturelle (FOS)
Aération	Modérée	Modérée
Nourriture	Tetra AniMin® 50mg broyés pendant 5 jours, puis 150mg	Tetra AniMin® 150mg broyés pendant 5 jours puis 0.5 g broyés
Substrat	Sable (0,5mm, ou 0,2mm)	Sable (0,5mm, ou 0,2mm)
Toxiques de référence	CuSO ₄	

E DE CHIRONOMUS RIPARIUS

9.3 LES ESSAIS SUR CHIRONOMUS RIPARIUS

2 types d'essai peuvent être mis en œuvre au laboratoire. Dans un cas, le milieu est renouvelé en continu 4 fois par jour sans aération, dans l'autre la moitié du volume de milieu est changée en une seule fois chaque jour avec une aération.

Pour ces deux types d'essai, les autres conditions sont identiques.

La température est de $21\text{ °C} \pm 1\text{ °C}$, l'éclairage est de 16 heures par jour avec une intensité de 500 lux.

Les récipients d'essai sont des béciers en plastique de 400ml contenant 100ml du sédiment à étudier ou de sédiment témoin et 175 ml de milieu reconstitué (FMG).

Les larves mises en essai ont 4 jours et celui-ci est poursuivi pendant 10 jours.

Les larves sont nourries à raison de 4 mg de Tétramin® broyées par bécier (1 ml d'une suspension à 4g/l).

Les paramètres suivants sont notés : température, conductivité, pH, oxygène dissous, et des dosages de nitrites et d'ammoniac sont réalisés.

En fin d'essai, les survivants sont dénombrés et le poids moyen sec des chironomes est déterminé pour chaque bécier. La largeur de la capsule céphalique peut être également mesurée.

9.3.1 PRÉPARATION DES LARVES.

Des individus adultes mâles et femelles sont isolés quelques jours avant essai afin de récolter les masses produites.

Les masses justes écloses (de moins d'une 1/2 journée) sont mises dans le milieu d'essai avec 100 mg de Tétramin® broyé, à raison de 3 masses par litres d'eau.

Les larves sont récoltées après 4 jours pour être mises en essai.

Méthode d'essai

	Semi-statique	Continu
Renouvellement	80ml/jour	30 ml/h
Aération	Modérée	Non
Température	$21\text{ °C} \pm 1$	$21\text{ °C} \pm 1$
Lumière	16h/8h (J/N) environ 500 lux	16h/8h (J/N) environ 500 lux
Récipients	400ml	400ml
Sédiment ratio	100/175 ml (sédiment/eau)	100/175 ml (sédiment/eau)
Age des organismes	4 jours	4 jours
Nombre d'organismes	10 par récipient	10 par récipient
Nombre de réplicats	5	3 à 5
Durée de l'essai	10 jours	10 jours
Nourriture	Tetra AniMin® 4 mg /récipient	Tetra AniMin® 4 mg /récipient
Mesures en fin d'essai	Survivants et poids	Survivants et poids
Acceptabilité	Survivants témoins (> 70%)	Survivants témoins (> 70%)
Substrat témoin	Sable (0,5mm, ou 0,2mm)	Sable (0,5mm, ou 0,2mm)



Analyses physico-chimiques sur la fraction solide

Station de prélèvement	Date et n° du sédiment	Sable % (<2 mm, 50 µm<)	Limon + Argile % (<50 µm)	CaCO ₃ (% poids sec)
Chasse sur Rhône	03/04/97 CR1	36	63	26,2
Chasse sur Rhône	08/10/97 CR2	31	69	27,8
Chasse sur Rhône	02/12/97 CR3	41	59	6,4
Chasse sur Rhône	19/02/98 CR4	44	56	26,9
Ile Barbe	07/04/97 IB1	39	61	14,8
Ile Barbe	07/10/97 IB2	60	40	16,4
Jons	07/10/97 J	35	65	27,8
Port galland	04/04/97 PG1	83	17	78,5
Port galland	30/09/97 PG2	29	71	59,0
Port galland	17/11/97 PG3	20	80	65,8
Saint Bernard	01/09/97 SB	55	45	24,4
Saint Vallier	03/04/97 SV1	43	57	23,2
Saint Vallier	29/01/98 SV2	12	88	18,7

ANNEXE 1

COT (% poids sec)	Carbone Minéral (% poids sec)	Azote total	C/N	Carbone Total (% poids sec)
2,7	3,70	0,30	9,00	5,60
2,3	2,90	0,22	10,23	5,00
2,0	3,00	0,18	11,11	5,00
1,8	3,35	0,19	9,21	5,10
1,9	1,80	0,23	8,39	3,52
1,7	1,90	0,19	8,95	3,50
1,4	3,40	0,16	9,00	4,70
1,0	8,90	0,15	6,93	9,80
3,6	7,70	0,32	11,22	10,10
3,1	7,00	0,27	11,48	10,10
1,9	3,30	0,21	8,81	4,60
3,2	2,70	0,25	12,96	5,83
2,9	2,13	0,24	12,13	5,04

Analyses physico-chimiques sur l'eau interstitielle (*sur eau non filtrée)

Station de prélèvement	Date prélèvement	N°	pH	Conductivité (μ S/cm)	COT* (mg/l)	N-NH ₄ (mg/l)
Chasse sur Rhône	03/04/97	CR1	7,3	880	29,7	12,5
Chasse sur Rhône	08/10/97	CR2	7,2	700		17,0
Chasse sur Rhône	02/12/97	CR3	7,8	820	14,1	20,6
Chasse sur Rhône	19/02/98	CR4	7,7	829	13,7	11,4
Ile Barbe	07/04/97	IB1	8,0	720	15,0	2,9
Ile Barbe	07/10/97	IB2	7,1	795		5,4
Jons	07/10/97	J	7,1	545		4,1
Port Galland	04/04/97	PG1	7,4	590	27,8	5,5
Port Galland	17/11/97	PG2	7,5	485	10,15	5,0
Saint Vallier	03/04/97	SV1	6,8	1680	/	5,4
Saint Vallier	29/01/98	SV2	7,4	745	21,4	12,4



- ¹CHAPMAN P.M., POWER E. A and G.A. BURTON, 1992. Integrative assessments in aquatic ecosystem. In Sediment Toxicity Assessment, G.A. Burton Ed., Lewis Publisher, p13-335.
- ²POWER E. A. and CHAPMAN P.M., 1992. Assessing sediment quality. In : Sediment Toxicity Assessment. Burton G.A. Ed. 1992 : 1-18.
- ³DITORO 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.E. and P.R. PAQUIN, 1991. Technical basis for establishing sediment quality criteria for non ionic organic chemicals using equilibrium partitioning. Environ. Toxicol. Chem., 10 : 1541-1583.
- ⁴GARRIC J.et B. MONTUELLE. 1997. Évaluation des risques de bioaccumulation et de transfert dans les chaînes trophiques à partir du sédiment. Rapport Cemagref- Agence de l'eau Rhin Meuse. 62p.
- ⁵GIESY J.P., ROSIU C.J. and R.L.GRANEY. 1990. Benthic invertebrates bioassays with toxic sediment and pore water. Environ. Toxicol. Chem., 9, p. 233-248.
- ⁶ANKLEY G.T., SCHUBAUER-BERIGAN M.K. and J. DIERKES. 1991. Predicting toxicity of bulk sediments to aquatic organisms with aqueous test fractions : pore water versus elutriates. Environ. Toxicol. Chem., 10, p1359-1366.
- ⁷HARKEY G.A., LANDRUM P.F. and S.J. KLAINE. 1994. Comparison of whole-sediment, elutriate and pore-water exposure for use in assessing sediment-associated organic contaminants in bioassays. Environ. Toxicol. Chem., 13, p. 1315-1329.
- ⁸GIESY J.P. and HOKE R.A.(1989). Freshwater sediment toxicity bioassessment : rationale for species selection and test design. Great Lakes Res., 15, p539-569.
- ⁹BURTON G. A, NELSON M.K. and INGERSOLL C.G., 1992. Freshwater benthic toxicity tests. In Sediment Toxicity Assessment, G.A. Burton Ed., Lewis Publisher, p213-240.
- ¹⁰REYNOLDSON T.B. and K.E. DAY, 1992 Freshwater Sediments. In Handbook of Ecotoxicology, vol.1. P. Calow Ed. Blackwell Scientific Publication., p83-95.
- ¹¹INGERSOLL C.G., ANKLEY G.T., BENOIT D.A., BRUNSON E.L., DWYER F.J., HOKE R.A., LANDRUM P.F., NORBERG-KING T.J. and P.V. WINGER, 1995. Toxicity and bioaccumulation of sediment-associated contaminants using freshwater invertebrates : a review of methods and applications. Environ. Toxicol. Chem., 14, p.1885-1894.
- ¹²KEDDY C.J., GREENE J.C. and M.A. BONNEL, 1995. Review of whole-organism bioassays : soil, freshwater sediment, and freshwater assessment in Canada. Ecotoxicology and environmental safety, 30, p221-251.
- ¹³US EPA. 1994. Methods for measuring the toxicity and bioaccumulation of sediment-associated contaminants with freshwater invertebrates. EPA/600/R-94/024. Office of research and development. Washington DC 20460.
- ¹⁴American Society for Testing and Materials, 1995. Standard test methods for measuring the toxicity of sediment-associated contaminants with freshwater invertebrates. E1706-95a. In Annual Book of ASTM standards, vol 11.05, Philadelphia, PA., p 1204-1285.
- ¹⁵Environment Canada, 1995a. Biological test method : test for growth and survival in sediment using the freshwater amphipod *Hyalella azteca*. Environment Canada, Report EPS 1/RM. Draft February 95.
- ¹⁶Environment Canada, 1995b. Biological test method : test for growth and survival in sediment using the freshwater chironomids, *Chironomus tentans* and *C. riparius*. Environment Canada, Report EPS 1/RM. Draft May 95.
- ¹⁷GROOTELAAR E.M., MAAS J.L., KERKUM-MANK L.C.M. and C. van de GUCHTE. 1996. Protocol for testing of field sediment in chronic bioassays with the freshwater dipteran *Chironomus riparius*. RIZA. Working document 95.192X. Division for Ecotoxicology report nr WSCE 96-01. 11p.
- ¹⁸DE MARCH B.G.E, 1981. *Hyalella azteca* (Saussure). In S.G. Lawrence Ed., Manual for the culture of selected freshwater invertebrates. Can. Spec. Pub. Fish. Aquat. Sci., n°54, Department of fisheries and oceans.
- ¹⁹PENNAK R.W. 1989. Freshwater invertebrates of the United States. John Wiley and Sons, Inc., New York 628p.
- ²⁰TAYLOR E.J., MAUND S.J. and PASCOE D. 1991. Toxicity of four common pollutants to the freshwater macroinvertebrates *Chironomus riparius* and *Gammarus pulex*. Archives of Environmental Contamination and toxicology, 21, p. 371-376
- ²¹SUEDEL B.C. and J.H. RODGERS. 1996. Toxicity of fluoranthene to *Daphnia magna*, *Hyalella azteca*, *Chironomus tentans* and *Stylaria lacustris* in water only and whole sediment exposures. Bull. of Environ. Contam. and Toxicol., 57, p.132-138.
- ²²PHIPPS G.L., MATTSON V.R. and G. T ANKLEY. 1995. Relative sensitivity of three freshwater benthic macroinvertebrates to ten contaminants. Archives of Environmental Contamination and toxicology, 28, p. 281-286.
- ²³WHITEMANF.W., ANKLEY G.T., KHAL M.D., RAUD M. and M.D. BALCER. 1996. Évaluation of interstitial water as a route of exposure for ammonia in sediment tests with benthic macroinvertebrates. Environ. Toxicol. and Chem., 15, p. 794-801.
- ²⁴COLLYARD S.A., G.T. ANKLEY, R.A. HOKE and T. GOLDSTEIN. 1994. Influence of age on the relative sensitivity of *Hyalella azteca* to diazinon, alkyphenol ethoxylates copper, cadmium and zinc. Archives of Environmental Contamination and toxicology, 26, p. 110-113
- ²⁵MESSAGER S. 1997. Mise en place de données de contrôle pour le suivi de l'évolution de la sensibilité de deux organismes : *Hyalella azteca* et *Chironomus tentans*. Rapport de stage DUT. Cemagref. 31p.
- ²⁶INEICHEN H.? MEYER B. and LEZZI M. 1983. Determination of the developmental stage of living fourth instar larvae of *Chironomus tentans*. Developmental biology, 98, p. 278-286.
- ²⁷SAETHER O.A. 1977. Female genitalia in chironomidae and other nematocera. Morphology, phylogenies, keys. Fish. Res. Board Can. Bull., 197, 209p.
- ²⁸ASTM 1991a Standard guide for conducting sediment toxicity tests with freshwater invertebrates. M. K. Nelson, C.G. Ingersoll and F.J. Dwyer. p. 1-20, in : 1991 Annual Book of ASTM standards. Vol. 11.04.
- ²⁹SUEDEL B.C. and J.H. RODGERS. 1994. Development of formulated reference sediments for freshwater and estuarine sediment toxicity testing. Environ. Toxicol. Chem., 13, p 1163-1175.
- ³⁰DAY K.E., KIRBY R.S. and REYNOLDSON T.B. 1993. Sexual dimorphism in *Chironomus riparius* (Meigan) : impact on interpretation of growth in whole toxicity tests. Environ. Toxicol. Chem, 13, p.35-40.
- ³¹ASTM. 1994b. Standard guide for collection, storage, characterisation and manipulation of sediments for toxicological testing. ASTM Annual Book of standards, vol. 11.04 E1391-90. Philadelphia, PA.
- ³²NELSON M.K. and E.L. BRUNSON, 1995. Postembryonic growth and development of *Hyalella azteca* in laboratory cultures and contaminated sediments. Chemosphere, 3129-3140.

BIBLIOGRAPHIE

- ³⁸BENOIT D.A., SIBLEY P.K., JUENEMAN J.L. and G.T. ANKLEY. 1997. Chironomus tentans life cycle test : design and evaluation for use in assessing toxicity of contaminated sédiments. Environ. Toxicol. Chem., 16, p. 1165-1177.
- ³⁹OCDE 1998. OECD Guideline for the testing of chemicals. Chironomid toxicity test using siked sédiment. Draft document may 1998, 16 p.
- ⁴⁰MILANI D. DAY K.E., MCLEAY D.J. AND R.S. KIRBY, 1996. Recent intra- and interlaboratory studies related to the development and standardisation of environment Canada's biological Test methods for measuring sédiment toxicity using freshwater amphipods Hyalella azteca or midge larvae Chironomus riparius. Environment Canada Report.
- ⁴¹BURTON G. A. 1992. Sediment collection and processing : factors affecting realism., p. 37-67. In Sediment toxicity assessment. Burton G.A. Ed. Lewis Publishers.
- ⁴²ASTM. 1991. Standard guide for collection, storage, characterisation and manipulation of sédiments for toxicological testing. ASTM Standard. N°. E 1391-90. 15p.
- ⁴³SCHUYTEMA G.S., NEBEKER A.V., GRIFFIS W.L. and MILLER C.E. 1989. Effects of freezing on toxicity of sédiments contaminated with DDT and Endrin. Environ. Toxicol. Chem., 8, p. 883-891.
- ⁴⁴LANDRUM P.F., NIHART S.R., EADIE B.J. and L.R. HERCHE. 1987. Reduction in bioavailability of organic contaminants to the amphipod Pontoreia hoyi by dissolved organic matter of sédiment interstitial waters. Environ. Toxicol. Chem., 6, p. 11-20.
- ⁴⁵DAVE G. and NILSSON E. 1996. Sediment storage : a critical factors in sédiment quality assessment. In Development and progress in sédiment quality assessment : rationale, challenges, techniques and strategies. M. Munawar and G. Dave Eds., p. 153-163.
- ⁴⁶DI TORO D.M., MAHONY J.D., HANSEN D.J., SCOTT K.J., HICKS M.B., MAY S.M. and M.S. REDMOND. 1990. Toxicity of cadmium in sédiments : the role of acid volatile sulfide. Environ. Toxicol. Chem., 9, p. 1487-1502.
- ⁴⁷NEBEKER A.V., ONJUKKA S.T., STEVENS D.G., CHAPMAN G.A., and DOMINGUEZ S.E. 1992. Effects of low dissolved oxygen on survival, growth and reproduction of Daphnia, Hyalella and Gammarus. Environ. Toxicol. Chem., 11, p. 373-379.
- ⁴⁸ANKLEY G.T., SCHUBAUER-BERIGAN M.K. and P.D. MONSON. 1995. Influence of pH and hardness on toxicity of ammonia to the amphipode Hyalella azteca. Can. J. Fish. Aquat. Sci., 52, 2078-2083.
- ⁴⁹BORGMANN U. 1994. Chronic toxicity of ammonia to the amphipode Hyalella azteca: importance of ammonium ion and water hardness. Environmental Pollution, 86, p.329-335.
- ⁵⁰SCHUBAUER-BERIGAN M.K., MONSON P.D., WEST C.W., and ANKLEY G.T. 1995. Influence of pH on the toxicity of ammonia to Chironomus tentans and Lumbriculus variegatus. Environ. Toxicol. Chem., 14, p. 713-717.
- ⁵¹REYNOLDS T.B., DAY K.E., CLARKE C. and MILANI D. 1994. Effect of indigenous animals on chronic end points in freshwater sédiment toxicity tests. Environ. Toxicol. Chem., 13, p. 973-977.
- ⁵²DAY K.E., KIRBY R.S., and T.B. REYNOLDS, 1995. The effect of manipulations on freshwater sédiments on response of benthic invertebrates in whole-sédiment toxicity tests. Environ. Toxicol. Chem., 14, p. 1333-1343.
- ⁵³INGERSOLL C., NELSON M.K. 1990. Testing sédiment toxicity with Hyalella azteca (Amphipoda) and Chironomus riparius (Diptera). In Aquatic toxicology and risk assessment : thirteen volume, STP 1096. W.G. Landis and W.H. Vander Schalie Eds., p93-109.
- ⁵⁴NEBEKER A.V., CAIRNS M.A., GAKSTATTER J.H., MALUEG K.W., and G.S. SCHUYTEMA., 1984. Biological methods for determining of toxicity of contaminated freshwater sédiments to invertebrates. Environ. Toxicol. Chem., 3, p. 617-630.
- ⁵⁵NEBEKER A.V., CAIRNS M.A. and C.M. WISE, 1984. Relative sensitivity of Chironomus tentans life stages to copper. Environ. Toxicol. Chem., 3, p. 151-158.
- ⁵⁶WILLIAMS K.A., GREEN D. W., PASCOE D. and GOWER D.E. 1986. The acute toxicity of cadmium to different larval stages of Chironomus riparius, and its ecological significance for pollution regulation. Oecologia, 70, p.362-366.
- ⁵⁷INGERSOLL C.G., DWYER F.J. and T. W. MAY. Toxicity of inorganic and organic selenium to Daphnia magna and Chironomus riparius. Environ. Toxicol. Chem., 9, p. 1171-1181.
- ⁵⁸WIEDERHOLM T., WIEDERHOLM A. and MILBRINK G. 1987. Bulk sédiment bioassays with five species of freshwater oligochaetes. Water Air Soil Pollut., 36, p 131-154.
- ⁵⁹HARKEY G.A., LANDRUM P.F. and S.J. KLAINÉ. 1994. Preliminary studies on the effect of feeding during whole sédiment bioassays using Chironomus riparius larvae. Chemosphere, 28, p. 597-606.
- ⁶⁰ANKLEY G.T., BENOIT D.A., HOKE R.A., LEONARD E.N., WEST C.W., PHIPPS G.L., MATTSON V.R. and L.A. ANDERSON. 1993. Development and evaluation of test methods for benthic invertebrates and sédiments : effects of flow rate and feeding on water quality and exposure conditions. Arch. Environ. Contam. Toxicol., 25, p. 12-19.
- ⁶¹FLEMING R.J., VAN DE GUCHTE C., GROOTELAAR L., CIARELLI S., BORCHERT J., LOOISE B. and GUERRA M.T. 1996. Sediment tests for poorly water soluble substances : European intra- and inter-laboratory comparisons. In Development and progress in sédiment quality assessment : rationale, challenge, techniques and strategies. Munawar M. and G. Dave Eds. P. 203-211.
- ⁶²NAYLOR C. and J. HOWCROFT 1997. Sediment bioassays with Chironomus riparius : understanding the influence of experimental design of test sensitivity. Chemosphere, 35, n°8, p. 1831-1845.
- ⁶³SMITH S. L., Mac DONALD D.D., KEENLEYSIDE K.A., and C.L. GAUDET. 1996. The development and implementation of Canadian Sediment quality Guidelines. In Development and Progress in Sediment Quality Assessment. Rationale, Challenge, Techniques and Strategies, p. 233-249. Eds. Munawar M. and G. Dave. Ecovision World Monograph Series. 1996 SPB Academic Publishing, Amsterdam, the Netherlands.
- ⁶⁴JONES D.S., SUTER G.W. and R.N. HULL. 1997. Toxicological benchmarks for screening contaminants of potential concern for effect on sediment-associated biota. 1997 Revision. ES/ER/MT-95/R4.
- ⁶⁵BLAISE C. and T. KUSUI. 1997. Acute toxicity assessment of industrial effluents with a microplate-based Hydra attenuata assay. Environ. Toxicol. and Wat. Qual., vol 12, n°1, p53-60.

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1. Bioessais disponibles pour la mesure de la toxicité de sédiment (d'après Keddy <i>et al.</i> , 1995)	10
Tableau 2. Sélection d'organismes utilisables pour l'évaluation de la toxicité de sédiment d'eau douce (d'après Ingersoll <i>et al.</i> 1995).	11
Tableau 3. Toxicité de quelques substances testées dans l'eau, sur <i>H. azteca</i> , <i>C. tentans</i> et riparius	13
Tableau 4. Répétabilité de la toxicité de trois substances sur <i>H. azteca</i> cultivée au laboratoire.	13
Tableau 5. Age et taille de la capsule céphalique de <i>C. tentans</i> (23°C) et <i>C. riparius</i> ^{13,17} (20 et 23°C)	16
Tableau 6. Répétabilité de la toxicité de deux substances sur <i>C. riparius</i> cultivé au laboratoire.	17
Tableau 7. Résumé des procédures d'essai utilisées pour mesurer la toxicité des sédiments entiers avec <i>H. azteca</i> (d'après US EPA 1994)	18
Tableau 8. <i>H. azteca</i> , protocole EPA et laboratoire Cemagref	19
Tableau 9. Résumé des procédures d'essai utilisées pour mesurer la toxicité des sédiments entiers avec <i>C. tentans</i> et <i>C. riparius</i> (d'après US EPA 1994)	20
Tableau 10. <i>Chironomus</i> , protocole EPA, laboratoire Cemagref, OCDE.	22
Tableau 11. Précision des mesures biologiques réalisées lors des essais sur <i>H. azteca</i> et <i>C. tentans</i> (d'après US EPA 1994)	23
Tableau 12. Toxicité aiguë 96H de l'ammoniac pour <i>H. azteca</i> (d'après Ankley <i>et al.</i> 1995).	25
Tableau 13. Stations échantillonnées et mesures biologiques et chimiques disponibles	29
Tableau 14. Caractéristiques moyennes des essais chironomes et hyalelles sur "sédiment contrôle"	32
Tableau 15. Qualité et résultats biologiques des essais contrôles. Essai continu et semi continu	33
Tableau 16. Résultats biologiques avril 1997	33
Tableau 17. Résultats biologiques octobre 1997	33
Tableau 18. Résultats biologiques (12/97-01/98)	34
Tableau 19. Seuils de contamination toxique	36
Tableau 20. Concordance toxicité et concentrations chimiques "normalisées"	37

LISTE DES FIGURES

Figure 1. Voies d'exposition possibles aux contaminants du sédiment (d'après Power et Chapman 1992)	6
Figure 2. Représentation de l'équilibre entre les différentes phases du sédiment et les organismes (d'après Giesy et Hoke 1989)	7
Figure 3. <i>Hyalella azteca</i> adulte	12
Figure 4. Imago de <i>Chironomus</i> mâle	14
Figure 5. Larve de <i>Chironomus</i>	15
Figure 6. Quelques caractéristiques physico-chimiques des sédiments testés.	30
Figure 7. Caractéristiques de l'eau interstitielle	30
Figure 8. Profil de contamination par les micropolluants	31
Figure 9. Toxicité des sédiments (campagnes octobre 1997)	34
Figure 10. Suivi des stations : toxicité des sédiments	35
Figure 11a. Profil de contamination et toxicité associée (métaux)	38
Figure 11b. Profil de contamination et toxicité associée (PCBs totaux)	38
Figure 11c. Profil de contamination et toxicité associée (HAPs totaux)	39

**Programmes d'Études
Inter-Bassins / Direction de l'Eau
Collection des Cahiers Techniques
LISTE DES PUBLICATIONS AU 1^{ER} MARS 2000**

N°	TITRE	PRIX	AGENCE D'EXÉCUTION
47	Référentiel de l'utilisation des bioadditifs dans les milieux aquatiques (1996)	150 F	A.G
48	Impact de la nouvelle directive européenne relative à la qualité des eaux destinées à la consommation humaine (1996)	150 F	R.M
49	Etude bibliographique sur les pollutions accidentelles (1996)	150 F	L.B
50	Guide de l'autosurveillance des systèmes d'assainissement (1997)	150 F	R.M.C
51	La gestion intégrée des rivières - Guide méthodologique (1997)	150 F	R.M.C
52	Système d'évaluation de la qualité de l'eau des cours d'eau SEQ-eau Etude de rodage - Rapport final (1997)	150 F	L.B
53	Seuils de qualité pour les micropolluants organiques et minéraux dans les eaux superficielles - Synthèse (1997)	150 F	R.M
54	Optimisation du volet micropolluants du RNB - Guide méthodologique (1997)	150 F	A.G
55	Les bryophytes aquatiques comme outils de surveillance de la contamination des eaux courantes par les micropolluants métalliques (1997)	150 F	L.B
56	Etude méthodologique de l'impact de déversements en temps de pluie Application à la rivière l'Orne - Synthèse (1997)	150 F	R.M
57	Traitement phytosanitaire et qualité des eaux de drainage (1997)	150 F	R.M
58	Modes d'utilisation des produits phytosanitaires en France (1997)	150 F	R.M
59	Réglementations de l'usage des phytosanitaires en Europe (1997)	150 F	R.M
60	Guide inondabilité (1997)	150 F	R.M.C
61	Intérêts et contraintes du recyclage agricole des boues (1998)	150 F	R.M
62	Limnologie appliquée au traitement des plans d'eau (1998)	150 F	R.M.C
63	Efficacité de dispositifs enherbés pour lutter contre la pollution par les phytosanitaires (1998)	150 F	L.B
64	Rapport de présentation du Système d'Evaluation de la Qualité de l'Eau dans les cours d'eau (1998)	150 F	L.B
65	Gestion des transports solides et des attérissements (1999)	150 F	R.M.C
66	Les techniques végétales appliquées aux plans d'eau marnants (1999)	150 F	R.M.C
67	Bilan et analyses des expériences positives en matière de mise en place de périmètres de protection des captages (1999)	150 F	L.B
68	Biologie et écologie des espèces végétales aquatiques proliférantes (1999)	150 F	A.P
69	Programme AGREVE (agriculture-environnement - Vittel) (1999)	150 F	R.M
70	Audit comparatif des filières d'élimination des boues d'épuration (1999)	150 F	R.M
71	Effets de l'extraction des granulats sur les milieux aquatiques (1999)	150 F	R.M.C
72	Les outils d'évaluation de la qualité des cours d'eau - Principes généraux (1999)	150 F	R.M.C
73	La Politique Agricole Commune et ses conséquences sur les ressources en eau Bilan et perspectives (1999)	150 F	A.P
74	Etude d'opinion auprès des usagers des services d'eau et d'assainissement (1999)	150 F	A.P
75	Protection des captages d'eau de surface : quelles stratégies ? (1999)	150 F	A.G
76	Bioessais sur sédiments - Méthodologie et applications à la mesure de la toxicité de sédiments naturels (1993)	150 F	R.M.C
77	Système d'évaluation de la qualité biologique des cours d'eau : (SEQ-bio) Version O - Principes généraux - Synthèse et rapport de présentation (1999)	150 F	R.M.C
78	Réseaux d'assainissement et stations dépuratoires : échanges des données de l'autosurveillance (2000)	150 F	A.G
79	Déchets toxiques produits en petites quantités (2000)	150 F	R.M.C
80	Système d'évaluation de la qualité des eaux souterraines : rapport de présentation Version O (2000)	150 F	R.M.C

La mesure de la toxicité des contaminants présents dans le sédiment nécessite d'exposer des organismes du sédiment à des échantillons naturels ou contaminés artificiellement. Des protocoles d'essais qui concernent différents organismes : des diptères chironomidés (*C. tentans*, *C. riparius*) et un crustacé amphipode (*H. azteca*), sont proposés par l'U.S. Environmental Protection Agency, Environnement Canada ou encore l'OCDE.

A partir de ces protocoles d'essais, le laboratoire d'écotoxicologie du CEMAGREF de Lyon a mis en place un suivi de la survie de *H. azteca* et de *C. riparius* d'une part, et d'autre part de la croissance (poids de *C. riparius*) d'organismes soumis à des toxiques de référence. Des mesures de toxicité ont ensuite été réalisées sur plusieurs échantillons de sédiments naturels, comparées aux effets sur sédiments artificiels témoins.

La survie moyenne obtenue sur les deux organismes sur sédiments artificiel est variable et de l'ordre de 70%. Elle devra être améliorée pour obtenir des survies de plus de 80% et limiter la variabilité. Pour la croissance des chironomes, il est possible de proposer une valeur moyenne dans les témoins de l'ordre de 0,96 mg (0,83 - 1,01) par individu après 10 jours d'essais (âge des organismes entre 14 j. et 15 j.). Différents types d'essais, semi-statiques et continus, ont été réalisés. Pour *H. azteca*, les essais menés en condition continue permettent d'obtenir des résultats de survie plus satisfaisants et présentent de nombreux avantages méthodologiques.

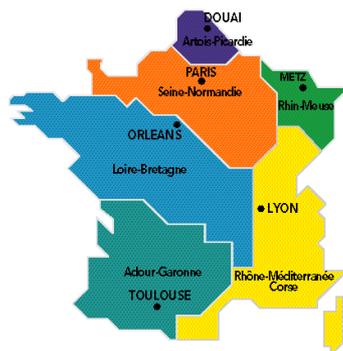
Sur les échantillons de sédiments naturels contaminés, la comparaison des résultats sur *H. azteca* montre une plus grande sensibilité de l'essai sur *H. azteca* que sur celui des chironomes.

Enfin, une comparaison entre les effets biologiques mesurés et les niveaux de contamination des sédiments testés, est proposée.

Agence de l'Eau Adour-Garonne
90, rue du Férétra
31078 TOULOUSE CEDEX 4
Tél. : 05 61 36 37 38
Fax : 05 61 36 37 28

Agence de l'Eau Artois-Picardie
200, rue Marceline - B.P. 818
59508 DOUAI CEDEX
Tél. : 03 27 99 90 00
Fax : 03 27 99 90 15

Agence de l'Eau Loire-Bretagne
Avenue Buffon - B.P. 6339
45063 ORLEANS CEDEX 2
Tél. : 02 38 51 73 73
Fax : 02 38 51 74 74



Agence de l'Eau Rhin-Meuse
Route de Lessy-Roziérieulles
B.P. 30019
57161 MOULINS-LES-METZ
CEDEX
Tél. : 03 87 34 47 00
Fax : 03 87 60 49 85

Agence de l'Eau Rhône-Méditerranée-Corse
2-4, allée de Lodz
69363 LYON CEDEX 07
Tél. : 04 72 71 26 00
Fax : 04 72 71 26 01

Agence de l'Eau Seine-Normandie
51, rue Salvador Allende
92027 NANTERRE CEDEX
Tél. : 01 41 20 16 00
Fax : 01 41 20 16 09

**Ministère de l'Aménagement
du Territoire et de l'Environnement**
Direction de l'Eau
20, avenue de Ségur
75302 PARIS 07 SP
Tél. : 01 42 19 20 21
Fax : 01 42 19 12 06

