



HAL
open science

Développement et validation de microbiotests en phase solide pour l'évaluation écotoxicologique de sédiments

Karen Burga Pérez

► **To cite this version:**

Karen Burga Pérez. Développement et validation de microbiotests en phase solide pour l'évaluation écotoxicologique de sédiments. Autre. Université de Lorraine, 2012. Français. NNT : 2012LORR0219 . tel-01749312

HAL Id: tel-01749312

<https://hal.univ-lorraine.fr/tel-01749312>

Submitted on 29 Mar 2018

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact : ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10

http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php

<http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm>



UNIVERSITÉ
DE LORRAINE



Agence Nationale de la Recherche
ANR



Laboratoire des Interactions Écotoxicologie,
Biodiversité, Écosystèmes (LIEBE)
UMR CNRS 7146, Metz

THESE

Pour l'obtention du titre de :

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE LORRAINE

École doctorale : RP2E

Spécialité : Ecotoxicologie, biodiversité, écosystèmes

Soutenue publiquement par

Karen BURGA PÉREZ

le 7 septembre 2012

Développement et validation de microbiotests en phase solide pour l'évaluation écotoxicologique de sédiments

Directeur de thèse : Jean-François FÉRARD

Université de Lorraine (France)

Rapporteurs:

Christian BLAISE

Environnement Canada

Centre Saint Laurent (Canada)

Claudemir RADETSKI

Universidade do Vale do Itaji (Brésil)

Examineurs :

Davide VIGNATI

Université de Lorraine (France)

Benoît FERRARI

IRSTEA, groupement de Lyon (France)

Rayna CHARLATCHKA

Électricité De France (France)



A mes chers parents

A mis adorados padres

A Pola pour être ma lumière

A Pola por ser mi luz



Remerciements

Arrivée au terme de cette thèse, je tiens à remercier toutes les personnes, et elles sont nombreuses, sans qui ce travail n'aurait pas été possible.

Je tiens à remercier ici Paule VASSEUR de m'avoir acceptée dans le Master Recherche Écotoxicologie et Biodiversité et surtout pour m'avoir donnée l'opportunité de m'initier à la recherche.

Je voudrais exprimer toute ma gratitude à mon directeur de thèse, et ancien directeur du LIEBE, le Professeur Jean-François FERARD, pour son aide et son soutien inconditionnel depuis le M2 et surtout pour le temps précieux qu'il m'a toujours consacré (y compris les week-ends) malgré ses obligations.

Je tiens également à remercier les membres du jury qui ont accepté d'évaluer ma thèse avec la neutralité d'un regard extérieur. Merci aux rapporteurs, les professeurs Christian BLAISE et Claudemir RADETSKI d'avoir accepté de juger mon travail. Merci également aux examinateurs, Davide VIGNATI, Benoît FERRARI et Rayna CHARLATCHKA, pour avoir accepté de faire partie de mon jury.

Je remercie tout spécialement l'Agence Nationale pour la Recherche (ANR) pour avoir financé ce travail de thèse. Je remercie également Électricité de France (EDF, R&D) pour l'aide apportée, ainsi que les participants au projet DIESE pour leur aide dans l'acquisition des échantillons et des données, en particulier Cyrielle Durand, Benoît Ferrari et Marc Babut.

Je voudrais aussi remercier à Philippe USSEGLIO, Carole COSSIU, Jean-François MASFARAUD et Marilyne GOERGEN pour votre support pendant ce long chemin. Un grand merci à la technicienne Chantal FOUQUE pour toutes les heures passées devant la binoculaire et pour tous les services rendus. Philippe ROUSSELLE, je te remercie énormément pour ton aide et ta disponibilité pour mes analyses et la grande aventure du

tracking ostracodes (vraiment tu es un génie !), et cela fait toujours plaisir de discuter avec toi. Je voudrais remercier aussi Yann LANDKOCZ pour sa disponibilité pour m'initier au monde de la cytométrie en flux. Merci à Claudine RAST pour sa collaboration, son dévouement et sa disponibilité. Je remercie également Simon DEVIN pour sa disponibilité et ses conseils.

Je tiens aussi à adresser mes remerciements aux stagiaires que j'ai eu la chance de connaître : Lena FEUERSTOSS et Pang Bo YANG, les mois durant lesquels nous avons travaillé ensemble ont été superbes, un vraie équipe !, bon courage à vous par la suite.

Je voudrais remercier et souhaiter bonne chance à tous mes collègues et amis avec qui j'ai partagé la pièce qui abritait nos bureaux respectifs. Malgré le fait que nous étions chacun dans notre thèse et nos soucis, il y a toujours eu des moments de rigolade (avec des élastiques inclus) et de bonnes discussions : Eric bonne chance dans ta nouvelle aventure, Nelly, Audrey et Hugues bientôt la fin, à tous je vous communique des énergies positives. Stéphane (Noopi) et Amira, je vous souhaite une bonne continuation dans vos thèses.

Un grand merci à Pascalito et Nat, vraiment nous avons passé de bons moments mes amis, merci pour tout et c'est fou que les habitudes culinaires de la Réunion et du Pérou soient aussi rassemblables malgré la distance entre les pays. Celine bientôt sera la fin pour toi aussi, je te souhaite une bonne continuation et je te remercie pour ton amitié, ta confiance et pour m'avoir appris le Français !!!!!

Pendant cette thèse, j'ai eu la chance aussi de rencontrer des gens extraordinaires qui resteront spécialement dans mon cœur pour toujours : Rosy TODA, je te remercie énormément pour ton soutien inconditionnel et pour ton amitié sincère. Hela TOUMI, définitivement la thèse nous rend plus fortes, je te remercie pour ta confiance et ton amitié inconditionnelle, nous sommes une bonne équipe, bientôt la fin de ta thèse aussi (voyage en Tunisie assuré). Anne Sophie FOLTETE, vraiment nous aurons des histoires à raconter à nos enfants, je te remercie énormément pour ton soutien, ta confiance, tes conseils et pour m'avoir fait adopter comme philosophie de vie « relativiser » les choses ; merci aussi pour les innombrables soirées dans le labo en train de philosopher sur la vie. Laetitia MINGUEZ, pour ton amitié, tes précieux conseils, pour les voyages faits

ensemble (vraiment nous nous sommes éclatées) et aussi pour être prête à m'aider dans mes moments de difficultés. Anatole BOICHE, alias « Jesus », pour tous tes encouragements, toutes les fois où je t'ai embeté avec des publis, toutes les soirées vraiment plaisantes et ton amitié.

Je remercie aussi « *mi gente en Perú* », ma famille, mes amis, pour les innombrables appels et messages, leur encouragements ont été très importants pendant tout ce temps, ils m'ont donné plus de force pour continuer ce chemin... mon cœur est toujours avec vous. Nani, Francis, Marie Charlotte, merci merci merci pour tout votre soutien et vos conseils, pour toujours me recevoir chez vous avec les bras ouverts. Toute ma reconnaissance à ma nouvelle famille MONDY, pour leur soutien, leur patience et leur gentillesse.

Un mot spécial pour Anne Marie VEBER, vraiment tu es « mon ange gardien », je te remercie énormément non seulement pour ta contribution technique et professionnelle au cours de la thèse, mais aussi pour ton soutien inconditionnel depuis que j'ai mis mon pied en France, pour me donner plusieurs coups de main dans les difficultés, pour être ma confidente, mon amie, mon *unicorne*.

Cette thèse m'a permis de connaître Cédric MONDY, je n'ai pas assez de mots pour te remercier pour tous les apports techniques que tu as effectué au cours de ce travail, mais également pour ton soutien jour après jour, pour toujours m'encourager et pour partager ta vie avec moi.

Je laisse ces dernières lignes mais pas les moins importantes à mes parents “*Gracias a ustedes lo pude lograr, cada llamada durante este tiempo ha sido un aliciente para continuar adelante en este camino que emprendi ya hace 5 años, gracias por enseñarme que con esfuerzo y perseverancia podemos cumplir nuestros sueños, todo el esfuerzo que esta reflejado en esta tesis se la dedico a ustedes que son mi luz de todos los días*”.

Finalement, je remercie ma soeur « *por siempre estar conmigo en cada paso que doy y por darme tu mano cada vez que caigo* » (pour être toujours avec moi dans chaque pas que je fais et pour me donner ta main chaque fois que je tombe).



Table des matières	
Liste des abréviations.....	17
Introduction générale.....	19
1. Contexte général.....	21
2. La contamination associée aux sédiments.....	23
3. Evaluation de la qualité des sédiments.....	25
3.1 L'approche chimique de l'évaluation de la qualité des sédiments.....	25
3.2 Les bioessais comme outils d'évaluation de la qualité des sédiments.....	26
3.3 Les microbiotests comme outils d'évaluation de la qualité des sédiments.....	27
3.4 Les batteries de bioessais.....	28
3.5 L'évaluation de la qualité des sédiments.....	30
4. Démarche mise en œuvre.....	31
5. Organisation du manuscrit de thèse.....	32
Chapitre 1 : Sédiments évalués dans le cadre de la thèse.....	35
1.1 Sites d'étude.....	37
1.2 Matériel et méthodes.....	38
1.2.1 Prélèvement des sédiments.....	38
1.2.2 Analyses physico-chimiques des sédiments.....	39
1.2.3 Détermination du risque global des sédiments par rapport au polluants mesurés ..	40
1.3 Résultats des analyses physico-chimiques et du risque global de contamination.....	41
Chapitre 2 : Réévaluation du Microtox en phase solide.....	43
2.1 Synthèse Bibliographique.....	45
2.1.1 Tests d'écotoxicité utilisant la bioluminescence des bactéries.....	45
2.1.2 Présentation du test Microtox® en phase liquide (classique).....	47
2.1.3 Présentation du test Microtox® en phase solide (MSPA).....	48
2.1.4 Facteurs confondants dans l'application du test.....	49
2.2 Objectifs du travail.....	51
2.3.1 Résultats des tests MSPA et MLPA.....	53

2.3.2 Résultats publiés dans le journal Chemosphere	56
2.3.3 Relation entre perte des bactéries et matière organique	69
2.4 Conclusions et perspectives	73
Chapitre 3 : Les CEP (complexes enzymatiques photosynthétiques) pour évaluer l'écotoxicité des sédiments	75
3.1 Synthèse Bibliographique	77
3.1.1 La photosynthèse et le photosystème PS II.....	77
3.1.2 Les thylakoïdes comme outil de détection des polluants.....	80
3.1.3 Instruments pour mesurer l'activité du PSII	81
3.1.4 Le LuminoTox.....	82
3.2 Objectifs du travail	83
3.3 Matériel et méthodes	84
3.3.1 Préparation des solutions.....	84
3.3.2 Protocoles expérimentaux	84
3.3.3 Exploitation statistique des données	89
3.4 Résultats et discussion.....	89
3.4.1 Evaluation du Lum-LPA comme test complémentaire au Lum-SPA : Effet des particules fines.....	90
3.4.2 Evaluation ecotoxicologique des 21 sédiments testés avec les tests Lum-SPA et Lum-LPA.	108
3.5 Conclusions et perspectives	113
Chapitre 4 : Evaluation de l'écotoxicité des sédiments à l'aide de l'algue <i>Pseudokirchneriella subcapitata</i>.....	115
4.1 Synthèse bibliographique	117
4.1.1 Les algues comme bioindicateur de la qualité des milieux.....	117
4.1.2 Organisme d'essai	118
4.1.3 Test d'inhibition de la croissance des algues	120
4.1.4 Test d'inhibition de l'activité estérase	120
4.1.5 Généralités sur la cytométrie en flux et son utilisation en Ecotoxicologie	121
4.3 Matériel et méthodes	123
4.3.1 Préparation de l'inoculum algal	123

4.3.2 Protocoles expérimentaux	124
a) Le test algue en phase solide (ASPA) (figure37).....	124
b) Le test algue en phase solide basé sur l'inhibition de croissance (ASPAIC)	126
4.3.3 Exploitation statistique des données	128
4.4 Résultats et discussion.....	128
4.4.1 Résultats du test ASPA.....	128
4.4.2 Résultats du test ASPAIC.....	131
4.4.3 Discussion des résultats.....	133
4.5 Conclusions et perspectives.....	137
Chapitre 5 : Les ostracodes pour évaluer l'écotoxicité des sédiments	139
5.1 Synthèse Bibliographique	141
5.1.1 Les Ostracodes	141
5.1.2 Test d'écotoxicité avec <i>Heterocypris incongruens</i>	143
(Ramdohr, 1808)	143
5.2 Objectifs du travail	146
5.3 Matériel et méthodes	146
5.3.1 Préparation du milieu d'essai	146
5.3.2 Préparation de la solution algale <i>Pseudokirchneriella subcapitata</i>	147
5.3.3 Préparation des organismes d'essai.....	147
5.3.4 Présentation des protocoles expérimentaux	148
5.3.5 Exploitation statistique des données	149
5.4 Résultats et discussion.....	150
5.4.1 Résultats avec le test classique.....	151
5.4.2 Résultats avec le test modifié	157
5.4.3 Discussion des résultats.....	162
5.5 Conclusions	165
Chapitre 6 : Intégration des réponses de la batterie de microbiotests	167
6.1 Introduction	169
6.2 Résultats: Publication à soumettre	170
6.2.1 Abstract	170
6.2.2 Introduction	171

6.2.3 Material and Methods.....	172
6.2.4 Results	178
6.2.5 Discussion and conclusion	187
6.2.6 References	191
Chapitre 7 : Synthèse, discussion générale et conclusions.....	197
7.1 Synthèse et discussion générale	199
7.2 Conclusions générales	213
Références Bibliographiques.....	217
Annexes	253
Résumé / Abstract.....	268

Liste de Figures

Introduction

- Figure 1:** Représentation schématique du rôle des sédiments comme support de la chaîne trophique dans les milieux aquatiques..... 22
- Figure 2:** Distribution des métaux dans les milieux aquatiques selon Rigaud (2011). 24

Chapitre 1

- Figure 3:** Localisation des sites de prélèvement..... 37

Chapitre 2

- Figure 4:** Image de *Aliivibrio fischeri* au microscope électronique 45
- Figure 5:** Colonies de *Aliivibrio fischeri* suite à une exposition de 20 minutes au sédiment CMA. a) colonies dans le témoin (NaCl 2%), b) colonies après une exposition à 2.5% de sédiment humide, c) colonies après une exposition à 10% de sédiment humide..... 46
- Figure 6:** Mode opératoire du test Microtox® en phase solide (MSPA)..... 51
- Figure 7:** Mode opératoire du test Microtox® appliqué au lixiviat (MLPA)..... 52
- Figure 8:** Schéma expérimental utilisé pour estimer le nombre de bactéries luminescentes retenues soit par le filtre soit par la phase solide du sédiment testé. 52
- Figure 9:** Corrélation entre les CI50 obtenues avec les tests MSPA et MLPA 54
- Figure 10:** Schéma explicatif du mode d'action des toxiques dans le test MSPA 55
- Figure 11:** Microtox® solid phase assay and Microtox® leachate phase assay protocols..... 60
- Figure 12:** Flow cytometry dot plots FL1 vs. SSC showing from the left to the right..... 61
- Figure 13:** IC50s related to solid phase (white bars) and leachate phase (dark bars) assays for all samples 62
- Figure 14:** Percentages of bacterial loss for each sediment concentration tested with Syto 13 (stripped bars) and Sybr-Green I (filled bars) a) sediment CMA, b) Sediment PG2 63
- Figure 15:** Plot of percentages of bacterial loss in relation to percentages of silt +clay for each tested sediment concentration..... 64
- Figure 16:** Plot of IC50 values in MSPA (dark triangles) and the Ringwood et al (1997) study (dark squares) in relation to percentage of silt +clay for each sediment tested 66
- Figure 17:** Relation entre le pourcentage de perte des bactéries avec la matière organique pour chaque concentration de sédiment testé..... 69
- Figure 18:** Classification ascendante hiérarchisée des CI 50 corrigées obtenues avec le MSPA corrigé (distance euclidienne et critère d'agrégation de Ward)..... 71

Chapitre 3

- Figure 19:** Schéma des réactions de la phase lumineuse de la photosynthèse (Rochaix 2011). Les lignes discontinues représentent les voies de transport des électrons. 78
- Figure 20:** Chloroplaste et thylakoïdes..... 79
- Figure 21:** Schéma qui montre le site de liaison entre les herbicides et le PSII..... 80
- Figure 22:** Mode opératoire de la procédure expérimentale du test Luminotox en phase solide (Lum-SPA) selon Dellamatrice *et al.* (2006)..... 85
- Figure 23:** Mode opératoire de la procédure expérimentale du test Luminotox sur lixiviat de la phase solide (Lum-LPA) 86
- Figure 24:** Experimental procedure Luminotox assays 95
- Figure 25:** Exemples of concentration-response curves for Lum-SPA (solid lines) and Lum-LPA (dotted lines).....97

Figure 26: Plot of IC50s obtained with Lum-SPA in relation to percentage of silt + clay for the 12 samples tested.....	99
Figure 27: Plot of IC50s for Lum-SPA in relation to percentages of silt + clay (the dotted lines correspond to the samples considered as polluted sediments and the solid line corresponds to samples considered as reference samples)	100
Figure 28: Percentage of inhibition observed in Lum-DCA, Lum-SPA and Lum-LPA (black, grey and white bars, respectively) for 100% bentonite, 50/50 (w/w) bentonite/kaolinite and 100 % kaolinite assays (n=3).....	102
Figure 29: Percentages of inhibition observed in Lum-SPA for 100% bentonite, 50/50 (w/w) bentonite/kaolinite and 100 % kaolinite assays (n=3) and the corresponding chlorophyll a concentrations found in filtrates (n=3)	103
Figure 30: Percentage of inhibition observed in Lum-DCA, Lum-SPA and Lum-LPA (black, grey and white bars, respectively) for 100% bentonite, 50/50 (w/w) bentonite/kaolinite and 100 % kaolinite assays in presence of copper (n=3) and for copper sulphate alone (n=3).....	104
Figure 31: Plot of Lum-SPA IC50s and Mic-SPA IC50s for the tested samples.....	105
Figure 32: Corrélacion observée entre les CI50 obtenues à l'aide des deux variantes des tests Luminotox ($p < 0,001$) pour 21 sédiments testés. La droite en trait plein correspond à la droite de régression, la droite en tirets correspond à la 1ère bissectrice	109
Figure 33: Classification ascendante hiérarchisée des sédiments basée sur les résultats du Lum-SPA (distance euclidienne et critère d'agrégation de Ward).....	110
Figure 34: Corrélacion observée entre les CI50 obtenues avec le MSPA et Lum-SPA pour 21 sédiments testés. La droite en trait plein correspond à la droite des moindres carrés, la droite en tirets correspond à la 1ère bissectrice.....	112

Chapitre 4

Figure 35: L'algue verte <i>Pseudokirchneriella subcapitata</i> , vue en microscopie optique	119
Figure 36: Schéma d'un cytomètre en flux	122
Figure 37: Procédure expérimentale du test ASPA.....	124
Figure 38: Histogrammes obtenus au cytomètre de flux pour des algues témoins (à gauche sans FDA, à droite avec FDA)	125
Figure 39: Visualisation des fenêtres de comptage (R1 = Algues) dans le cytomètre de flux.....	126
Figure 40: Mode opératoire de la procédure expérimentale du test algues en phase solide basé sur l'inhibition de croissance (ASPAIC).....	127
Figure 41: Pourcentages d'inhibition de l'activité estérase en fonction du pourcentage de sédiment humide testé après 4 heures d'exposition.....	129
Figure 42: Exemples des courbes de relation dose-réponse A) pour les sédiments qui ont provoqué des inhibitions de croissance aux algues, B) pour les sédiments qui ont provoqué des stimulations de croissance des algues, après 4 heures d'exposition aux sédiments et 72 heures d'incubation en lumière continue.	131
Figure 43: Relation entre les CI_{10} obtenues à l'aide des deux variantes du test algues pour 8 des sédiments testés.	133

Chapitre 5

Figure 44: Anatomie d'un ostracode (femelle).....	141
Figure 45: Vues latérales et frontales de <i>Heterocypris incongruens</i>	144
Figure 46: Inhibition de croissance (%) des ostracodes après 6 jours d'exposition aux 21 sédiments naturels de la 1ère, 2ème, 3ème campagne et les sédiments provenant du département du JURA pour les 4 concentrations testées. Les carrés bleus indiquent les deux plus faibles concentrations testées (3 et 10%)	153
Figure 47: ACP réalisée sur les cinq paramètres sélectionnés pour évaluer l'écotoxicité des sédiments avec le test ostracode classique. La figure à gauche présente le cercle des corrélations.....	154

Figure 48: ACP réalisée sur les deux paramètres sélectionnés pour évaluer l'écotoxicité des sédiments avec le test ostracode classique. La figure à gauche présente le cercle des corrélations.....	155
Figure 49: Classification ascendante hiérarchisée (distance euclidienne et critère d'agrégation de Ward) réalisée avec : A) pourcentage maximal de mortalité atteint, B) pourcentage maximal d'inhibition de croissance atteint.....	156
Figure 50: Inhibition de croissance (%) des ostracodes après 6 jours d'exposition aux sédiments naturels de la 1ère, 2ème, 3ème campagne et les sédiments provenant du département du JURA pour le 4 concentration testées.....	159
Figure 51 (A, B): Représentation graphique de la corrélation obtenue entre les deux méthodes en utilisant le critère A) pourcentage de mortalité maximal atteint et B) pourcentage d'inhibition de croissance maximal atteint (test de rang de Spearman, seuil 5%).....	160
Figure 52: Classification ascendante hiérarchisée (distance euclidienne et critère d'agrégation de Ward) réalisée avec : A) pourcentage maximal de mortalité atteint, B) pourcentage maximal d'inhibition de croissance atteint – Test modifié.....	150
Figure 53: Principal component analysis performed on the 17 sediments x 32 physico-chemical parameters data set. A) Correlation circle of the physico-chemical parameters on the first factorial plane, B) distribution of the sediments on the first factorial plane according to their physico-chemical characteristics.....	179
Figure 54: Maximum percentage of mortality (on the left) and maximum percentage of growth inhibition (on the right) of the ostracod <i>Heterocypris incongruens</i> exposed to the 17 tested sediments	182

Chapitre 6

Figure 55: Principal components analysis performed on the 17 sediments x 3 microbiotests' array A) Correlation circle between microbiotests endpoints and the two first principal components, B) distribution of sediments according to their microbiotest endpoints values	183
Figure 56: Graphical representations of the IBR for the 17 sediments tested.....	184
Figure 57: Linear relationship (solid line) and 95% confidence interval (dotted lines) between IBR and PEEP scores.	186
Figure 58: Correlation between IBR (a) and PEEP sediment ranking (b) with the QPEC sediment ranking. The solid line corresponded to the linear regression between both parameters	186

Chapitre 7

Figure 59 (A,B): Analyse de coinertie entre les réponses des trois microbiotest sélectionnés (Mic-SPA corrigé, Lum-SPA, Ostracodes)	202
Figure 60: Classification ascendante hiérarchisée (distance euclidienne et critère d'agrégation de Ward) réalisée à partir des valeurs de distances calculées du tableau 19.....	203
Figure 61 (A,B,C): Représentation de la corrélation du test Spearman entre les classement des 21 échantillons testé pour chaque microbiotest. Les droites représentant la relation linéale entre les deux classements.....	208
Figure 62: Analyse en composantes principales avec les trois microbiotests sélectionnés (Mic-SPA, Lum-SPA et ostracodes) avec l 21 sédiments testé (1er, 2eme, 3eme campagne et les sédiments du JURA).....	209

Liste de Tableaux

Tableau 1: Microbiotests sélectionnés dans le cadre de la thèse.....	32
Tableau 2: Localisation et codage des 21 sédiments testés dans le cadre de la thèse	38
Tableau 3: Valeurs de QPEC _m calculé par chaque sédiment testé.....	41
Tableau 4: Catégorisation des sédiments d'étude en fonction de leur QPEC _m	42
Tableau 5: Résultats des deux variantes du test Microtox® pour les 21 sédiments testés.....	53
Tableau 6: MSPA, MLPA and new MSPA IC50s.....	65
Tableau 7: Résultats du test MSPA corrigé	70
Tableau 8: Conditions testées avec le Lum-SPA, Lum-LPA et Lum-DCA.....	88
Tableau 9: Lum-SPA and Lum-LPA results for 12 natural sediments samples (expressed in g dry weight L-1).....	98
Tableau 10: Lum-LPA supernatant and Lum-LPA results (expressed in g dry weight L-1) for 12 natural sediments samples (n.a = not applicable).....	101
Tableau 11: Résultats des deux variantes du test Luminotox pour les 21 sédiments testés (CI50 g sed sec/L de milieu).....	108
Tableau 12: Résultats du test ASPA pour les 21 sédiments testés	130
Tableau 13: Résultats du test ASPAIC pour les 21 sédiments testés	132
Tableau 14: Différences entre le test classique et test modifié	149
Tableau 15: Mortalité (%) des ostracodes après 6 jours d'exposition aux sédiments naturels avec le test classique.....	151
Tableau 16: Mortalité (%) des ostracodes après 6 jours d'exposition aux sédiments naturels avec le test modifié	157
Tableau 17: Results of the Microtox solid phase assay, Luminotox solid phase assay for the 17 tested sediments.....	181
Tableau 18: Ranking of sediments according to QPEC score, IBR index and PEEP index	185
Tableau 19: Distances calculés à partir des coordonnées de départ et arrivé des vecteurs de l'analyse de coïnertie entre les trois microbiotest sélectionné et la chimie des sédiments mesuré.	203
Tableau 20: Résumé des trois microbiotests sélectionnés comme outil de screening pour évaluer l'écotoxicité potentiel des sédiments.....	215

Liste des abréviations

- ACP:** Analyse en Composantes Principales
- AFNOR:** Association Française de Normalisation
- ASPA:** Algal Solid Phase Assay
- ASPAIC:** Algal Solid Phase Assay avec Inhibition de Croissance
- ASTM:** American Society for Testing and Materials
- CEP:** Complexes Enzymatiques Photosynthétiques
- COD :** Carbone Organique Dissous
- DIESE:** Outils de Diagnostic de l'Ecotoxicité des Sédiments
- FDA:** Diacétate de Fluorescéine
- FSC:** Forward angle light scatter
- HAP:** Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques
- HS:** Substances Humiques
- IBR:** Integrated Biomarker Response
- PI:** Iodure de Propidium
- ISO:** International Standardisation Organization
- LAS :** Lauryl Sulfonate
- LOE:** Line of evidences
- Lum-DCA:** Luminotox Direct Contact Assay
- Lum-LPA:** Luminotox Leachate Phase Assay
- Lum-SPA:** Luminotox Solid Phase Assay
- MLPA:** Microtox Leachate Phase Assay
- MO:** Matière Organique
- MSPA:** Microtox Solid Phase Assay
- PAM:** Pulse Amplitude Modulator
- PCB:** Polychlorobiphényle
- PEA:** Plant Efficiency Analyser
- PEC:** Probable Effect Concentration
- PEEP:** Potential Ecotoxic Effects Probe
- PQ:** Plastoquinone
- PSI:** Photosystème I

PSII: Photosystème II

SFW: Standard Fresh Water

SSC: Side Scatter light

TEC: Threshold effect concentration

Introduction générale

1. Contexte général

Les écosystèmes aquatiques continentaux constituent l'une des cibles des politiques nationales et européennes de protection et de gestion des ressources, notamment au travers de la **directive européenne cadre sur l'eau** (DCE). En effet, cette directive a fixé des objectifs pour la préservation et la restauration de l'état écologique des eaux superficielles (eaux douces et eaux côtières) et souterraines. Elle établit un cadre commun pour les états membres pour une gestion commune et transfrontalière de l'eau et vise notamment à atteindre le bon état écologique des masses d'eau superficielles et souterraines en 2027 avec deux étapes clés en 2015 et 2021.

L'importance des sédiments dans les systèmes aquatiques réside dans leur rôle comme soutien à la productivité primaire en tant que substrat et source de nutriments. Ce rôle est essentiel pour les organismes qui représentent les premiers maillons de la chaîne alimentaire (figure 1), desquels dépendent tous les autres organismes aquatiques. Les sédiments constituent également un habitat et une source de matière organique pour de nombreux invertébrés fouisseurs et/ou benthiques et pour des poissons benthiques pendant une bonne partie de leur cycle de vie. Les sédiments sont à la fois des réservoirs et des sources potentielles de pollution des écosystèmes aquatiques pour de nombreux polluants chimiques potentiellement toxiques pour les organismes (Chapman et Long 1983). Pour cette raison, il convient de les surveiller, évaluer et protéger afin de garantir l'intégrité de la structure et du fonctionnement des écosystèmes aquatiques.

La gestion des sédiments contaminés représente également un coût économique important et pose de nombreux problèmes aux organismes gestionnaires du milieu aquatique, notamment lors des opérations de dragage. En France, 2 800 000 m³ de sédiments sont dragués annuellement soit un coût de 56 millions € (L'Her *et al.* 2007) : sachant que les coûts de remédiation peuvent être multipliés par un facteur pouvant aller de 1,5 à 5 (Schneider 2001). Par conséquent, les gestionnaires et personnes impliquées dans la prise de décisions ont besoin de méthodologies pertinentes et robustes d'évaluation des dangers et des risques environnementaux des sédiments pour leur permettre de hiérarchiser et proportionner les efforts mis en œuvre.

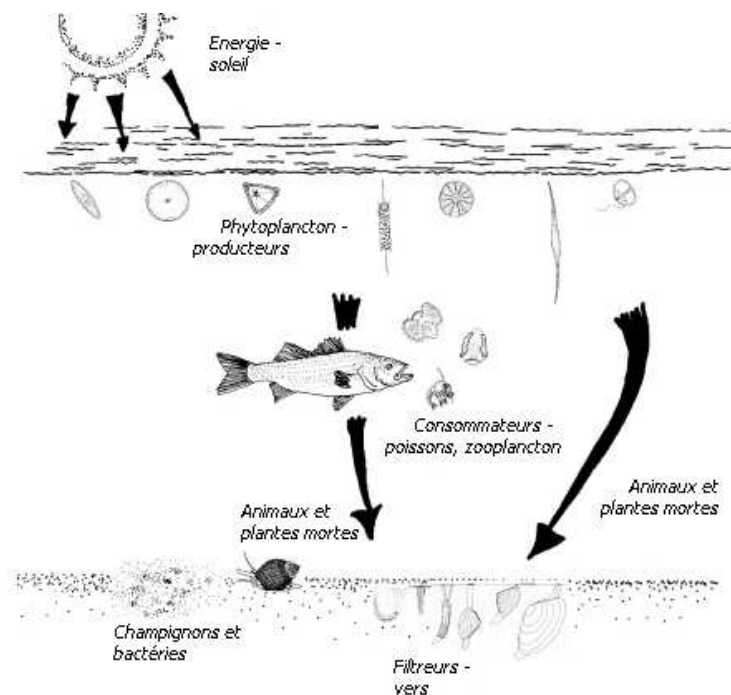


Figure 1: Représentation schématique du rôle des sédiments comme support de la chaîne trophique dans les milieux aquatiques.

Source : <http://www.glf.dfo-mpo.gc.ca/Golfe/Guide-Au-bord-de-la-mer/Introduction>

Dans ce contexte, le projet ANR-PRECODD DIESE (Outils de Diagnostic de l'Ecotoxicité des Sédiments) a regroupé différents laboratoires appartenant aux Universités de Lorraine (LIEBE), de Reims-Champagne-Ardenne (URVVC) à l'IRSTEA et à EDF-R&D. Ceux-ci ont réuni leurs efforts pour le développement d'une **stratégie d'évaluation du risque environnemental des sédiments** contaminés d'eau douce, à partir d'une approche progressive, combinant des outils chimiques et biologiques. C'est dans le cadre de ce projet que se situe notre travail de recherche qui concerne le **développement et l'optimisation de microbiotests en phase solide** pour évaluer l'écotoxicité des sédiments.

2. La contamination associée aux sédiments

Les sédiments constituent un système biogéochimique ouvert, dynamique et hétérogène (Hartl *et al.* 2005) formé par l'accumulation de particules naturelles ou anthropogènes, organiques ou inorganiques provenant (i) des eaux de ruissellement continental, (ii) de dépôts d'érosion (iii) de dépôts atmosphériques (iv) de divers résidus de décomposition des organismes endogènes et de ceux présents sur les ripisylves.

Dans le milieu aquatique, ces différentes matières particulaires peuvent se retrouver soit sous la forme de matières en suspension (MES) soit de sédiments déposés. Les sédiments sont constitués de deux phases : une phase solide dominante et une phase liquide. Ils ont, de plus, une structure hétérogène, généralement stratifiée (Amiard 1992), où le gradient d'oxygène dissous gouverne la plupart des réactions physico-chimiques (figure 2). De même, les sédiments peuvent être divisés en deux groupes selon la taille des particules : les sédiments fins (argiles $< 2\mu\text{m}$ et limons $2-20\mu\text{m}$), avec une forte surface de contact ce qui favorise l'association avec des contaminants de type métallique, et les sédiments grossiers (sables $0.2-2\text{ mm}$ et graviers $> 2\text{mm}$) avec des surfaces de contact plus limitées et donc une association moins probable avec les contaminants (Geffard 2001).

La contamination des sédiments se produit principalement du fait de la liaison des polluants aux particules organiques ou inorganiques en suspension avant de se déposer au fond des ruisseaux, rivières, réservoirs, étangs, lacs, estuaires, ou eaux marines (Schorer 1997, Ragnarsdottir 2000). Les milieux aquatiques sont des milieux dont la complexité influence la distribution des contaminants (e.g. les métaux sur la figure 2). Ces contaminants peuvent alors se retrouver i) dans la phase aqueuse sous la forme d'ions libres hydratés, complexés avec des ligands inorganiques comme les carbonates, au carbone organique dissous (COD), et ii) dans la phase particulaire où ils peuvent être adsorbés et s'accumuler sur les particules fines, complexés par la matière organique, adsorbés et/ou co-précipités par les hydroxydes de fer et manganèse ou précipités par les ions sulfures. Les polluants organiques comme les HAP, peuvent aussi se présenter sous forme dissoute et/ou adsorbés à la matière organique et aux particules fines (Förstner

1983, Evans *et al.* 1990, Castro et Vale 1995, Schorer 1997, Gao *et al.* 1998, Mitra *et al.* 1999).

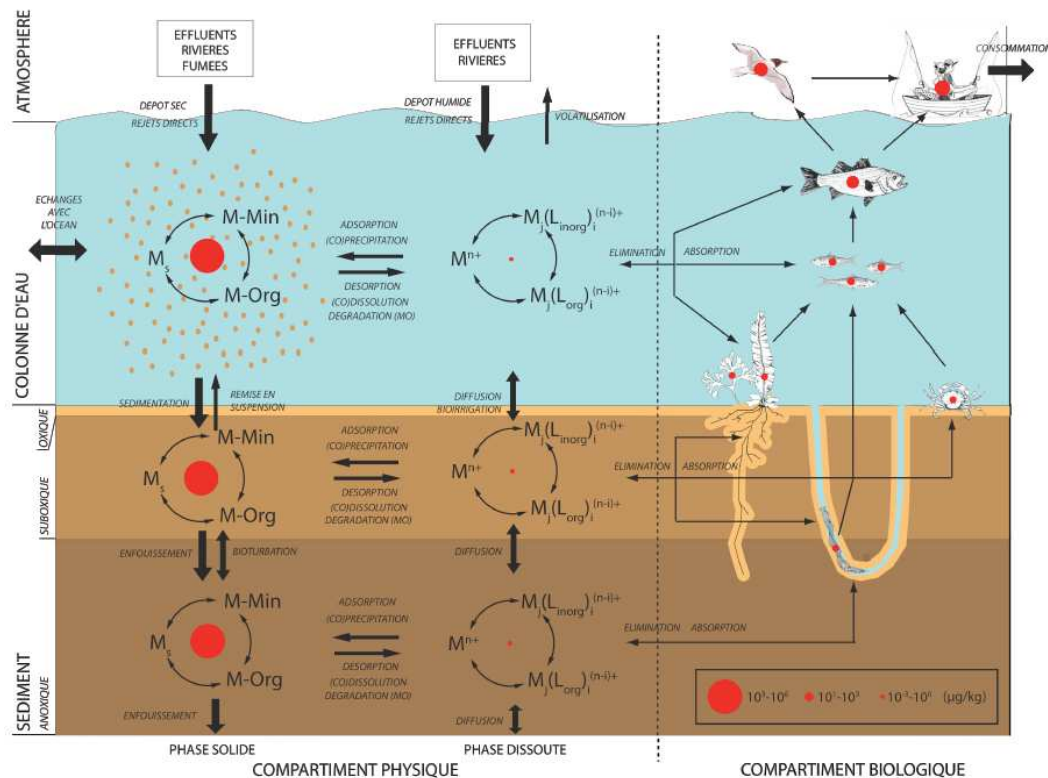


Figure 2: Distribution des métaux dans les milieux aquatiques selon Rigaud (2011).

Les cercles rouges représentent les concentrations des métaux (en $\mu\text{g.kg}^{-1}$ de masse sèche de particules ou d'organismes pour le compartiment solide et biologique respectivement et en $\mu\text{g.kg}^{-1}$ de phase dissoute pour le compartiment dissous).

M représente des polluants métalliques.

M_s , M_{-Min} et M_{-Org} représentent les polluants métalliques sous forme solide ou associés à une phase minérale ou organique.

M^{n+} , $M_j(L_{org})_{i(n-i)+}$ et $M_j(L_{inorg})_{i(n-i)+}$ représentent les polluants métalliques libres ou complexés à un ligand organique ou inorganique en solution respectivement.

Les sédiments ont tendance à accumuler de nombreux composés chimiques, et d'agir comme un puits, voire un « piège » pour les polluants. Les variations de mobilité des métaux (passage des formes colloïdale et particulaire à la forme dissoute) dépend de la salinité, du pH, du potentiel redox (Eh), et / ou des perturbations mécaniques (par exemple des activités de dragage) ou biologiques (par exemple la bioturbation) (Geffard 2001). Toute modification de ces conditions peut induire la libération des contaminants, y compris à l'intérieur des organismes filtreurs susceptibles d'ingérer les particules. Les sédiments peuvent donc agir non seulement en tant que piège, mais aussi comme une

source de polluants pour la faune inféodée aux sédiments c'est-à-dire benthiques et épibenthiques (Li *et al.* 2001, Horsfall et Spiff 2002, Hartl *et al.* 2005). Les conséquences d'une exposition à des sédiments contaminés peuvent avoir lieu au niveau de la survie, de la croissance, de la reproduction ou d'autres fonctions biologiques des organismes (Ribocco *et al.* 2011). De plus, la bioaccumulation des polluants chez les organismes benthiques ou d'autres organismes aquatiques peuvent déclencher des processus de bioamplification ayant pour résultat des concentrations très importantes des produits chimiques dans les niveaux les plus élevés de la chaîne trophique (Yi *et al.* 2008).

3. Evaluation de la qualité des sédiments

3.1 L'approche chimique de l'évaluation de la qualité des sédiments

Le risque associé aux sédiments contaminés peut être extrapolé sur la base de leur caractérisation chimique. Les concentrations totales de tel ou tel élément ou molécule peuvent être comparées avec des normes de qualité des sédiments, telles que celle définies par MacDonald *et al.* (2000) à partir de la compilation de résultats de nombreuses études réalisées en laboratoire et en milieu naturel. A partir de cette base de données, ces auteurs ont défini, pour chaque contaminant, une concentration seuil dénommée TEC¹ (concentration au-dessous de laquelle un contaminant n'est probablement pas toxique) et PEC² (concentration au-dessus de laquelle un contaminant est probablement toxique).

Toutefois au cours de la dernière décennie, de nombreuses études ont conclu que la seule quantification des concentrations en contaminants n'était pas suffisante pour obtenir des conclusions précises sur l'écotoxicité réelle des sédiments. En effet, il est pratiquement impossible d'identifier et de mesurer la concentration de tous les toxiques potentiels. De plus, ces approches ne prennent pas en considération les interactions entre les contaminants, la matrice et le biote (Chapman *et al.* 1992, Davoren *et al.* 2005, Leitgib *et al.* 2007, García-Lorenzo *et al.* 2009).

¹ Threshold effect concentration

² Probable effect concentration

3.2 Les bioessais comme outils d'évaluation de la qualité des sédiments

Les bioessais (ou biotests) se caractérisent par une complexité croissante et à l'inverse une représentativité décroissante des tests aigus aux tests chroniques (Caquet, 1990). Comme souligné par Vasseur et Férard (1993), ils traduisent la biodisponibilité des différents polluants présents dans les milieux étudiés et ils intègrent les interactions entre polluants au sein de ces mêmes milieux ainsi que les effets de tous les contaminants non détectés ou recherchés par les analyses chimiques.

C'est seulement au cours des années 1970 que se sont développés les premiers essais d'écotoxicité sur sédiments (Gannon et Beeton, 1971). Depuis lors, une grande variété de tests d'écotoxicité ont été proposés pour évaluer les effets écotoxiques des sédiments (Burton Jr. 1991, Burton Jr. *et al.* 1996, Traunspurger et Drews 1996, van Beelen 2003, Bat 2005). Bien que chacun de ces tests a son propre intérêt, car évaluant la réponse d'une espèce particulière, ils varient considérablement dans leurs sensibilité et capacité discriminatoire Burton Jr *et al.* (1996). Les organismes sont choisis en fonction de la phase sédimentaire à tester. Par exemple des bactéries, des algues et des crustacés sont couramment utilisés pour tester les différents extraits des sédiments (Dutka *et al.* 1991, Santiago *et al.* 1993, Burton Jr *et al.* 1996, Okamura *et al.* 1996, Burton Jr *et al.* 2001). Pour tester la phase solide des organismes fouisseurs ont été principalement utilisés par exemple des amphipodes comme *Rhepoxynius abronius* (Swartz *et al.* 1984) et *Corophium volutator* (Pelegrí et Blackburn 1994) des polychètes (*Neanthes arenaceodentata*, McDonald et Haynes 2001), des copépodes (*Amphiascus tenuiremis* Hagopian-Schlekat *et al.* 2001) et des bivalves (*Crassostrea gigas* Geffard *et al.* 2003).

3.3 Les microbiotests comme outils d'évaluation de la qualité des sédiments

La pression croissante pour diagnostiquer le potentiel toxique d'échantillons environnementaux de plus en plus nombreux et les frais des analyses biologiques classiques de toxicité pour la surveillance des sites contaminés ont stimulé la recherche de différentes alternatives aux bioessais classiquement utilisés. Une de ces alternatives a consisté en une miniaturisation des bioessais et a conduit au développement de microbiotests. En 1991, Blaise a défini les microbiotests comme des tests qui consistent à «exposer des organismes unicellulaires ou de petits organismes pluricellulaires à un échantillon liquide dans le but de mesurer un effet spécifique». Cette définition privilégie donc la nature de l'organisme plutôt que la miniaturisation et permet de ranger toute une série de tests sous cette bannière, y compris les tests en kit que l'on peut définir comme des tests ne nécessitant pas d'élevages pérennes des organismes d'essai (Férard, comm. pers.). Toutefois, l'ensemble constitué par les tests subcellulaires (donc enzymatiques), les immunoessais et les tests de contact direct entre matrices solides et organismes d'essai s'y sont ajoutés plus tard (Blaise *et al.* 1998). Divers ouvrages (ou chapitres d'ouvrages) ont été consacrés à l'utilisation des microbiotests depuis une quinzaine d'années (Wells *et al.* 1998, Persoone *et al.* 2000, Blaise et Férard, 2005). Ces microbiotests apparaissent ainsi comme des substituts adéquats des macrobiotests (Blaise, 1991). Le terme de macrobiotests (ou de macrobioessais) n'a pas été très utilisé dans la littérature et aucune définition n'en a été fournie à notre connaissance. Toutefois si l'on se réfère à la première définition qu'en a donnée Blaise 1991, ils pourraient se définir comme des biotests utilisant des organismes pluricellulaires de taille plus conséquente que ceux utilisés dans les microbiotests. Bombardier 2007 cite les essais portant sur *Chironomus riparius*, *C. tentans*, *Hyalella azteca* et *Hydra attenuata* comme les macro-bioessais les plus connus. Mais il n'en reste pas moins vrai que la différence entre microbiotests et macrobiotests reste arbitraire, floue et relativement subjective.

Le premier test en kit a été développé dans les années 1970. Il utilise la bactérie *Allivibrio fischeri* et est connu commercialement sous la dénomination de Microtox®. Au cours des années, le développement des microbiotests a rapidement progressé, et leur importance

est de plus en plus grande dans la détermination des niveaux de pollution de l'environnement et dans l'évaluation des risques (Wadhia et Thompson 2007). Ces tests, originellement applicables au seul milieu liquide (cf. première définition de Blaise de 1991) sont maintenant de plus en plus utilisés pour évaluer la toxicité des sols et des sédiments (Casado-Martinez *et al.* 2007).

Dans les évaluations de danger des sédiments, les organismes peuvent être exposés à différentes fractions sédimentaires : le sédiment entier, la phase liquide du sédiment (eau interstitielle) ou un extrait (élutriat) aqueux ou organique (à l'aide de solvant comme le diméthylsulfoxyde ou l'acétone). Des tests d'écotoxicité utilisant des extraits aqueux et ou organiques ont été réalisés avec des organismes appartenant à différents niveaux trophiques (Ankley *et al.* 1991, Burgess *et al.* 1993, Harkey *et al.* 1994, Jo *et al.* 2008). Mais il a été souligné que ces approches ne sont pas suffisantes puisqu'elles ne prennent pas en compte la diversité des voies d'exposition des organismes d'essai aux contaminants présents dans les sédiments (Adams 1986, Power et Chapman 1992, Persoone *et al.* 2003). De plus, les méthodes d'extractions utilisées peuvent modifier fortement les conditions physico-chimiques dans les sédiments, et peuvent ainsi rendre certaines substances plus ou moins biodisponibles (Matthiessen *et al.* 1998). Il a ainsi été proposé d'évaluer toutes les phases des sédiments à l'aide de bioessais (Bombardier et Bermingham 1998), mais aussi de développer des tests adaptés à l'évaluation de l'écotoxicité potentielle de la phase solide (Brouwer *et al.* 1990, Blaise et Ménard 1998, Chial et Persoone 2002, Czerniawska-Kusza *et al.* 2006, Dellamatrice *et al.* 2006). Les tests de contact direct entre les organismes et les sédiments sont considérés comme un des meilleurs indicateurs de l'écotoxicité des sédiments puisque les organismes peuvent alors être exposés simultanément au sédiment et à l'eau interstitielle lors du déroulement des tests (Burton Jr. 1992).

3.4 Les batteries de bioessais

En 1983, Cairns signait un premier article intitulé «*Are single species alone adequate for estimating environmental hazard?*» avant un deuxième article lui-même intitulé «*The myth of the most sensitive species*» (Cairns 1986) montrant bien qu'il ne fallait pas seulement mettre

l'accent sur les réponses d'une seule espèce. L'utilisation de différents organismes dans une batterie de bioessais permet d'obtenir des informations complémentaires sur les effets écotoxiques associés à un sédiment, permettant ainsi d'avoir une image plus précise sur l'impact de ce sédiment sur les organismes dans les milieux naturels. C'est ainsi que la nécessité de mettre en œuvre une batterie de biotests a été mise en avant dans plusieurs études (Dutka *et al.* 1986, Bombardier et Bermingham 1999, Bombardier et Blaise 2000, Milani *et al.* 2003, Davoren *et al.* 2005, Kammann *et al.* 2005, Roman *et al.* 2007, Narracci *et al.* 2009, Tuikka *et al.* 2010). Les espèces utilisées sont généralement des espèces pélagiques (e.g. quand il s'agit de tester des élutriats), épibenthiques ou benthiques, voire terrestres (e.g. quand il s'agit d'évaluer un scénario de dépôt terrestre). Il est important de souligner que certaines espèces (benthiques et épibenthiques) ingèrent des particules sédimentaires et il convient donc de prendre en compte des tests sur sédiments entiers pour tenir compte de cette voie d'exposition. A cet égard, l'évaluation des effets écotoxiques des sédiments peut se faire sur sédiments bruts (i.e. entiers) ou sur différentes fractions (élutriats, eaux interstitielles, extraits organiques,...). L'exemple le plus emblématique d'une batterie intégrant ces différentes fractions et différentes espèces, et utilisant nombre de microbiotests est représenté par la batterie proposée par Bombardier et Bermingham 1999, Bombardier et Blaise 2000 et Bombardier 2005 qui en déduisent un indice global d'écotoxicité appelé SED-TOX.

Les caractéristiques d'une batterie idéale ont été définies par Férard et Ferrari 2005. Elles comprennent i) des caractéristiques propres à chacun des tests composant la batterie (rapidité, simplicité, reproductibilité, standardisation, sensibilité, représentativité écologique, non-utilisation de vertébrés) ainsi que ii) des caractéristiques propres à l'ensemble de la batterie (rapport coût-efficacité, absence de redondance, capacité de discrimination, nombre suffisant de niveaux trophiques, de critères d'effet et de voies d'exposition). Comme le souligne fort justement Bombardier 2005, de multiples paramètres mesurés sont nécessaires pour évaluer de façon précise l'écotoxicité d'un milieu testé. En effet, une seule réponse mesurée ne saurait faire la différence entre sites contaminés et non-contaminés. Mais *a contrario*, au sein d'une batterie donnée, il n'est guère surprenant que des situations surviennent où des réponses à la fois positives et négatives sont mesurées pour un même échantillon. Une batterie de bioessais peut

intégrer une très grande variété d'espèces (par exemple : bactéries, algues, macrophytes, invertébrés, poissons, plantes) et de réponses (par exemple : mortalité, inhibition de croissance ou de locomotion, biomarqueurs) (Giesy et Hoke 1989, Pedersen *et al.* 1998, Usero *et al.* 2008, Narracci *et al.* 2009, Mamindy-Pajany *et al.* 2011). Mais, comme souligné par Burton Jr. 1991, un critère non-scientifique est lié à l'aspect des ressources (temps, expertise et coût) nécessaires à la mise en œuvre d'une batterie.

3.5 L'évaluation de la qualité des sédiments

Le concept de triade a été développé initialement par Long et Chapman 1985. Il s'agit d'une batterie de mesures combinant à l'origine analyses chimiques, tests d'écotoxicité (réalisées en laboratoire) et observations du benthos. Toutes ces mesures constituent des lignes de preuve³ et sont ensuite intégrés dans un système de classement pondéré appelé poids de l'évidence⁴ dont les classes correspondent à de futures options de gestion (Chapman *et al.* 2002).

Actuellement Chapman et Anderson 2005 recommandent une approche flexible, reposant sur un système de 3 classes pour chaque LOE et une matrice de décision combinant les différentes LOE (Babut *et al.* 2011). La triade peut se concevoir comme une auberge espagnole puisque (Chapman et Hollert 2006) proposent les termes de tétrade, pentade, hexade pour y ajouter d'autres mesures (bioaccumulation, bioamplification, génotoxicité, etc).

En France, des méthodologies adaptées pour l'évaluation de l'écotoxicité des sédiments ont été impulsées principalement par les Agences de l'Eau et des institutions de recherche comme le CEMAGREF⁵ ou l'IFREMER. Babut *et al.* (2002) ont proposé une démarche d'évaluation des risques des sédiments. Cette procédure comporte une première étape d'évaluation sommaire des risques à partir des analyses physico-chimiques, il concerne à calculer une indice moyenne de contamination (QPEC_m ou coefficient moyen d'effet probable) en se basant sur les normes de qualité compilées et adaptées par MacDonald *et*

³ traduction du terme anglais *line of evidence* (LOE)

⁴ traduction du terme anglais *weight of evidence* (WOE)

⁵ IRSTEA depuis le 28/11/2011

al. 2000. En fonction de cet indice, on peut décider de réaliser ou non une deuxième étape d'évaluation détaillée. En effet, une valeur de $QPEC_m$ inférieure à 0,1 autorise la poursuite du projet de mise en dépôt des sédiments sans autre étude, une valeur comprise entre 0,1 et 0,5 nécessite la mise en place d'essais d'écotoxicité directement sur la matrice, et, enfin, pour une valeur supérieure à 0,5, une étude détaillée des risques écotoxicologiques est nécessaire. Depuis lors, Babut *et al.* (2011) ont publié une synthèse des stratégies graduées d'évaluation des risques environnementaux induits par les sédiments fluviaux en mettant l'accent sur la caractérisation des risques et des incertitudes associées.

Le consortium de laboratoires du programme DIESE auquel nous avons participé au cours de ce travail permet de telles approches multiples puisqu'il a réuni des mesures de i) bioaccumulation ii) biodisponibilité (xx), iii) écotoxicité réalisés au laboratoire (Burga-Pérez *et al.* 2012), iv) d'écologie structurelle et fonctionnelle (Colas 2012) en complément des mesures de la caractérisation chimique.

4. Démarche mise en œuvre

Parmi les différents microbiotests dits en phase solide décrits dans la littérature, nous avons choisi d'utiliser dans le cadre de cette étude (cf. tableau 1) : le test Microtox en phase solide (Doe *et al.* 2005), le test algue en phase solide (Blaise et Ménard 1988), le test Luminotox en phase solide (Dellamatrice *et al.* 2006) et l'Ostracodtoxkit® (Chial et Persoone, 2002). Contrairement aux macrobiotests où les sédiments sont généralement testés sans dilution (i.e. à 100%), les microbiotests choisis présentent l'avantage de pouvoir tester des dilutions du sédiment, car celui-ci peut-être dilué dans une matrice liquide propre à chaque microbiotest.

Tableau 1: Microbiotests sélectionnés dans le cadre de la thèse

Microbiotests	Organismes Espèces	Critères d'effets	Références bibliographiques
Microtox® en phase solide	Bactérie <i>Aliivibrio fischeri</i>	Inhibition de la bioluminescence	Doe <i>et al.</i> (2005)
Test algue en phase solide	Algue <i>Pseudokirchneriella subcapitata</i>	Inhibition de l'activité estérasique	Blaise et Ménard (1998)
Luminotox en phase solide	Plante (thylakoïdes) <i>Spinacia oleracea</i> (épinard)	Inhibition de l'efficacité photosynthétique	Dellamatrice <i>et al.</i> (2006)
Ostracodtoxkit®	Crustacé <i>Heterocypris incongruens</i>	Mortalité et inhibition de la croissance	Chial et Persoone (2002)

Vingt et un sédiments couvrant une gamme la plus large possible de granulométrie, de quantité de matière organique et de contamination ont été testés à l'aide des microbiotests sélectionnés. L'objectif général de ce travail de thèse est la validation méthodologique des tests en phase solide pour pouvoir ensuite les appliquer à n'importe quel sédiment. Nous nous sommes attachés i) à mettre en évidence et si possible quantifier les biais potentiels ou déjà signalés dans la littérature et ii) à optimiser les tests existant par exemple en élaborant des variantes de ces mêmes tests.

5. Organisation du manuscrit de thèse

Ce manuscrit est organisé en 7 chapitres.

Le **Chapitre 1** présente la localisation des 21 sites de prélèvement des échantillons des sédiments dans la cadre de notre étude, les résultats des analyses physico-chimiques et leur classification par rapport au contaminants mesurés (MacDonald *et al.* 2000).

Le **Chapitre 2** concerne la réévaluation du test Microtox® en phase solide (MSPA) en ce qui concerne surtout les aspects liés au biais occasionné par les particules fines des sédiments. Le biais a été identifié et quantifié sur sept sédiments à partir d'une méthodologie développée et optimisée en cytométrie en flux. Finalement, l'évaluation écotoxicologique des sédiments a été conduite avec 21 sédiments.

Le **Chapitre 3** est consacré à l'utilisation du test LuminoTox (LSPA) à partir de l'utilisation des membranes de thylakoïdes isolés de plantes d'épinard. Nous avons aussi mis en évidence le biais potentiel lié aux particules fines des sédiments à partir de l'application d'une variante de ce test. La deuxième étape de ce chapitre correspond à l'évaluation écotoxicologique des 21 sédiments et l'analyse du pouvoir discriminant du test pour identifier des sédiments peu, moyennement ou très fortement contaminés.

Le chapitre 4 est dédié au test algue en phase solide développé par Blaise et Ménard (1998), ainsi qu'à une variante de celui-ci basée en l'inhibition de croissance des algues. Nous présentons dans ce chapitre les résultats des 21 sédiments testés avec les deux méthodes, et leur pouvoir discriminant pour identifier des sédiments peu, moyennement ou très fortement contaminés.

Le **chapitre 5** concerne l'utilisation de l'ostracode *Heterocypris incongruens* pour évaluer l'écotoxicité des sédiments naturels. Nous présentons les résultats obtenus avec les 21 sédiments étudiés et avec deux méthodes : i) le test classique (celui proposé par Chial et Persoone 2002) et ii) une méthodologie modifiée proposée en changeant certains éléments du test classique. Nous y présentons la comparaison de l'efficacité de deux versions du test, et le critère d'effet le mieux adapté pour évaluer l'écotoxicité des sédiments.

Le **chapitre 6** montre l'intégration des réponses de trois microbiotests sélectionnés (déjà présenté dans les chapitres précédents) et 17 sédiments à partir de l'utilisation d'un indice dénommé « IBR » (Integrated biotest responses) regroupant les mesures réalisées avec 3 des microbiotests sélectionnés sur les 21 sédiments.

Le chapitre 7 est finalement consacré à une synthèse, discussion et conclusion générale de tous les résultats de notre travail de recherche.

Chapitre 1 : Sédiments évalués dans le cadre de la thèse

1.1 Sites d'étude

Nous avons étudié 21 sédiments naturels prélevés sur différents sites : 20 en France et 1 en Suisse (figure 3), plus 1 sédiment de référence. Parmi ceux-ci, 17 ont été prélevés au cours de 3 campagnes successives et ont fait l'objet d'une étude en commun avec la tâche 4 (batterie de macrobiotests) et certaines de leurs caractéristiques générales sont rassemblées dans le Tableau 2. Les 4 autres sédiments ont été prélevés dans le Jura (Tableau 2), et ont fait l'objet d'une étude en commun avec Colas (2012). Enfin, un sédiment de référence contaminé (SUD-1) a été utilisé de façon très épisodique dans le cadre du test ASPA (cf. Annexe 8).

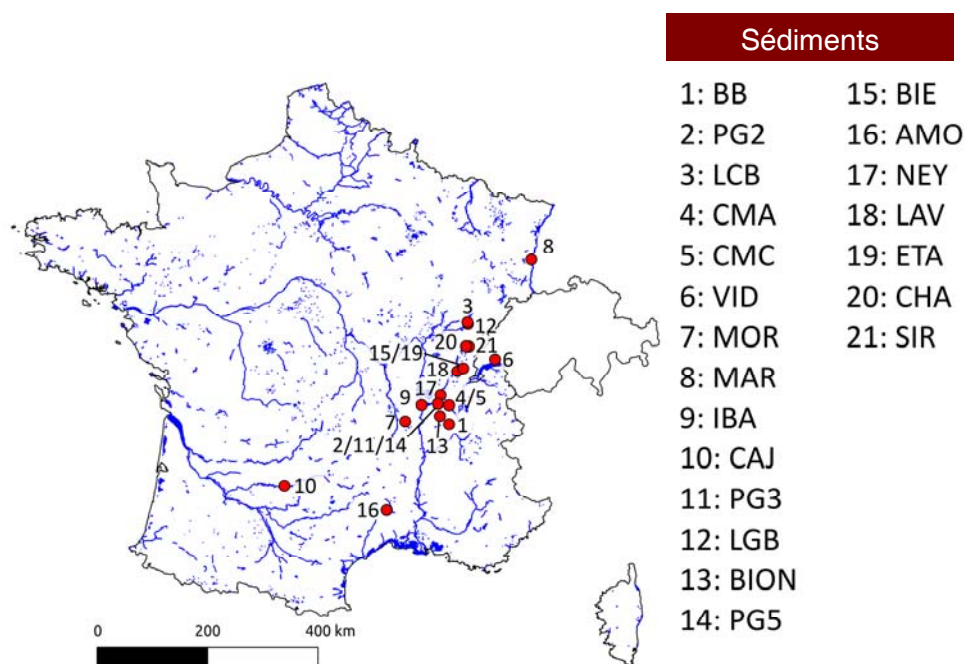


Figure 3: Localisation des sites de prélèvement

Tous les sédiments du Tableau 2 (i.e. 1^{ère}, 2^{ème} et 3^{ème} campagnes) ont été prélevés par l'IRSTEA de Lyon. Ceux de la 1^{ère} campagne ont été prélevés entre le 2 et le 6 février 2009 sur différents sites du bassin du Rhône. Ceux de la 2^{ème} campagne ont été prélevés entre le 28 avril et le 11 mai 2010, hormis le sédiment N°11 (PG3) qui a été prélevé le 8 octobre

2009. Quant aux sédiments de la 3^{ème} campagne, ils ont été prélevés entre le 14 et le 21 septembre 2010.

Tableau 2: Localisation et codage des 21 sédiments testés dans le cadre de la thèse

Sédiments	Code	Commune et/ou Lieu-dit, Département	Rivière, fleuve ou milieu concerné	Coordonnées		N°
				X_L93	y_L93	
Sédiments de la 1 ^{ère} campagne	BB	Blandin (38)	Bourbre	891695	6488170	1
	PG2	Port Galland (01)	Ain	871522	6525630	2
	LCB	Chenecey Buillon (25)	Loue	925005	6674290	3
	CMA	Creys Malville (38)	Rhône	891744	6522740	4
	CMC			891744	6522740	5
Sédiments de la 2 ^{ème} campagne	VID	Baie de Vidy, Lausanne (Suisse)	Lac léman	974981	6607450	6
	MOR	Morancé (69)	Azergues	834208	6532896	7
	MAR	Markolsheim (67)	Rhin	1040750	6788250	8
	IBA	Ile Barbe (69)	Saône	841888	6523230	9
	CAJ	Cajarc (46)	Lot	607663	6376314	10
	PG3	Port Galland (01)	Ain	871522	6525630	11
Sédiments de la 3 ^{ème} campagne	LGB	Pirajoux, La Grange Bouquet (01)	Loue	925867	6674290	12
	BION	Bourgoin-Jailleux (38)	Bion	875151	6502970	13
	PG5	Port Galland (01)	Ain	871522	6525630	14
	BIE	St Claude (39)	Bienne	917120	6590740	15
	AMO	Anduze (30)	Amous	778523	6360670	16
	NEY	Saint-Maurice-de-Rémens (01)	Neyrieux	875292	6540910	17
Sédiments du Jura	LAV	Lavancia Epercy (39)	Bienne	906569	6585334	18
	ETA	Saint-Claude (39)	Bienne	917435	6590770	19
	CHA	Champagnole (39)	Ain	922321	6630834	20
	SIR	Sirod (39)	Ain	927599	6630471	21

1.2 Matériel et méthodes

1.2.1 Prélèvement des sédiments

Chaque prélèvement de sédiment a été passé sur un tamis de maille 2mm pour éliminer les plus gros éléments (pierres, feuilles). Ces sédiments ont été placés dans des flacons en polyéthylène de 2 litres, ramenés à Metz dans des glacières réfrigérées et stockés à 4°C (ou congelés à -20°C). Les échantillons stockés à 4°C ont été analysés dans un délai de 2

semaines suivant leur réception. Les échantillons stockés à -20°C ont été analysés dans un délai pouvant aller jusqu'à 18 mois.

Les sédiments du Jura ont été prélevés par le LIEBE lors d'une campagne de prélèvements qui s'est déroulée en mai 2009 au sein de différentes retenues dites au fil de l'eau, situées dans le Jura. Les sédiments ont été prélevés à environ 1m50 de la berge. La procédure de prélèvement a été légèrement différente des 3 campagnes précédentes. Dans le cas présent, chaque prélèvement a été passé sur un tamis de maille de 1 cm x 1 cm pour séparer les gros éléments (pierres, feuilles) du sédiment proprement dit. Le matériel prélevé a été homogénéisé dans un récipient, et l'eau excédentaire a été éliminée. Les échantillons ont été transférés dans des flacons de polyéthylène de 2,5L avant d'être stockés à 4°C ou congelés à -20°C . Les échantillons stockés à 4°C ont été analysés dans un délai de 2 semaines suivant leur réception. Les échantillons stockés à -20°C ont été analysés dans un délai pouvant aller jusqu'à 18 mois.

1.2.2 Analyses physico-chimiques des sédiments

Les analyses physico-chimiques des sédiments ont été réalisées sur des aliquotes prélevés après homogénéisation du sédiment dans le bidon. Les analyses concernaient la granulométrie, les sulfures volatiles à l'acide (AVS), le pH et le potentiel d'oxydoréduction (Eh), le taux d'humidité, les carbonates de calcium (CaCO_3), la matière organique (perte au feu et rapport C/N), les métaux, les PCB et HAP.

La granulométrie a été analysée sur une aliquote de sédiment brut humide, tamisé à 1 mm avant l'analyse, à l'aide d'un Coulter LS-100 (Loizeau *et al.* 1994). Les AVS ont été mesurées sur sédiments humides suivant la méthode développée par Allen *et al.* (1993). Le pH et le Eh ont été réalisés sur une aliquote de sédiment humide. La mesure de pH a été réalisée à l'aide d'un pH-mètre Ponselle (PVRT-CE). La mesure de Eh a été réalisée avec une électrode Pt-Ag/AgCl (Ponselle, PVRT-CE). Les sondes étaient positionnées à une profondeur de 5 cm dans le sédiment et la mesure a été effectuée en triplicat après 10

minutes d'équilibration. Les résultats Eh étaient ajustés à l'aide d'une électrode hydrogène standard (SHE).

Pour le taux d'humidité, 100g de chaque sédiment ont été mis à sécher à l'étuve pendant 48 heures à 50°C. Le sédiment ainsi séché a ensuite été finement broyé par un broyeur à agate en vue des dosages de carbonates, de matière organique par perte au feu, d'azote et de carbone organique. La qualité de la MO contenue dans le sédiment a été mesurée par dosage du contenu en azote (N) et en carbone (C), qui permet de calculer un rapport C/N. Ces dosages ont été réalisés par chromatographie gazeuse.

Le dosage des métaux (As, Cd, Co, Cr, Cu, Fe, Hg Mn, Ni, Pb et Zn) a été réalisé par ICP-MS (Thermo X7 série II) selon la méthode standardisée (ISO, 2005) sur sédiments secs, broyés et minéralisés à l'eau régale (HCl/HNO₃-3/1) au four micro-ondes (MARS-5, CEM). Pour le mercure, celui-ci a été analysé directement sur le sédiment sec et broyé par un analyseur Hg automatisé (AMA-254) en suivant la procédure du fabricant. La précision des méthodes de mesure est vérifiée en routine avec des matériaux sédimentaires de référence certifiés (IAEA-433, IAEA-158). Les intervalles de confiance autour de ces mesures varient de 8 à 20 % selon l'élément. Le dosage des HAP et des PCB ont été sous-traités au LDA (La Drome Laboratoires). Les dosages ont été réalisés sur une aliquote de sédiment humide, suivant la procédure normalisée XP-X33012 (AFNOR, 2000).

1.2.3 Détermination du risque global des sédiments par rapport au polluants mesurés

Le calcul de l'indice de contamination global a été réalisé à partir des concentrations totales des contaminants mesurés dans les 21 sédiments étudiés et de seuils de qualité PEC (Seuil d'Effet Probable) proposé par MacDonald *et al.* 2000. Les valeurs utilisées pour chaque substance sont présentées dans l'annexe 2. Le quotient PEC moyen (QPECm) est calculé à partir de la formule suivante (Long *et al.* 1998):

$$QPEC_m = \frac{\sum_{i=1}^n \frac{C_i}{PEC_i}}{n}$$

Où :

n représente le nombre de substances considérées,

PEC_i le coefficient d'effet probable de la substance i,

C_i la concentration mesurée dans le sédiment

1.3 Résultats des analyses physico-chimiques et du risque global de contamination

Les résultats des analyses physico-chimiques des sédiments d'étude sont présentés dans les annexes 3, 4, 5 et 6 du présent manuscrit. Le QPEC_m calculé pour chaque sédiment est présenté dans le tableau 3.

Tableau 3: Valeurs de QPEC_m calculé par chaque sédiment testé

Sédiments	Code	Q _{PECm}
Sédiments de la 1ère campagne	BB	0.04
	PG2	0.15
	LCB	0.19
	CMA	0.23
	CMC	0.21
Sédiments de la 2ème campagne	VID	0.72
	MOR	0.53
	MAR	0.23
	IBA	0.27
	CAJ	0.7
	PG3	0.14
Sédiments de la 3ème campagne	LG2	0.22
	BION	0.15
	PG5	0.15
	BIE	0.17
	AMO	2.49
	NEY	0.02
Sédiments du Jura	LAV	0.18
	ETA	0.15
	CHA	0.08
	SIR	0.07

Selon MacDonald *et al.* 2000, les sédiments qui présentent des valeurs de Q_{PECm} inférieures à 0,1 ne seraient pas toxiques, mais par contre les sédiments qui présentent des valeurs supérieures à 0,5 sont susceptibles d'engendrer et présenter des effets écotoxiques dans les milieux aquatiques. A partir de ces seuils de qualité, les sédiments étudiés peuvent être classifiés de la manière suivante :

Tableau 4: Catégorisation des sédiments d'étude en fonction de leur Q_{PECm}

$Q_{PECm} < 0.1$: Pas de risques d'effets écotoxiques	NEY < BB < SIR < CHA
$0.1 > Q_{PECm} < 0.5$: Risques moyens d'effets écotoxiques	PG3 < PG2 < BIO < PG5 < ETA < BIE < LAV < LCB < CMC < LG2 < CMA < MAR < IBA
$Q_{PECm} > 0.5$: Risques élevés d'effets écotoxiques	MOR < CAJ < VID < AMO

Chapitre 2 : Réévaluation du Microtox en phase solide

2.1 Synthèse Bibliographique

2.1.1 Tests d'écotoxicité utilisant la bioluminescence des bactéries

Les essais biologiques utilisant des bactéries sont employés depuis des dizaines d'années pour évaluer l'écotoxicité de matrices complexes (effluents, sédiments,...). Les bactéries sont considérées comme des organismes "sentinelles" en raison de leur capacité à évaluer le niveau de pollution en étroite relation avec l'induction ou la suppression de certaines activités enzymatiques essentielles (Perego *et al.* 2002). De ce fait, dans les années 70 un test a été développé pour évaluer l'écotoxicité des échantillons liquides en utilisant des bactéries bioluminescentes (Doe *et al.* 2005). Parmi les espèces bactériennes les plus utilisées dans les tests d'inhibition de la bioluminescence, se trouvent : *Aliivibrio fischeri*⁶, *Vibrio harveyi* et *Pseudomonas fluorescens* (Parvez *et al.* 2006), *A. fischeri* étant l'espèce la plus utilisée (figure 4).

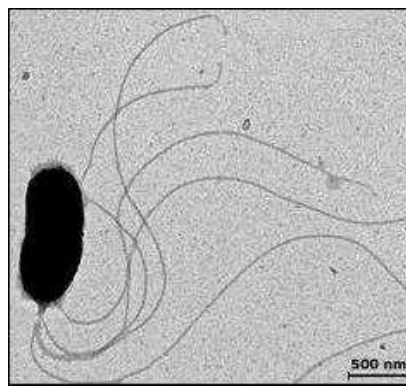


Figure 4: Image de *Aliivibrio fischeri* au microscope électronique

(d'après <http://www.newscientist.com/article/dn20474-squid-go-into-space--for-the-sake-of-humanity.html>)

Cette espèce appartient au groupe des bactéries gram négative, de la famille des *Vibrionaceae*. Elle vit normalement dans l'océan, et produit par luminescence une lumière bleu-vert. Cette luminescence est liée à un ensemble de réactions métaboliques mettant en jeu une enzyme, la luciférase. Cette luciférase est considérée comme une oxydase à fonctions multiples, elle catalyse en même temps l'oxydation d'un aldéhyde à longue chaîne et du

⁶d'abord dénommée *Photobacterium phosphoreum* puis *Vibrio fischeri* avant d'être renommée sous cette dénomination par Urbanczyk *et al.* (2007)

FMNH₂. L'activation est étroitement liée au processus métabolique de la glycolyse et de la respiration cellulaire par les couples de coenzymes NAD-NADH et FMN-FMNH₂ (Férard *et al.* 1983). Une inhibition de l'activité enzymatique provoque une diminution correspondante de la bioluminescence dans la population bactérienne (figure 5)

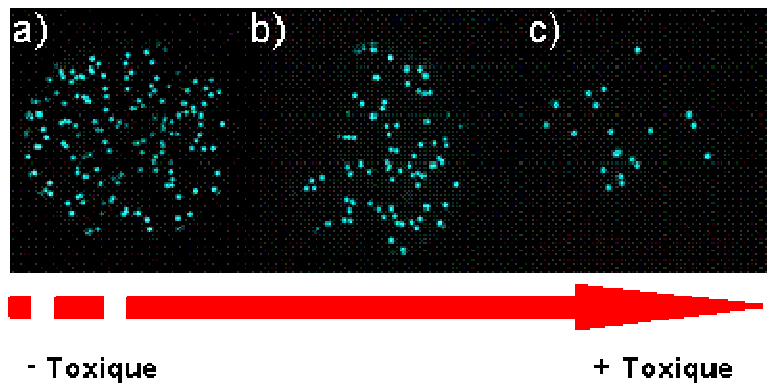


Figure 5: Colonies de *Aliivibrio fischeri* suite à une exposition de 20 minutes au sédiment CMA. a) colonies dans le témoin b) colonies après une exposition à 2.5% de sédiment humide, c) colonies après une exposition à 10% de sédiment humide.

Photos : Philippe Rousselle et Karen Burga.

Pour les tests d'écotoxicité, c'est la souche NRRL B-11177 qui est employée. Le test est commercialisé sous le nom de test Microtox® par la firme Strategic Diagnostics Incorporated (SDI) implantée à Newark (DE, USA) mais d'autres distributeurs proposent aujourd'hui des tests avec cette bactérie: le LUMIStox® commercialisé par Beckmann Instruments (Fullerton, CA, USA) et le ToxAlert® commercialisé par Merck KGaA (Darmstadt, Allemagne) (Farre et Barcelo 2003). Ces derniers sont aussi des tests prêts à l'emploi (ou tests en kit), basés sur des protocoles similaires au Microtox®, et ils donnent des résultats comparables (Jennings *et al.* 2001). Blaise *et al.* (1994) ont miniaturisé le test, en développant une méthode en microplaque (96 puits). La version microplaque du test Microtox® a présenté des résultats comparables aux procédures classiques.

2.1.2 Présentation du test Microtox® en phase liquide (classique)

Le test d'inhibition de la luminescence de la bactérie *A. fischeri* est un test normalisé (AFNOR T 90-320, 1999). Le test évalue l'écotoxicité aiguë d'échantillons naturels et de composés chimiques en se basant sur la réduction de la bioluminescence naturelle de la bactérie en présence de polluants. L'écotoxicité est exprimée par la concentration initiale qui inhibe de 50% (ou de 20%) la production de lumière des bactéries luminescentes (*A. fischeri*) en 5, 15, 30⁷ min (CI₅₀ ou CI₂₀) par rapport à un témoin.

Le test Microtox ® a un spectre d'applicabilité assez large, il a été utilisé pour évaluer l'écotoxicité d'eaux de rivières souterraines (Boyd *et al.* 1997), d'effluents industriels (Vasseur *et al.* 1984, Rigol *et al.* 2004) ou d'effluents municipaux (Cotou *et al.* 2002). Le test a montré une grande sensibilité par rapport à d'autres bioessais et des corrélations significatives ont été trouvées avec des tests utilisant des poissons, des daphnies et des algues (Kaiser 1998). Rojíčková-Padrťová *et al.* (1998) ont comparé la sensibilité de tests d'écotoxicité aiguë utilisant différentes espèces d'algues, de crustacés, de rotifères, de bactéries et de protozoaires. Ils ont trouvé que les tests algues et les essais de bioluminescence bactérienne ont présenté les plus fortes sensibilités pour la plupart des échantillons testés.

Enfin deux synthèses bibliographiques sur le test Microtox® en phase liquide ont été réalisées par Johnson (2005) et Parvez *et al.* (2006). Ces compilations donnent des informations spécifiques sur les protocoles développés, les avantages et inconvénients du test et des comparaisons avec d'autres bioessais.

⁷ voire 60 minutes, durée qui fournit une meilleure répétabilité (Blaise *et al.*, 1994)

2.1.3 Présentation du test Microtox® en phase solide (MSPA)

Pour l'évaluation de l'écotoxicité des matrices solides, le test Microtox® a été employé initialement sur i) des extraits de sédiments contaminés réalisés en utilisant des solvants organiques (Schiewe *et al.* 1985, Kwan et Dutka 1990) et ii) des eaux interstitielles de sédiments (Giesy *et al.* 1988). Brouwer *et al.* (1990) ont développé le test en exposant les bactéries directement aux sédiments contaminés. Le principe du test (de plus amples détails sont fournis dans la partie matériel et méthodes) consiste à exposer *A. fischeri* aux mélanges de sédiment dont la salinité est ajustée en ajoutant du NaCl. Après 20 minutes de contact, des filtres adaptés sont insérés dans les tubes à essai, afin de séparer le sédiment de la phase liquide contenant les bactéries exposées. La bioluminescence est mesurée après 5, 10, 15 et/ou 30 minutes et le pourcentage d'inhibition est déterminé par rapport au témoin, permettant ainsi de calculer une CI₅₀ (ou une CI₂₀).

Le MSPA est devenu l'un des tests les plus populaires pour les évaluations des matrices en phase solide (Van Beelen 2003). Il a été recommandé comme outil de screening pour tester des milieux solides telles que des sols, des boues et des sédiments (Burton Jr. *et al.* 1996, Ringwood *et al.* 1997, Doherty 2001, Doe *et al.* 2005). Des corrélations significatives (corrélation de Spearman) ont été trouvées entre le MSPA et la survie des larves de *Chironomus riparius*, la croissance de *Hyalella azteca* et la production de cocons par *Tubifex tubifex*, en se basant sur l'analyse de 46 échantillons de sédiments (Day *et al.* 1995). Burton Jr. *et al.* (1996) ont testé des échantillons de sédiments provenant des Grands Lacs aux Etats-Unis avec une batterie de 24 organismes et ont trouvé des corrélations de Pearson significatives entre le MSPA et la germination des semences et la croissance de la racine du concombre (*Cucumis sativus*). Dellamatrice *et al.* (2006) ont également trouvé des corrélations significatives entre le MSPA et le test LuminoTox en phase solide à partir des résultats obtenus avec 12 échantillons naturels.

Le MSPA est plus sensible que les tests sur élutriats (Cook et Wells 1996, Dellamatrice *et al.*, 2006). En effet, dans le test en phase solide les bactéries sont en contact direct avec des quantités plus importantes de contaminants, lesquels sont à la fois associés aux

solides et mis en solution dans le milieu salin. Au contraire, dans les tests sur élutriats, les bactéries ne sont en contact qu'avec les contaminants dissous dans la phase aqueuse

Selon Doe *et al.* (2005), le MSPA possède plusieurs avantages par rapport aux tests utilisés plus traditionnellement pour évaluer l'écotoxicité des sédiments contaminés avec des invertébrés tels que les chironomes, les amphipodes, les mollusques, etc :

- la rapidité du test : les tests en phase solide utilisant des bactéries luminescentes peuvent être réalisés en quelques heures au lieu de quelques jours pour d'autres tests,
- le faible volume d'échantillon nécessaire,
- la praticabilité : il n'y a pas besoin de cultures des organismes, les bactéries lyophilisées pouvant être acquises dans le commerce,
- La pertinence : les bactéries représentent un groupe d'organismes qui remplissent de nombreuses fonctions importantes au sein des écosystèmes telles que la biodégradation de la matière organique, le recyclage des nutriments, etc.

2.1.4 Facteurs confondants dans l'application du test

La sensibilité du test peut être affectée, surtout dans l'eau interstitielle des sédiments, par certains composants chimiques souvent présents dans les sédiments naturels tels que l'ammonium (et sa fraction dissoute NH_3). L'ammonium se retrouve dans la plupart des sédiments, provenant souvent de la dégradation naturelle de l'azote organique par les microorganismes. De plus, il peut s'accumuler à des concentrations élevées dans des conditions anaérobies (Ankley *et al.* 1990). Ce composé peut également provenir de sources anthropiques comme, par exemple, des rejets organiques d'origine agricole, domestique ou industrielle. Certains auteurs comme Del Valls *et al.* (1997) et Tay *et al.* (1998) ont indiqué que la bactérie n'est pas très sensible à ce composé chimique, mais Doe *et al.* (2005) recommande de faire, par précaution, des mesures d'azote ammoniacal dans l'eau interstitielle. D'autres composés, comme le soufre élémentaire (Pardos *et al.* 1999) ou le sulfure d'hydrogène (Jacobs *et al.* 1992) sont connus pour être écotoxiques pour *A. fischeri* dans des extraits organiques des sédiments. Brouwer et Murphy (1995) ont

observé des effets écotoxiques en exposant les bactéries à des sédiments dopés avec du H₂S.

Il existe aussi des biais liés aux caractéristiques optiques du filtrat, en raison de sa couleur et/ou de sa turbidité induite par les particules fines qui ne sont pas éliminées par le filtre du fait de leur petite taille (Campisi *et al.* 2005, Doe *et al.* 2005). Volpi-Ghirardini *et al.* (2009) ont également relevé que la sensibilité du test peut varier en fonction du diluant utilisé dans le test. Ils soulignent aussi l'importance du pH et de la conductivité pour expliquer les différences observées en matière d'écotoxicité.

Un autre facteur de confusion important est lié à l'adsorption des bactéries aux sédiments fins pendant l'exposition, conduisant à une perte importante de bactéries dans la phase liquide récupérée après filtration. Différents auteurs ont souligné que cette perte pouvait entraîner une surestimation de la CI50. Par exemple, Benton *et al.* (1995) ont constaté que la toxicité apparente de sédiments artificiels était liée à la taille des particules surtout des particules fines (argiles + limons). Quintino *et al.* (1995) ont également montré l'existence d'une relation négative entre les valeurs de CI50 et la teneur en particules fines. Ringwood *et al.* (1997) ont testé l'hypothèse que les bactéries se fixaient aux particules d'argile et ils ont montré que le nombre de bactéries retrouvées dans le filtrat diminuait selon une relation linéaire (en coordonnées log-log) en fonction de l'augmentation de la teneur en argiles. Ces auteurs ont proposé une relation log-log entre la CI50 et le contenu en argiles et limons. Greene *et al.* (1992) ont proposé d'utiliser des sédiments de référence présentant les mêmes caractéristiques physiques que les sédiments testés pour comparer les deux réponses. De même, l'ASTM (American Society for Testing and Materials) recommande que les sédiments présentant des CI50 > 2500 mg/Kg soient comparés avec des résultats obtenus avec des sédiments moins toxiques mais ayant les mêmes caractéristiques physiques. Toutefois, la sélection de sédiments de référence (i.e. pas ou peu toxiques) possédant des caractéristiques physiques similaires à celles des sédiments testés n'est pas chose facile (Tay *et al.* 1998). Ringwood *et al.* (1997) ont également proposé une démarche quelque peu compliquée pour l'interprétation des résultats à partir des valeurs de CI50 et la génération d'une ligne de référence avec des intervalles de

confiance (95%) en utilisant l'information sur le contenu en limons et argiles des sédiments dans son cas d'étude.

2.2 Objectifs du travail

Le MSPA peut être considéré comme une sorte de « boîte noire », dans laquelle les effets observés prennent en compte :

- les effets des toxiques qui restent adsorbés sur les sédiments et donc révèlent une écotoxicité réelle due au contact avec la phase solide
- les effets des toxiques qui sont susceptibles de se dissoudre dans le diluant (NaCl 2%).
- le biais lié au fait qu'une partie des bactéries luminescentes peut rester adsorbée soit au filtre, soit au sédiment lui-même (suite par exemple à des interactions électrostatiques).

Pour discriminer ces effets, nous avons également développé une alternative au MSPA, le Microtox® appliqué au lixiviat (MLPA). Ce test est effectué exactement dans les mêmes conditions que le MSPA en termes de volume, et de temps d'exposition (20 minutes de contact de bactéries avec les sédiments) et la seule différence entre le MSPA et le MLPA se situe au moment de l'introduction des bactéries dans la solution de sédiments. Dans le MLPA, les bactéries sont ajoutées après l'étape de filtration et non avant comme dans le MSPA. Les figures 6 et 7 présentent les modes opératoires de ces deux types d'essai.

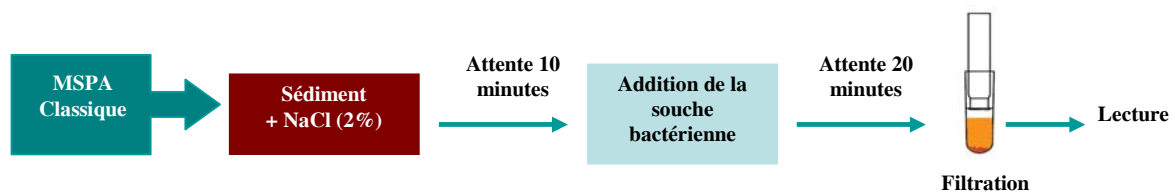


Figure 6: Mode opératoire du test Microtox® en phase solide (MSPA)

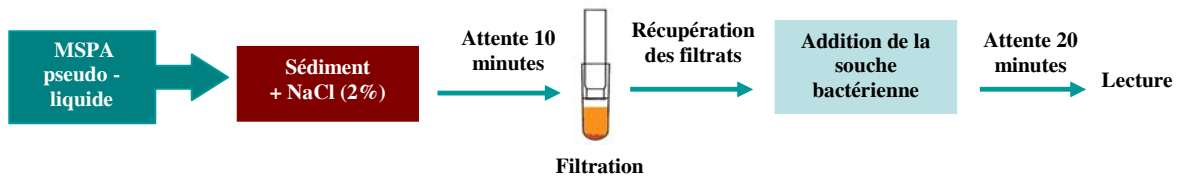


Figure 7: Mode opératoire du test Microtox® appliqué au lixiviat (MLPA)

La plupart des auteurs précédemment mentionnés aux § 2.1.3 et 2.1.4 ont employé des sédiments artificiels pour mettre en évidence le biais occasionné par les particules fines. Ce faisant, ils ont plus extrapolé que quantifié réellement les biais potentiels survenant lors de l'application du test sur des sédiments naturels. Notre travail de recherche s'est donc orienté sur une quantification de la perte bactérienne dans le MSPA en fonction de la quantité de particules fines (argiles et limons), et cela pour différents sédiments naturels dans le but non seulement de mettre en évidence ce biais mais aussi de le corriger. Pour ce faire, nous avons développé une technique en cytométrie de flux pour estimer le pourcentage de bactéries non récupérées dans la phase liquide après filtration (figure 8).

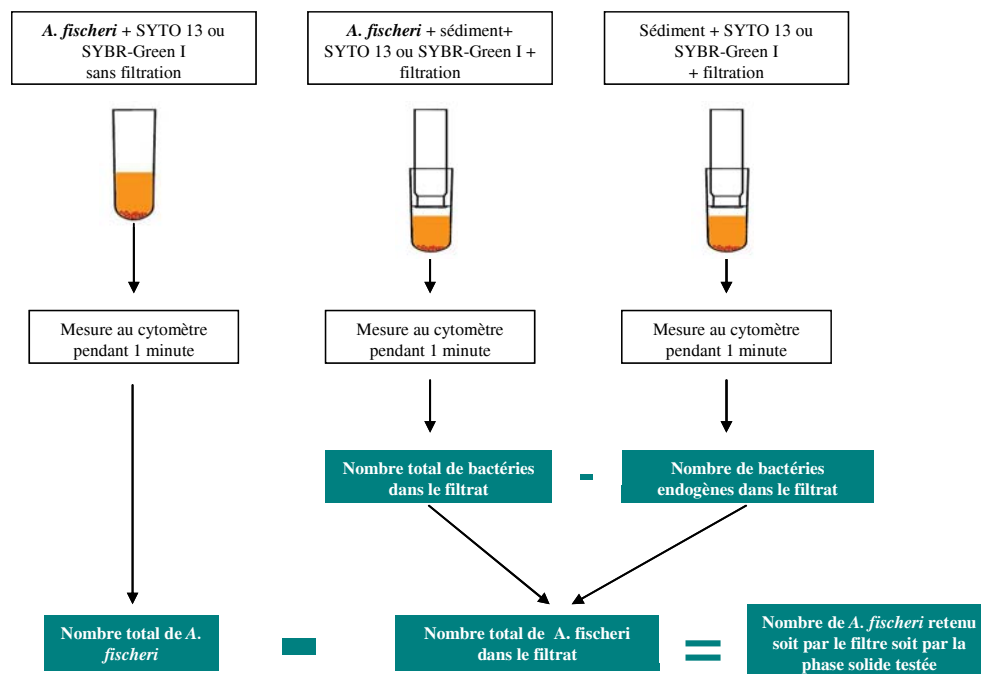


Figure 8: Schéma expérimental utilisé pour estimer le nombre de bactéries luminescentes retenues soit par le filtre soit par la phase solide du sédiment testé.

2.3. Résultats et discussion

2.3.1 Résultats des tests MSPA et MLPA

Outre les résultats présentés dans la publication jointe au § 2.3.2 (Burga-Pérez *et al.* 2012), les résultats du test MSPA et MLPA sont présentés dans le tableau 5 pour 14 autres échantillons.

Tableau 5: Résultats des deux variantes du test Microtox® pour les 21 sédiments testés (CI 50 et intervalles de confiance à 95% calculés par le programme REGTOX).

Sédiments		Code	Microtox (CI ₅₀ g sed sec/L de milieu)					
			MSPA	Intervalle de confiance (95%)			MLPA	Intervalle de confiance (95%)
Sédiments de la 1ère campagne	1	BB2	25,55	19,33	31,89	52,30	47,67	56,59
	2	PG2	3,31	2,72	3,87	7,86	6,54	9,14
	3	LCB	5,00	4,27	5,76	8,02	7,31	8,83
	4	CMA	0,69	0,63	0,74	1,97	1,77	2,17
	5	CMC	2,78	2,62	2,96	4,02	3,80	4,27
Sédiments de la 2ème campagne	6	VID	0,064	0,062	0,066	0,057	0,055	0,059
	7	MOR	0,94	0,90	0,99	1,27	1,19	1,36
	8	MAR	0,74	0,65	0,83	1,09	0,96	1,25
	9	IBA	16,5	13,7	20,5	25,1	18,9	33,8
	10	CAJ	14,2	12,8	15,9	32,4	23,4	46,6
Sédiments de la 3ème campagne	11	PG3	0,34	0,21	0,48	0,65	0,4	0,92
	12	LG2	1,89	1,31	2,51	2,69	2,07	3,66
	13	BIO	7,81	7,03	8,63	10,9	9,6	12,3
	14	PG5	0,85	0,74	0,99	3,44	1,82	6,21
	15	BIE	0,71	0,63	0,81	1,90	1,26	2,81
Sédiments du Jura	16	AMO	2,30	2,14	2,46	3,06	2,67	3,55
	17	NEY	5,19	3,46	6,95	9,04	7,42	11,23
	18	LAV	5,50	3,95	7,10	14,07	13,81	14,36
	19	ETA	3,00	2,25	3,78	5,61	4,83	6,50
	20	CHA	1,97	1,54	2,47	3,46	2,68	4,59
	21	SIR	25,04	20,17	31,75	> 92,18	Pas d'estimation	

Le classement des sédiments du plus écotoxique au moins écotoxique s'établit pour le test MSPA de la façon suivante :

VID(6) > PG3(11) > CMA(4) ≈ BIE (15) ≈ MAR(8) > PG5(14) > MOR(7) > LG2 (12) ≈ CHA(20) > AMO(16) > CMC(5) > ETA(19) > PG2(2) > LCB(3) > NEY(17) > LAV(18) > BIO(13) > CAJ(10) > IBA(9) > SIR(21) ≈ BB2(1)

alors que le classement pour le test MLPA est le suivant :

VID(6) > PG3(11) > MAR(8) > MOR(7) > BIE(15) \approx CMA(4) > LG2 (12) > AMO (16)
> PG5(14) > CHA (20) > CMC (5) > ETA (19) > PG2(2) > LCB (3) > NEY(17) > BIO
(13) > LAV(18) > IBA(9) > CAJ(10) > BB2(1) > SIR(21)

Les classements de sédiments obtenus avec les deux tests sont similaires. En effet, une forte corrélation a été trouvée entre les CI₅₀ obtenues avec les tests MSPA et MLPA (Fig. 9 ; $p < 0,001$, $r^2 = 0,96$).

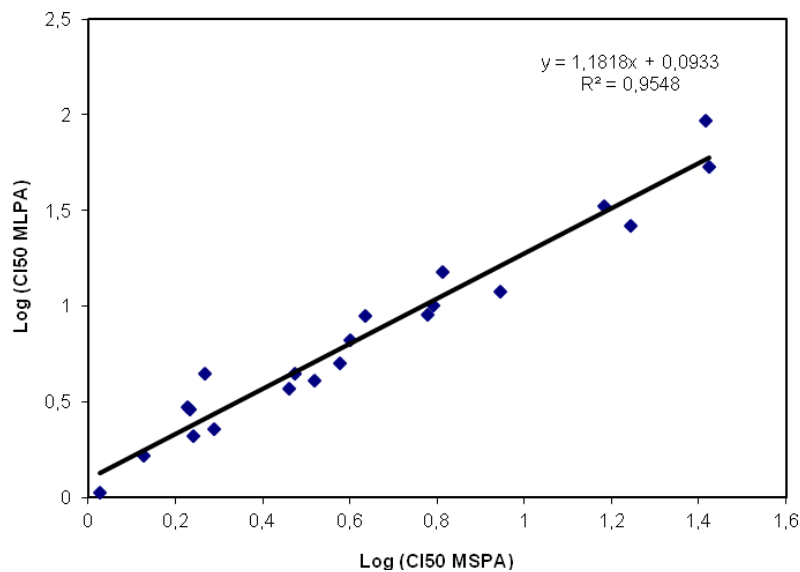


Figure 9: Corrélation entre les CI₅₀ obtenues avec les tests MSPA et MLPA
(pour le sédiment N°21, la valeur de 92,18 a été utilisée par défaut)

Par ailleurs, il apparaît clairement que les CI₅₀ obtenues avec le test MSPA sont toutes inférieures à celles observées avec le test MLPA (sauf pour le sédiment N°6), ce qui paraît logique puisque dans la phase solide les bactéries sont exposées aux particules (potentiellement) écotoxiques du sédiment mais également au milieu dans lequel certains toxiques se sont dissous. Au contraire, dans le test MLPA, les bactéries ne sont exposées qu'aux polluants hydrosolubles provenant du sédiment (Cook et Wells 1996, Kemble *et al.* 2000, Viguri *et al.* 2007)

Deux hypothèses ont été formulées pour expliquer la différence entre les résultats des deux variantes du test Microtox® :

1- la différence est due à une réelle écotoxicité de la phase solide lié à un supplément d'écotoxicité dû au contact direct avec un (des) toxique(s) adsorbé(s) sur les particules sédimentaires (cf. figure 10).

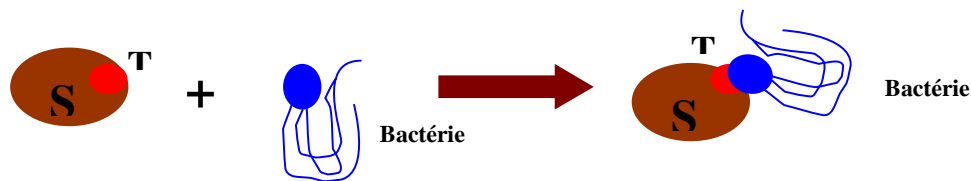


Figure 10: Schéma explicatif du mode d'action des toxiques dans le test MSPA

2- la différence est due à deux biais : le premier est lié à l'adsorption d'une partie des bactéries sur le filtre lui-même, et le second à l'adsorption de bactéries sur les particules sédimentaires. L'adsorption peut-être considérée (en première approximation) comme identique qu'il s'agisse d'un échantillon témoin ou d'un échantillon avec sédiment. En tout état de cause, il n'est donc pas à considérer. Nous avons donc porté nos efforts sur la quantification du second biais pour pouvoir comparer nos résultats à ceux de Ringwood *et al.* (1997). Dans un premier temps, nous avons songé à utiliser la méthode proposée par Brouwer *et al.* (1990) consistant à utiliser des bactéries luminescentes préalablement marquées au ^{14}C pour quantifier la quantité de bactéries restant adsorbée sur les particules sédimentaires. Devant les difficultés rencontrées pour trouver un laboratoire apte à manipuler les radioéléments et le coût de cette méthodologie, nous nous sommes tournés vers un protocole utilisant deux fluorochromes détectables en cytométrie de flux.

2.3.2 Résultats publiés dans le journal Chemosphere

Les résultats que nous présentons concernent l'identification et la quantification du biais associé à l'adsorption des bactéries aux sédiments.

Ces résultats ont été l'objet d'une publication dans le journal Chemosphere en 2012 ([doi:10.1016/j.chemosphere.2011.08.042](https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2011.08.042)) et sont présentés ci-dessous dans une version Word modifiée pour être mieux intégrée au document.

New methodological improvements in the Microtox® Solid Phase Assay

Karen F. Burga Pérez, Rayna Charlatchka, Leila Sahli, Jean-François Férard,

2.3.2.1 Abstract

The classic Microtox® Solid-Phase Assay (MSPA) based on the inhibition of light production of the marine bacteria recently renamed *Aliivibrio fischeri* suffers from various bias and interferences, mainly due to physico-chemical characteristics of the tested solid phase. To precisely assess ecotoxicity of sediments, we have developed an alternative method, named Microtox® Leachate Phase Assay (MLPA), in order to measure the action of dissolved pollutants in the aqueous phase. Two hypotheses were formulated to explain the observed difference between MSPA and MLPA results: a real ecotoxicity of the solid phase or the fixation of bacteria to fine particles and/or organic matter. To estimate the latter, flow cytometry analyses were performed with two fluorochromes (known for their ability to stain bacterial DNA), allowing correction of MSPA measurements and generation of new (corrected) IC50. Comparison of results of MLPA with the new IC50 MSPA allows differentiating real ecotoxic and fixation effect in classic MSPA especially for samples with high amount of fines and/or organic matter.

2.3.2.2 Introduction

The Microtox® Solid-Phase Assay (MSPA) initially developed by Brouwer *et al.*, (1990) is one of the most popular tests for solid phase assessments (Beelen 2003). The Microtox® test was performed initially with liquid samples, as it is based on the inhibition of light production of the marine bacterium recently renamed *Aliivibrio fischeri* (Urbanczyk *et al.*, 2007). The MSPA has been recommended as a screening tool to test solid media like soils, sludges and sediments (Burton *et al.*, 1996; Ringwood *et al.*, 1999; Doherty *et al.*, 2001; Doe *et al.*, 2005). It has been reported that the test responses showed Pearson correlation with responses of the seed germination-root elongation in *Cucumis sativus* (Burton *et al.*, 1996). Dellematrice *et al.*, (1996) found also a relationship between MSPA and Luminotox solid phase assay results.

It has been demonstrated that the test is easy, rapid and reproducible (Stronkhorst *et al.*, 2004). The test protocol has been thoroughly detailed by Doe *et al.* (2005). Briefly, bacteria are exposed to serial dilutions of sediments, and after 20 minutes of contact, disposable filters are inserted into the test tubes in order to separate the liquid phase containing the bacteria from the sediment. Light output is then measured after 5, 10, 15 or 30 minutes with the bacteria contained in the liquid phase.

It has been reported that test sensitivity can be affected by some chemicals often present in sediments such as ammonium (Ankley *et al.*, 1990), elemental sulphur (Pardos *et al.*, 1999) or hydrogen sulphide (Jacobs *et al.*, 1992). As reported by Doe *et al.*, (2005), interferences can also occur by optical factors linked to the filtrate, due to colour (light absorption) and/or turbidity (light scatter) coming from the fines particles not removed by filtration. Also, Campisi *et al.* (1995) have reported that there were a poor correlation ($r^2= 0.13$) between organic matter (OM) and initial light loss measured in the modified Basic Solid Phase Test that they proposed. A better linear correlation ($r^2=0.41$, $p < 0.05$) was reached between initial light loss and the calculated amount of OM in the cuvette. But, with the traditional MSPA, Guerra *et al.* (2007) did not find correlation between responses in MSPA and organic matter. Volpi Ghirardini *et al.*, (2009) have also listed as confounding factors pH variations linked to sample dilutions. Another important

confounding factor is related to the fixation of bacteria to fine-grained sediments during the exposure time, leading to a significant loss of bacteria in the recovered liquid phase. Different authors have pointed out IC50 value overestimations. For example Benton et al., (1995) found that apparent artificial sediment toxicity was related to particle size, especially fine particles (i.e. clay + silt). Quintino et al., (1995) also showed a negative relationship between IC50 values and percentage of fines content. Ringwood et al., (1997) tested the hypothesis that bacteria are fixed by clay particles and they showed that light output decreased in a predictable manner as clay content increases and proposed a log-log relationship between IC50 and clay (+silt) content. All these authors used artificial sediments, and this paper thus seeks to review the relationship between MSPA IC50 and fines (clay+silt) by quantifying the percentage of bacteria not recovered in the liquid phase for each concentration of sediment tested using flow cytometric techniques.

To discriminate between leachate and bulk effects, we have also developed an alternative to the MSPA, that is a Microtox® Leachate Phase Assay (MLPA) carried out exactly in the same conditions as the MSPA in terms of volume, processing time (20 minutes of contact of bacteria with sediments), except for the time of introduction of bacteria into the sediment solution, which are added after filtration of the sediment dilution and not before like in the MSPA (for details see Materials and Methods).

2.3.2.3 Materials and Methods

Natural sediments

Sediments were collected from different sites in France. They were selected on the basis of their putative ecotoxicity and their different quantities of fines. Dry weights were determined on three replicates after 3 days at 60°C. The grain-size distribution was measured on wet sediment with a Coulter LS-100, which can measure in a range of measurement between 0.4 and 900 µm (Loizeau *et al.*, 1994).

Microtox® assays

a) The Microtox® solid phase assay (MSPA) was performed according to Doe *et al.*, (2005) with slight modifications (see below) (figure 11). All materials and reagents were purchased from R-Biopharm (Lyon, France). In this test, luminescent bacteria were regenerated with one mL of reconstitution solution and placed in the reagent well of the Microtox® analyzer for at least one hour. During this time, sediment dilutions were prepared in triplicates. Seven g of wet sediment were taken from the sample and diluted with 35 ml 2% sodium chloride (NaCl), the solution was mixed on a magnetic stirrer for 10 minutes. From this solution, 1:2 dilutions were prepared in borosilicate tubes in which 1.5 mL of 2% NaCl was previously placed. Bacteria (approx. 1×10^6 cell/mL per assay) were exposed to control (1.5 mL of 2% NaCl) and each dilution of sediment for 20 minutes, and, at end of exposure, a column filter of polyethylene was pushed in and 0.5 ml of supernatant containing exposed bacteria was pipetted and transferred to a new borosilicate tube. According to the supplier, the filter has a diameter of 6 mm and a thickness of 4 mm, and the pore size ranges from 15 to 45 μm . Finally, light output was measured after 5 minutes with a Microtox® Analyzer 500.

b) The Microtox® leachate phase assay (MLPA) is a MSPA modified assay, where the only difference concerns the fact that *A. fischeri* is exposed after filtration of sediment dilutions, and not before (Figure 11). Afterwards, it becomes a lixiviate Microtox® assay conducted in the same conditions as the MSPA assay. This new assay allows to differentiate the action of contaminants that passed through the column filter (i.e. those which are dissolved in the aqueous phase and also those attached to fines that are recovered in the filtrate) from those that do not pass through the filter. The same kinds of supplies of MSPA (tubes, filters and reagents) were used in this test. The control was prepared by 2% NaCl filtered with the MSPA column filter. Bacteria were exposed to each filtrate during 20 minutes after filtration of the sediment dilutions, then 0.5 mL of filtrate which contains exposed bacteria were pipetted and light output was measured after 5 minutes (with a Microtox® Analyzer 500). It is important to note that for each MSPA and MLPA IC50 determinations, the same concentrations of sediment were tested,

using the same regenerated bacterial reagent. So, results of both tests are directly comparable.

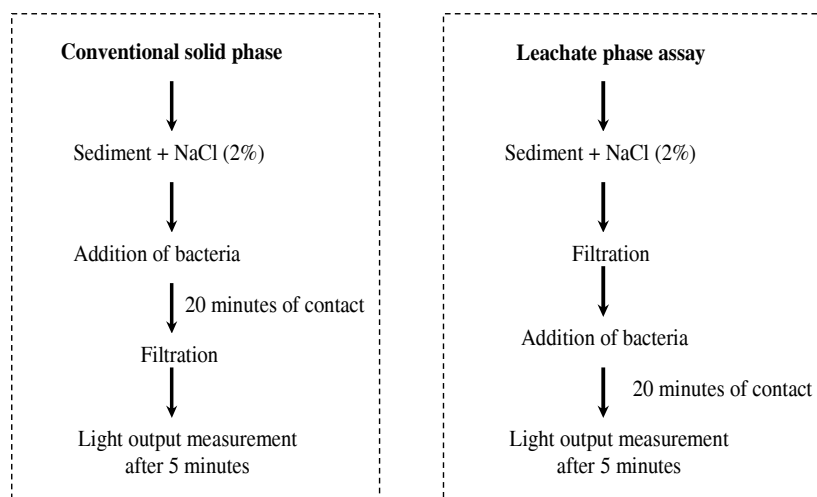


Figure 11: Microtox® solid phase assay and Microtox® leachate phase assay protocols

Flow cytometry analysis

DNA of bacteria was stained with Syto 13 (Invitrogen S7575) and Sybr-Green I (Invitrogen S7563) dyes. Both were used to quantify the percentage of bacteria retained by the sediment and the filter. For each determination, we carried out two different assays (in triplicates) : one with sediment and bacteria and another with sediment but without bacteria to take into account the endogenous bacterial DNA quantity. We also carried out one control (also in triplicate) without filtration. For each assay or control, 1.5 mL of samples were stained at a final concentration of 5 μ M Syto 13 and 10 μ L per mL of sample from a 10⁻² dilution of the Sybr-Green I commercial solution in distilled water. They were incubated with experimental media for 15 minutes at room temperature in the dark (Marie *et al.*, 1997; Troussellier *et al.*, 1999; Gazol and Del Giorgio, 2000).

Samples were analysed using a FacsCalibur flow cytometer (Becton Dickinson) equipped with an air cooled argon laser (488 nm, 15mW). Stained bacterial cells were discriminated and enumerated according to their right angle light scatter (SSC, related to cell size) and

green fluorescence (FL1) emission measured at 530 ± 30 nm. Both parameters were collected at logarithmic scale. Controls were first analysed to delimitate the R1 zone where bacteria were detected in order to exclude background noise (figure 12A). Calculation of the percentages of bacteria retained by each sediment concentration and the filter were made by subtraction from the sediment and bacterial assay count (figure 12B), the bacterial count generated by the endogenous bacteria (figure 12C).

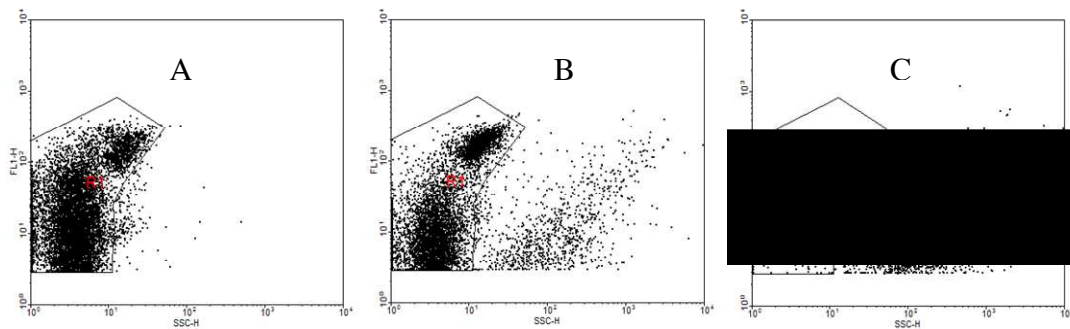


Figure 12: Detection of *A.fischeri* from flow cytometry analyses. dot plots FL1 vs. SSC showing from the left to the right

A) Control test (*Aliivibrio fischeri* in the zone named R1), B) Bacteria with 1.25% of sediment LCB2, C) 1.25% of sediment LCB2 where endogenous bacteria were found.

Data analysis

Five minute IC50s and their 95% confidence intervals were calculated with the REGTOX EV7.0 package (http://www.normalesup.org/~vindimian/fr_index.html) and expressed in g of dry weight sediment per liter (g.L⁻¹). Differences in sensitivity between both tests were judged according to overlapping of 95% confidence intervals. Statistically significant differences between two fluorochromes were tested with the Student t-test.

2.3.2.4 Results and Discussion

Microtox® solid phase assay (MSPA) and Microtox® leachate phase assay (MLPA)

These companion tests are representative of direct and indirect tests, respectively (Pandard *et al.*, 2006). Nevertheless, the first (MSPA) is not a true direct test because bacteria are in contact with a solid phase (i.e. sediment particles) but also with a liquid phase (i.e. saline medium that is an inherent component of the Microtox® test). Thus in MSPA, bacteria are impacted by contaminants either fixed on particles or dissolved in the saline medium. The second (MLPA) is a leachate test where bacteria are mainly exposed to contaminants dissolved in the saline medium. Nevertheless bacteria could also be exposed to fines that could have passed through the filter.

Results of the seven sediments tested with both assays are presented in figure 13. They were ranked according to their IC50 values for the MSPA (series 1) and the MLPA (series 2). There is a monotonous relationship between these two sets of data ($p < 0.01$, Spearman's rank correlation coefficient test). The IC50s of series 1 are all significantly lower ($p < 0.05$) than those of series 2 (figure 3). This result was expected because MSPA and MLPA could be regarded as solid + liquid assay and liquid assay (at a glance), respectively.

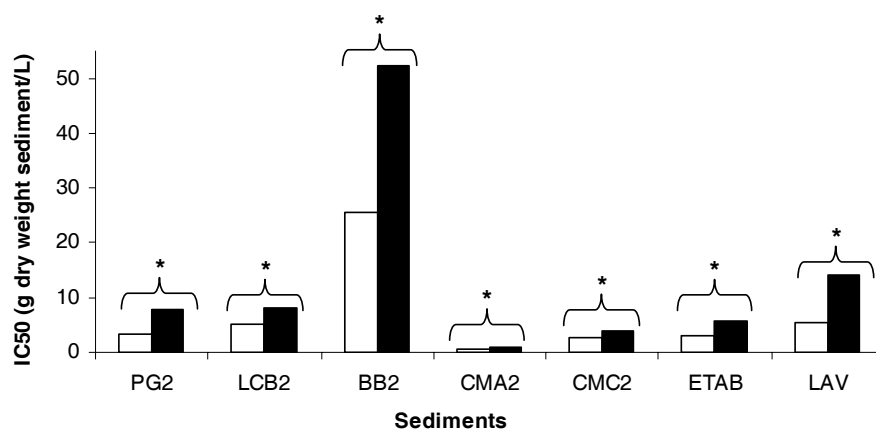


Figure 13: IC50s related to solid phase (white bars) and leachate phase (dark bars) assays for all samples

(* indicates no overlapping of 95% confidence intervals).

To explain the differences between MSPA and MLPA IC50 values, two hypotheses were formulated:

- a) The differences are linked to a real ecotoxicity of the solid phase: this means that decrease of luminescence comes from the direct contact of bacteria with contaminants fixed on sediment particles.
- b) The differences are linked to fixation of bacteria to fines particles and/or organic matter and it can be explained by a quantification of no-recovered bacteria in the filtrates (see below).

Flow cytometric analyses

In a first experiment, we quantified the percentage of bacterial loss after filtration with fluorochromes Syto 13 and Sybr-Green I on two sediments (Figures 14a and 14b). Both fluorochromes showed an increase of bacterial loss as a function of sediment concentrations surrounding the IC50s. The bacterial loss was estimated to be between 26.1 and 89.8 % according to the tested sediment concentration. Comparison of the percentages of loss evaluated with both fluorochromes for each sediment concentration showed significant differences in four cases on eight tested sediment concentrations. In the four other cases, the percentages of bacterial loss evaluated with Sybr-Green I were slightly greater than those evaluated with Syto 13. Since either fluorochrome can be used for quantification of bacterial loss, we then decided to use Sybr Green I to test five other natural sediments and to use it for correction of bioluminescence measurements.

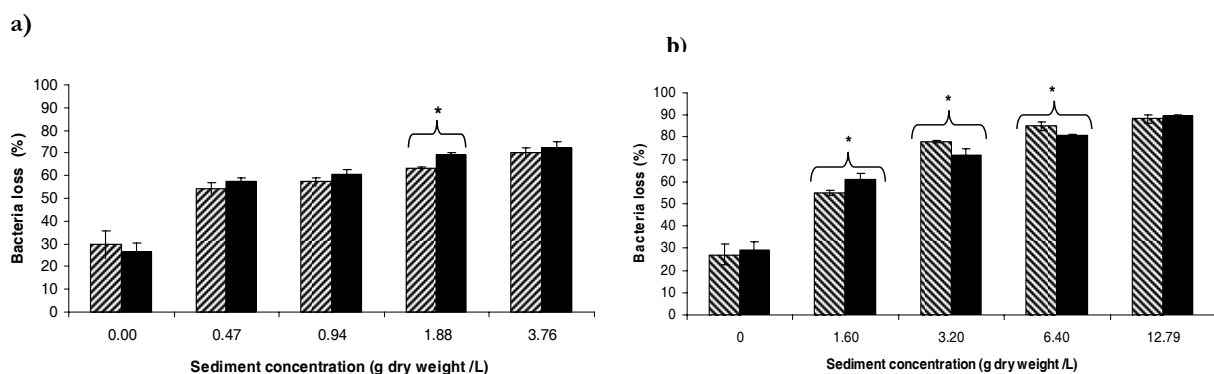


Figure 14: Percentages of bacterial loss for each sediment concentration tested with Syto 13 (stripped bars) and Sybr-Green I (filled bars) a) sediment CMA, b) Sediment PG2

* Significant differences at $p < 0.01$, test t-student

Correction of IC50 values with Sybr-Green I measurements

There is a log-log significant relationship between the percentages of bacterial loss and the percentages of fines ($r^2 = 0.82$, $p = 2 \times 10^{-13}$) present in the different sediment concentration (figure 15).

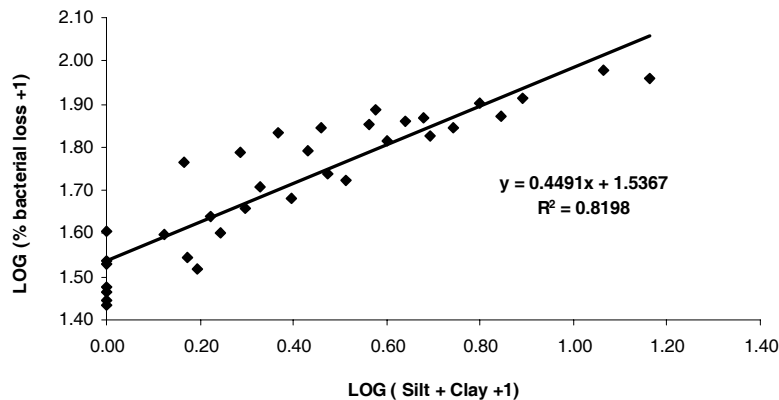


Figure 15: Plot of percentages of bacterial loss in relation to percentages of silt +clay for each tested sediment concentration

This relationship therefore allows us to use the regression parameters to calculate adjusted bacterial loss for each percentage of fines present in the tubes, so as to adjust bioluminescence measurements according to the following formula:

$$\text{Corrected bioluminescence} = \text{Measured bioluminescence} (1 + \text{bacterial loss (in \%)})$$

Table 6 shows the new (corrected) IC50s recalculated from corrected bioluminescence. For five sediments (PG2, LCB, BB2, CMC, ETA) the new MSPA IC50s were not different from their respective MLPA IC50s. It can be then concluded that the first (non adjusted) IC50s were overestimated due to bacterial adsorption onto fines. For two sediments (CMA and LAV) new (adjusted) IC50s were different from their respective MLPA IC50s and it can be concluded that there is a real toxic effect due to contact of bacteria with sediment particles.

**Tableau 6: MSPA, MLPA and new MSPA IC50s
(Recalculated from loss of bacteria for each sediment)**

Station	MSPA			MLPA			New MSPA		
	IC 50% (g dry weight /L)	Confidence intervals 95%		IC 50% (g dry weight /L)	Confidence intervals 95%		IC 50% (g dry weight /L)	Confidence intervals 95%	
PG2	3.30	2.81	3.97	7.83	6.52	9.19	9.60	7.50	12.00
LCB	5.00	4.27	5.76	8.02	7.31	8.83	6.70	5.29	8.26
BB2	25.55	19.33	31.89	52.30	47.67	56.59	48.74	37.00	71.50
CMA	0.69	0.63	0.74	1.01	0.96	1.06	0.88	0.81	0.95
CMC	2.78	2.62	2.96	4.02	3.80	4.27	3.70	3.50	4.00
ETA	3.00	2.25	3.78	5.61	4.83	6.50	3.46	2.50	5.88
LAV	5.50	3.95	7.10	14.07	13.81	14.36	11.30	10.20	12.70

This study supports the results obtained by Benton *et al.* (1995), Ringwood *et al.* (1997) and Quintino *et al.* (1995) who demonstrated that bacterial loss is directly related to the percentage of fines (i.e. clay + silt) in sediments. Bacteria often tend to adhere to insoluble particles, usually via specific components located on the bacterial surface (Costerton *et al.*, 1985) or via elevated production of extracellular polymeric substances (Ivanova *et al.*, 2008). For example, *Bacillus subtilis* may be adsorbed by humic substances (Maurice *et al.*, 2004).

Here also we checked that bacteria remaining fixed by sediment particles were not recovered after filtration causing a decrease in the bioluminescence signal and then an overestimation of IC50s. In our study the IC50 was significantly related with grain size of sediments and a different relationship was found from that reported by Ringwood *et al.* (1997) in their pilot study (Figure 16)

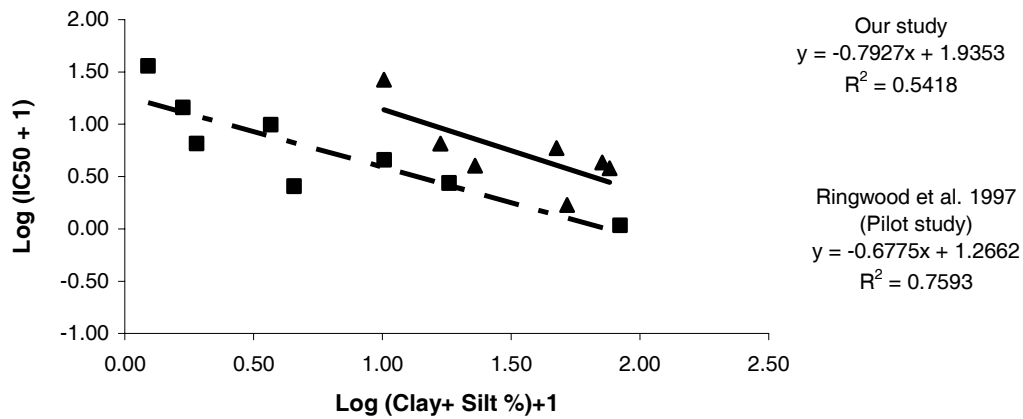


Figure 16: Plot of IC50 values in MSPA (dark triangles) and the Ringwood et al (1997) study (dark squares) in relation to percentage of silt +clay for each sediment tested

This difference could be due to the fact that Ringwood *et al.* (1997) used sediments with a wide range of fines percentage (0.2 to 82.7), thereby establishing a better directed linear regression. The difference between both linear regressions in figure 6 could be due to different physicochemical characteristics of both sample series (i.e. types of clay or silt, clay/silt ratio, etc). It is also interesting to note that our flow cytometric correction method includes different kinds of confounding factors (clay, silt, organic matter). Comparing the percentage of bacterial loss calculated from the results of bacterial concentration found by Ringwood *et al.* (1997) in their clay mixtures, it was found that in our study the percentage of bacterial loss was up to 94% of bacterial loss (for 75% of silt+clay) whereas Ringwood *et al.* (1997) have found up to 87% of bacterial loss (for 100% of one kind of clay, i.e. kaolin). These differences could also be due to the fact that we have tested natural sediments, and consequently the interaction between bacteria and different kinds of fines and organic matter as for example humic substances could be more complex (Fein *et al.*, 1999; Warren and Haack., 2001).

2.3.2.5 Conclusions

This study demonstrated the bias related to adsorption of bacteria on particles in natural sediments when performing the MSPA. Moreover, we proposed two improvements for this test :

- a) the first is the development of MLPA to differentiate between leachate and bulk effects.
- b) the second is a method of correction based on flow cytometry analyses. As suggested by Ringwood et al. (1997), we also proposed to use a log-log plot to make corrections of MSPA IC50s.

Hence, a combination of both methods constitutes a useful tool for differentiating between liquid and true solid effects. As a perspective, it would be also very interesting to look at the the viability of fixed and not recovered bacteria when there is a true solid phase assay effect.

2.3.2.6 References

- Ankley, G.T., Katko, A., Arthur, J.W., 1990. Identification of ammonia as a major sediment associated toxicant in the lower Fox River and Green Bay, Wisconsin. *Environ. Toxicol. Chem.* 9, 313-322.
- Benton, M.J., Malott, M.L., Knight, S.S., Cooper, C.M., Benson, W.H., 1995. Influence of sediment composition on apparent toxicity in a solid-phase test using bioluminescent bacteria. *Environ. Toxicol. Chem.* 14, 411-414.
- Brouwer, H., Murphy, T., McArdle, L., 1990. A sediment contact bioassay with *Photobacterium phosphoreum*. *Environ. Toxicol. Chem.* 9, 1353-1358.
- Burton, G.A., Ingersoll, C.G., Burnett, L.C., Henry, M., Hinman, M.L. Klaine, S.J., Landrum, P.F., Ross, P., Tuchman, M., 1996. A Comparison of Sediment Toxicity Test Methods at Three Great Lakes Areas of Concern. *J. Great Lakes Res.* 22, 495-511.
- Costerton, J.W., Marrie, T.J., Cheng, K.J., 1985, Phenomena of bacterial adhesion, in: Savage D.C. and Fletcher M. (eds.), *Bacterial adhesion, mechanisms and physiological significance*. Plenum Press, New-York, 3-43.
- Campisi, T., Abbondanzi, F., Casado-Martinez, C., Del Valls, T.A., Guerra, R., Iacondini, A., 2005. Effects of sediment turbidity and color on light output measurements for Microtox Basic Solid-Phase Test. *Chemosphere.* 60 , 9-15
- Doe, K., Scroggins, R., Mcleay, D., Wohlgeschaffen, G., 2005. Solid-phase test for sediment toxicity using the luminescent bacterium *Vibrio fischeri*, in: Blaise, C., Férard, J.F. (Eds.), *Small-scale freshwater toxicity investigations (Volume 1)*, Springer, Dordrecht. 107-136.

- Dellamatrice P.M., Monteiro R.T.R., Blaise C., Slabbert J.L., Gagné F., Alleau S., 2006. Toxicity assessment of reference and natural freshwater sediments with the luminotox assay. *Environ Toxicol.* 21, 395-402
- Fein, J.B., Boily, J.F., Guçlu, K., Kaulbach, E., 1999. Experimental study of humic acid adsorption onto bacteria and Al-oxide mineral surfaces. *Chem Geol*, 162, 33-45
- Gasol, J.M., Del Giorgio P.A., 2000. Using flow cytometry for counting natural planktonic bacteria and understanding the structure of planktonic bacterial communities. *Sc. Mar.* 64, 197-224
- Guerra, R., Pasteris, A., Ponti, M., Fabbri, D., Bruzzi, L., 2007. Impact of dredging in a shallow coastal lagoon: Microtox Basic Solid-Phase Test, trace metals and Corophium bioassays. *Environment International.* 33, 469-473
- Ivanova, E.P; Dineva, N. M; Mocanasu, R. C; Murphy, S; Wang, J; Riessen, G; Crawford, R. 2008. *Vibrio fischeri* and *Escherichia coli* adhesion tendencies towards photolithographically modified nanosmooth poly (*tert*-butyl methacrylate) polymer surfaces. *Nanotechnology, Science and Applications.* 1, 33-44.
- Jacobs, M.W., Delfino, J.J., Bitton, G., 1992. The toxicity of sulfur to Microtox from acetonitrile extracts of contaminated sediments. *Environ Toxicol Chem.* 11, 1137-1143.
- Loizeau, J.-L., Arbouille, D., Santiago, S., Vernet, J.P., 1994. Evaluation of a wide range laser diffraction grain size analyser for use with sediments. *Sedimentology.* 41, 353-361.
- Marie, D., Partensky, F., Jacquet, S., Vaultot, D., 1997. Enumeration and cell cycle analysis of natural populations of marine picoplankton by flow cytometry using the nucleic acid stain SYBR Green I. *Appl. Environ. Microbiol.* 63, 186-193
- Maurice, P. A., Manecki, M., Fein, J. B., and Schaefer, J., 2004. Fractionation of an aquatic fulvic acid upon adsorption to the bacterium, *Bacillus subtilis*. *Geomicrobiol. J.* 21, 69-78.
- Pardos, M., Benninghoff, C., Thomas, R.L., Khim-Heang, S., 1999. Confirmation of elemental sulfur toxicity in the microtox assay during organic extracts assessment of freshwater sediments. *Environ. Toxicol. Chem.* 18, 188-193
- Quintino, V., Picado, A.M., Rodrigues, A.M., Mendonça, E., Costa, M.H., Bordalo Costa, M., Lindgaard-Jorgensen, P., Pearson, T.H., 1995. Sediment chemistry - infaunal community structure in a southern european estuary related to solid-phase microtox toxicity testing. *Neth. J. Aqu. Ecol.* 29, 427-436
- Ringwood, A.H., Delorenzo, M.E., Ross, P.E., Holland, A.F., 1997. Interpretation of Microtox™ solid-phase toxicity tests: The effects of sediment composition. *Environ. Toxicol. Chem.* 16, 1135-1140
- Stronkhorst, J., Ciarelli, S., Schipper, C.A., Postma, J.F., Dubbeldam, M., Vangheluwe, M., Brils, J.M., Hooftman, R., 2004. Inter-laboratory comparison of five marine bioassays for evaluating the toxicity of dredged material. *Aquat. Ecosyst. Health Manag.* 7, 147-159
- Svenson, A., Edsholt, E., Ricking, M., Remberger, M., Rottorp, J., 1996. Sediment contaminants and Microtox toxicity tested in a direct contact exposure test. *Environ. Toxicol. Water Qual.* 11, 293-300.
- Troussellier, M., Courties, C., Vaquer, A., 1993. Recent applications of flow cytometry in aquatic microbial ecology. *Biol. Cell.* 78, 111-121.
- Urbanczyk, H., Ast, J.C., Higgins, M.J., Carson, J., Dunlap, P.V., 2007, Reclassification of *Vibrio fischeri*, *Vibrio logei*, *Vibrio salmonicida* and *Vibrio wodanis* as *Aliivibrio fischeri* gen. nov., comb. nov., *Aliivibrio logei* comb. nov., *Aliivibrio salmonicida* comb. nov. and *Aliivibrio wodanis* comb.. *Nov. Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 57, 2823-2829.
- Volpi Ghirardini, A., Girardini, M., Marchetto, D., Pantani, C., 2009. Microtox solid phase test: Effect of diluents used in toxicity test. *Ecotox. Environ. Safe.* 72 851-861
- Warren, L.A., Haack, E.A., 2001. Biogeochemical controls on metal behaviour in freshwater environments. *Earth sciences reviews.* 54, 261-320

2.3.3 Relation entre perte des bactéries et matière organique

La correction proposée dans le § 2.3.2 (Burga-Pérez *et al.* 2012) met en relation le pourcentage de perte des bactéries en fonction du contenu en limons et argiles pour chaque concentration de sédiments testé. Comme déjà évoqué dans la publication, la matière organique présente dans les sédiments pourrait aussi contribuer à la perte des bactéries due aux processus d'adsorption sur celle-ci. A cet effet, nous avons également testé la relation entre la perte en bactéries et les contenus en matière organique, la figure 17 montre la corrélation significative ($r=0,69$, $p = 9,17 \times 10^{-6}$) entre les deux paramètres. Cependant, quand nous avons intégré dans un même modèle l'effet de la fraction des particules fines et de la matière organique sur la perte en bactéries, la contribution de la matière organique au modèle n'a pas été significative ($p>0.05$)

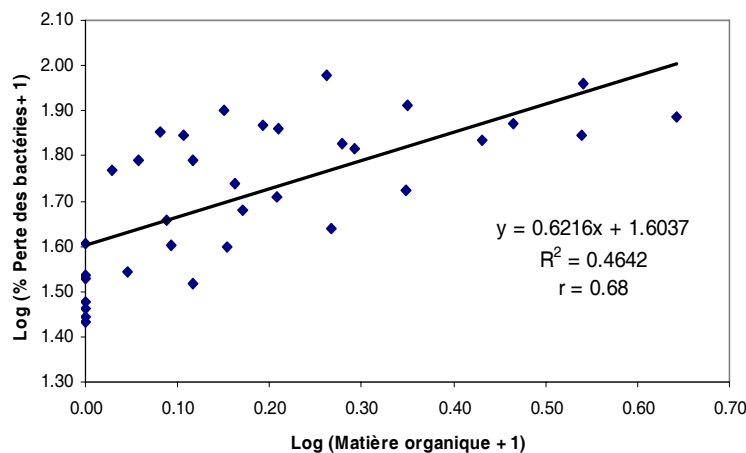


Figure 17: Relation entre le pourcentage de perte des bactéries avec la matière organique pour chaque concentration de sédiment testé

Nous en déduisons que, dans la relation «limon+argile vs % perte des bactéries», l'effet des particules fines inclut probablement aussi les effets de la matière organique associée, puisque les différents composés constituant la matière organique des sédiments peuvent être associé aux particules fines des sédiments (Schorer 1997). Nous n'excluons donc pas la contribution de la matière organique dans la perte de bactéries lors de l'exécution du test MSPA.

2.3.4 Réévaluation de l'écotoxicité des 21 sédiments

La relation mise en évidence entre le pourcentage de perte des bactéries et la quantité de limons + argiles nous a permis de recalculer pour le test MSPA des CI_{50} corrigées qui sont listées dans le tableau 7. Il faut noter que ces CI_{50} corrigées se révèlent non significativement différentes des CI_{50} obtenues avec le test MLPA (tableau 7) dans le cas des sédiments 1, 2, 5, 8, 9, 10, 12, 14, 15, 17, 19. Dans le cas des autres sédiments où les résultats sont significativement différents (i.e. 3, 4, 6, 7, 11, 13, 16, 18, 20, 21), il y aurait bien une écotoxicité potentielle liée à la phase solide proprement dite des sédiments.

Tableau 7: Résultats du test MSPA corrigé

Sédiment	Code	MSPA Corrigé	Intervalle de confiance (95%)		
		CI_{50} (g sed sec/L)			
Sédiments de la 1ère campagne	1	BB2	48,74	37,00	71,50
	2	PG2	9,60	7,50	12,00
	3	LCB	6,70	5,29	8,26
	4	CMA	0,88	0,81	0,95
	5	CMC	3,70	3,50	4,00
Sédiments de la 2ème campagne	6	VID	0,067	0,064	0,069
	7	MOR	1,02	0,95	1,11
	8	MAR	0,84	0,73	0,96
	9	IBA	20,70	16,97	25,73
	10	CAJ	14,73	13,18	16,36
	11	PG3	0,48	0,25	0,67
Sédiments de la 3ème campagne	12	LG2	2,39	1,60	3,42
	13	BIO	8,06	7,23	8,96
	14	PG5	1,59	0,82	1,62
	15	BIE	1,30	0,92	1,76
	16	AMO	1,29	0,98	1,74
	17	NEY	5,63	3,68	7,70
Sédiments JURA	18	LAV	11,3	10,2	12,7
	19	ETA	3,46	2,5	5,88
	20	CHA	2,31	1,88	2,82
	21	SIR	35,6	26,5	44,3

Avec les valeurs de CI50 des tests MSPA corrigé, nous avons réalisé une classification ascendante hiérarchisée (distance euclidienne et critère d'agrégation de Ward). Sur la figure 18, nous avons représenté 4 groupes de sédiments. Si l'on se réfère au tableau 7 ci-dessus, le classement de ces 4 groupes du plus écotoxique au moins écotoxique s'établit de la façon suivante :

groupe 4 > groupe 3 > groupe 2 > groupe 1

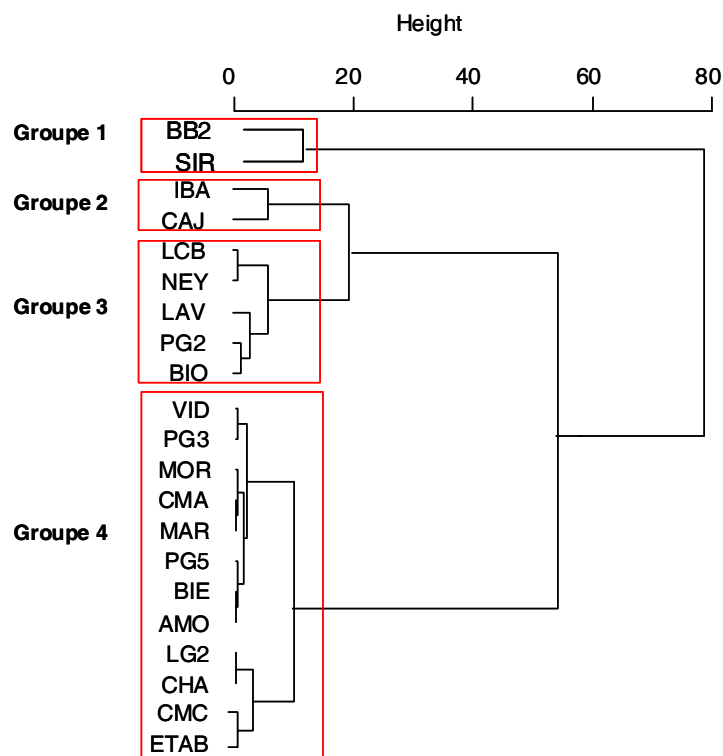


Figure 18: Classification ascendante hiérarchisée des CI 50 corrigées obtenues avec le MSPA corrigé (distance euclidienne et critère d'agrégation de Ward)

L'analyse de corrélation entre les valeurs de CI50 corrigées et les paramètres physico-chimiques mesurés sur les sédiments révèlent une corrélation inverse avec le pourcentage des limons ($r=-0,51$, $p=0,03$) et une corrélation positive avec le pourcentage de sable ($r=0,53$, $p=0,03$). La granulométrie des sédiments et la spéciation des métaux sont des facteurs particulièrement importants car ils contribuent à la mobilité et la disponibilité des métaux dans les sédiments (Burton 1991, Lin *et al.* 2003). Les métaux lourds sont plus adsorbés par les particules fines, en particulier de type argiles que par les fractions grossières (Schorer 1997). Bulich (1979) a aussi expliqué que cette fraction fine dans les sédiments peut être considérée comme une source d'écotoxicité. L'importante surface spécifique des particules fines augmenterait ainsi l'exposition des toxiques aux bactéries. La granulométrie du sédiment peut également jouer un rôle important dans la distribution des HAP. La mobilité et la biodisponibilité des HAP diminuent quand la fraction de particules fines d'un sédiment augmente, surtout pour ceux de poids moléculaire élevé (peu hydrosolubles) (Kukkonen et Landrum 1996, Horng et Taghon 1999). Dans notre étude, aucune corrélation n'a été identifiée entre les métaux, HAP ou PCB totaux dosés dans les sédiments et les résultats des tests. De même, Tay *et al.* (1992) n'ont pas trouvé de corrélations significatives entre les contenus en métaux totaux des sédiments et les différentes valeurs d'écotoxicité obtenues avec la batterie de tests qu'ils ont utilisée, y compris le MSPA (qui dans cette étude a été le test le plus sensible). Domene *et al.* (2008) n'ont pas trouvé de relations significatives entre les paramètres chimiques des boues testées et la réponse de *A. fischeri*. Différents auteurs signalent que l'écotoxicité des sédiments dépend de l'effet collectif de tous les polluants présents dans le sédiment (Beg *et al.* 2001, Zabetoglou *et al.* 2002, Mamindy-Pajany *et al.* 2011). Salizzato *et al.* (1998) évoquent la possibilité que des formes de sulfure puissent jouer un rôle dans l'écotoxicité des sédiments évaluée à l'aide du test MSPA.

2.4 Conclusions et perspectives

Cette étude a démontré le biais lié à la fixation des bactéries sur les particules dans les sédiments naturels lors de l'exécution du MSPA. La méthode de correction basée sur la cytométrie en flux permet de prendre en compte la perte potentielle de bioluminescence causée par les bactéries qui sont restées fixées aux particules. D'autres biais potentiels comme les sulfures peuvent aussi contribuer à biaiser l'écotoxicité réelle des sédiments, mais nous n'avons jamais pu reproduire les résultats obtenus par Pardos *et al.* (1999) du fait de la rupture de commercialisation du cuivre activé utilisé par ces auteurs et des difficultés rencontrées dans la mise au point d'un tel réactif. Les perspectives concernent la mise au point d'un tel réactif (non toxique pour les bactéries) ainsi que le dosage des acides humiques et fulviques avec la méthode de Quentel et Montserrat (2011) que nous avons seulement découvert au moment de la rédaction de ce mémoire. Par ailleurs, l'utilisation des techniques de cytométrie en flux pour la détection d'*A. fischeri* dans les sédiments ouvre une voie encore inexplorée sur la viabilité de ces bactéries après exposition à des échantillons contaminés.

Les trois tests utilisés (MSPA, MLPA et MSPA corrigé) permettent de faire une bonne discrimination entre les divers sédiments testés avec respectivement des facteurs de variation entre les valeurs minimales et maximales obtenues égales à environ 400, 1620 et 730. En plus du test MSPA corrigé, le MLPA peut être utilisé comme un test complémentaire au MSPA pour différencier entre les effets des éluviats seuls et ceux du sédiment entier.

Chapitre 3 : Les CEP (complexes enzymatiques photosynthétiques) pour évaluer l'écotoxicité des sédiments

3.1 Synthèse Bibliographique

3.1.1 La photosynthèse et le photosystème PS II

La photosynthèse comprend un ensemble de réactions permettant aux plantes, algues et certaines bactéries d'utiliser l'énergie lumineuse pour la convertir en énergie chimique. Ce processus s'effectue dans les chloroplastes où l'appareil de conversion énergétique est intégré dans la membrane des thylakoïdes de ces organites. La photosynthèse est divisée en deux parties : les réactions de la phase lumineuse et les réactions de la phase obscure. Dans la phase lumineuse, l'énergie solaire est utilisée pour créer un potentiel redox. Au cours de cette phase, l'énergie lumineuse est utilisée pour produire de s molécules d'adénosine triphosphate (ATP), de nicotinamide adénine dinucléotide phosphate réduit (NADPH), d'oxygène et de protons qui proviennent de la photolyse de l'eau. La phase obscure de la photosynthèse utilise l'énergie chimique produite au cours de la phase précédente pour fixer le CO₂ et synthétiser les glucides.

Deux types de photosystèmes (PS I et PS II) (figure 19) interviennent dans les réactions de la phase lumineuse. Comme l'a décrit Rochaix (2011), dans une synthèse sur la régulation photosynthétique, au cours de la première phase de la photosynthèse, le PS II capture l'énergie solaire par des pigments antennaires et l'utilise pour extraire un électron à partir d'une molécule d'eau, dégageant ainsi de l'oxygène. Les électrons sont transférés vers une chaîne de transporteurs protéiques d'électrons situés entre le PSII et le PSI. Cette chaîne est composée de plastoquinones (PQ), de complexes cytochromes b₆f et de plastocyanines (PC). Ces réactions de transfert d'électrons sont également reliées avec le pompage des protons dans le lumen des thylakoïdes. Le gradient de protons qui résulte de ces réactions est utilisé pour produire de l'ATP. L'ATP et le NADPH vont être utilisés pour la fixation du CO₂ dans le cycle de Calvin-Benson.

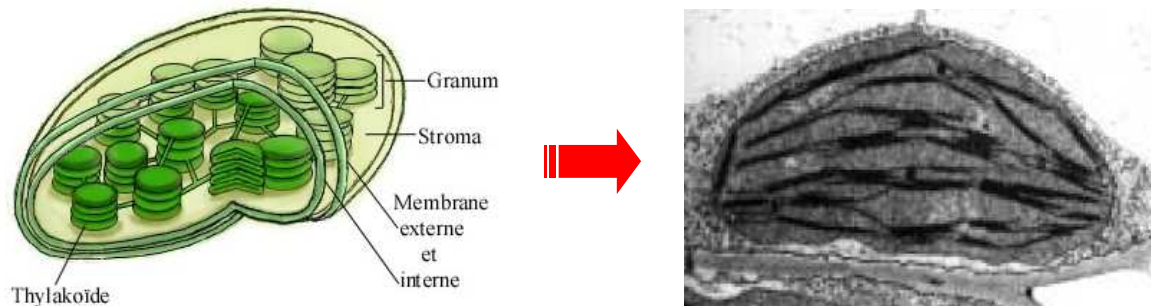


Figure 20: Chloroplaste et thylakoïdes. La figure de gauche représente le schéma d'un chloroplaste en indiquant ses principaux composants. La figure de droite est l'image au microscope électronique d'un chloroplaste avec ses thylakoïdes d'une feuille de tabac (Allen et Forsberg 2001).

Dans la photosynthèse, l'énergie lumineuse absorbée par les pigments photosynthétiques n'est pas complètement utilisée par les réactions photochimiques. Une partie de cette énergie est dissipée sous forme de chaleur et de fluorescence. Les premières mesures de fluorescence ont été réalisées par Lorenzen en 1966 et Kiefer et Reynolds (1992) et jusqu'à présent ce paramètre a largement été utilisé comme un indicateur de (i) la biomasse algale mais aussi de (ii) la photoinhibition (Kiefer et Reynolds 1992, Cullen et Davis 2003). La fluorescence a aussi été employée pour estimer l'efficacité photosynthétique. La majorité de cette fluorescence provient de la chlorophylle *a* des antennes du PSII. Le rendement de la fluorescence de la chlorophylle *a* dépend de l'état d'oxydoréduction de l'accepteur primaire des électrons du PSII, le QA. Ce rendement de la fluorescence augmente quand le QA se réduit et diminue quand le QA se ré-oxyde (Lazar 1999).

3.1.2 Les thylakoïdes comme outil de détection des polluants.

L'utilisation de membranes des thylakoïdes comme biocapteurs réagissant à la présence de polluants offrent certains avantages par rapport aux plantes entières, notamment une meilleure sensibilité et une meilleure reproductibilité des mesures (Dewez *et al.* 2007). Certains polluants peuvent rapidement interagir avec des sites cibles du PSII et ainsi affecter le transport des électrons photosynthétiques, ayant comme conséquence: un changement dans le rendement de la fluorescence de la chlorophylle *a* (Piletskaya *et al.* 1999, Buonasera *et al.* 2011).

Différentes études ont révélé la capacité des thylakoïdes isolés à détecter les effets de polluants. Parmi celles-ci, certaines se sont focalisées sur la détection des herbicides dans différents types d'échantillons d'eau (e.g. solutions aqueuses de composts (Schnabl *et al.* 1998), échantillons de sol ou d'aliment (Trapmann *et al.* (1998), de l'eau potable (Piletskaya *et al.* 1999). L'utilisation de thylakoïdes est considérée comme un outil de test rapide et économique pour détecter efficacement les herbicides, comparée aux techniques d'analyse chimique des résidus de pesticides (Giardi *et al.* 2001). Il a été démontré que parmi le grand nombre de composés utilisés en agriculture, certaines classes d'herbicides exercent un blocage du système transporteur d'électrons du PSII dans l'accepteur d'électrons secondaires, QB (Figure 21) (Van Rensen 1982, Rouillon *et al.* 1995, Dahlin 2003, Bettazzi *et al.* 2007).

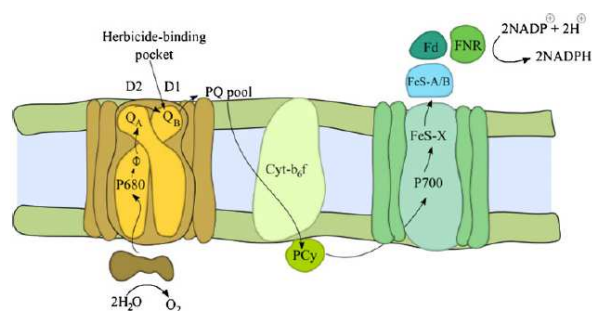


Figure 21: Schéma qui montre le site de liaison entre les herbicides et le PSII (Buonasera *et al.* 2011)

De même, les organismes photosynthétiques sont très sensibles aux métaux lourds : cet effet a été mis en évidence par Baishnab *et al.* (1980) et Boucher et Carpentier (1999) en utilisant les thylakoïdes. Le cuivre est l'un des métaux dont les effets ont été les plus étudiés. L'effet toxique de ce polluant au niveau du système photosynthétique de transport des électrons a été considérablement étudié *in vitro* (Cedeno-Maldonado *et al.* 1972, Hsu et Lee 1988, Dewez *et al.* 2007, Renganathan et Bose 1990). Ces auteurs ont trouvé que le PSII était un site plus sensible aux effets du cuivre que le PSI. Boucher et Carpentier (1999) ont montré que non seulement le cuivre mais également le mercure (Hg^{2+}) et le plomb (Pb^{2+}) avaient un effet toxique sur le PSII de thylakoïdes isolés à partir des feuilles d'épinard.

3.1.3 Instruments pour mesurer l'activité du PSII

La mesure de fluorescence peut être utilisée pour étudier les processus de transfert de l'énergie lumineuse, l'efficacité des réactions photochimiques du PSII et le transport des électrons, qui sont interdépendants avec les autres processus biochimiques ou physiologiques liés à la photosynthèse (Krause et Weis 1984, Lazar 1999, Krause et Jahns 2003). Des changements de fluorescence, après exposition à un milieu pollué, peuvent donc fournir une indication sur l'impact de ce milieu pollué sur les processus photosynthétiques.

Les techniques de mesure de la fluorescence se sont améliorées avec le temps. Ce sont maintenant des méthodes rapides, très sensibles et non invasives (White et Critchley 1999, Ralph *et al.* 2010). La mesure de la fluorescence est considérée par Giardi *et al.* (2001) et par Ralph *et al.* (2010) comme un bioindicateur car elle permet à la fois de surveiller l'état d'organismes photosynthétiques dans des écosystèmes pollués et de détecter la présence de toxiques dans un échantillon d'eau. Parmi les instruments pour mesurer l'activité du PSII, différents types de fluorimètres se sont révélés être des outils efficaces pour surveiller les effets de stress et de polluants sur le PSII (Juneau et Popovic 1999, Mallick et Mohn 2003). Les appareils et techniques les plus utilisés sont le PAM (Pulse Amplitude Modulator), le PEA (Plant Efficiency Analyser) et plus récemment le LuminoTox

analyser. Ces appareils permettent de mesurer *in vivo* (PAM et PEA) et *in vitro* (LuminoTox) l'activité photosynthétique et les processus associés.

3.1.4 Le LuminoTox

Le LuminoTox (Lab-Bell Inc., Trois-rivières, Québec, Canada) est un système qui repose sur l'utilisation de systèmes aqueux photosynthétiques stabilisés (SAPS) ou de complexes enzymatiques photosynthétiques (CEP) avec un fluorimètre spécialement adapté pour mesurer la fluorescence provenant de leur activité photosynthétique. Les SAPS sont des algues entières (*Chlorella vulgaris*) et les CEP sont des membranes de thylakoïdes isolées à partir de feuilles d'épinard. L'applicabilité du système LuminoTox a été mise en évidence pour évaluer l'écotoxicité d'effluents d'eaux usées provenant de milieux industriels et agricoles (Bellemare *et al.* 2006, Dellamatrice *et al.* 2006)

Le système LuminoTox permet la détection de toxiques de façon rapide et simple, par rapport à d'autres bioessais. Avec des effluents industriels le test a présenté une sensibilité équivalente au test daphnie mais plus importante que le test algues (Bellemare *et al.* 2006). Ce test a également montré une plus grande sensibilité au tetrabromobisphenol A (B4BPA) en utilisant des SAPS que le test Microtox® (Debenest *et al.* 2010). Derwez *et al.* (2007) ont comparé les résultats provenant des systèmes PAM, PEA et LuminoTox après une exposition des membranes de thylakoïdes au cuivre et à l'atrazine et ils ont montré que le LuminoTox présentait la plus forte sensibilité au cuivre. Enfin, Dellamatrice *et al.* (2006) ont adapté le test LuminoTox pour évaluer l'écotoxicité des sédiments, à partir d'un test de contact direct entre les PEC et les sédiments. Les résultats obtenus sont comparables à ceux obtenus avec le test MSPA, mais ils ont noté l'existence potentielle de biais liés aux particules des sédiments dans les résultats du test.

3.2 Objectifs du travail

Dans notre travail de recherche, nous nous sommes focalisés sur l'utilisation du test LuminoTox comme une méthode de screening pour évaluer l'écotoxicité des sédiments (Lum-SPA) à partir de l'utilisation des membranes de thylakoïdes isolées de plantes d'épinards. Dans un premier temps, nous avons développé un test complémentaire au test Lum-SPA dénommé Lum-LPA pour évaluer la fraction hydrosoluble des sédiments. Nous avons aussi évalué, dans cette étape, le biais potentiel dû aux particules fines des sédiments. La deuxième étape correspond à l'évaluation écotoxicologique de 21 sédiments naturels et à l'analyse du pouvoir discriminant du test pour identifier des sédiments peu, moyennement et très fortement contaminés.

3.3 Matériel et méthodes

3.3.1 Préparation des solutions

a) Reconstitution des CEP

Les CEP fournis par Lab-Bell ont été réhydratés avec 5 mL de tampon de reconstitution (+HEPES 50 mM et 330 mM de saccharose, à pH 7,5) et agités pendant 2 minutes à l'aide d'un vortex. Ensuite, ils ont été conservés dans un bac avec la glace pendant au minimum 15 minutes jusqu'au déroulement des tests.

b) Préparation des concentrations de sédiments

Pour chaque sédiment, entre cinq et six concentrations ont été testées (avec trois réplicats par concentration). L'essai s'est déroulé initialement dans des tubes de polypropylène de 50 ml et, en fonction du sédiment testé, les dilutions ont été faites en cascade en partant d'une solution mère ayant une concentration donnée (généralement 10%, i.e. 1g sédiment humide + 10 mL d'eau milli-Q). Entre chaque dilution, le contenu des tubes a été homogénéisé avec un vortex pendant environ 1 minute.

3.3.2 Protocoles expérimentaux

a) LuminoTox phase solide (Lum-SPA)

Pour le déroulement des tests, nous avons travaillé sur la base du protocole de Dellamatrice *et al.* (2006) (figure 22). Après la préparation des dilutions des sédiments dans des tubes de 50 mL, 2 mL de chaque dilution sont placés dans des tubes de polyéthylène. Ensuite, 100 µL de CEP réhydratés ont été ajoutés à chaque tube. Après 15 minutes de contact entre les CEP et les sédiments à l'obscurité, un filtre colonne

(diamètre de 6 mm, épaisseur de 4 mm, taille des pores allant de 15 à 45 μm^8) a été enfoncé dans le tube contenant le mélange.

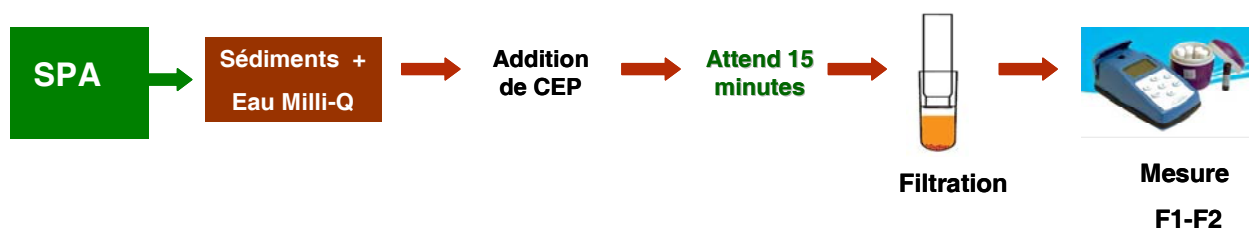


Figure 22: Mode opératoire de la procédure expérimentale du test Luminotox en phase solide (Lum-SPA) selon Dellamatrice *et al.* (2006)

Le filtrat résultant, contenant les CEP exposés, a été transféré dans une cuvette de polyméthacrylate de méthyle (PMMA). Chaque cuvette a été placée dans le fluorimètre LuminoTox (fourni par le laboratoire de Lab-Bell, Canada) pour mesurer les valeurs de F2 et F1, qui sont mesurés à une longueur d'onde > 700 nm après excitation lumineuse à 470 nm. La fluorescence F2 correspond aux quinones complètement réduites (QA-QB₂) après application d'une lumière de forte intensité. La fluorescence F1 correspond aux quinones complètement oxydées après l'application d'une lumière de faible intensité (Bellemare *et al.* 2006, Dellamatrice *et al.* 2006). Ces deux mesures permettent de calculer l'efficacité de la photosynthèse (Φ_p) selon la formule suivante :

$$\Phi_p = [F2 (\text{échantillon}) - F1 (\text{échantillon})] / F2 (\text{témoin})$$

⁸ il s'agit du même type de filtre que celui utilisé dans le MSPA, le matériel a également été fourni par R-Biopharm, Lyon, France.

L'efficacité photosynthétique calculée pour chaque échantillon testé (en triplicat) a permis de déterminer les pourcentages d'inhibition par rapport au témoin, générant une courbe de concentration-réponse et finalement le calcul d'une concentration pour laquelle la réponse est inhibée de 50 ou de x % par rapport au témoin.

b) Luminotox sur lixiviat de la phase solide (Lum-LPA)

Le Lum-LPA est une version modifiée du Lum-SPA, basé sur la méthodologie de Burga-Pérez *et al.* (2012), où la seule différence concerne le fait que les CEP sont exposés après la filtration des sédiments dilués (Figure 23). Les mêmes concentrations de sédiments ont été testées avec le Lum-SPA et le Lum-LPA. Les mêmes consommables (tubes, filtres et réactifs) que ceux utilisés pour le Lum-SPA ont été employés pour cette méthode. Les CEP ont été exposés à chaque filtrat pendant 15 min à l'obscurité. A la fin de l'exposition, les filtrats ont été déposés dans une cuvette de polyméthacrylate de méthyle (PMMA). Chaque cuvette a été placée dans le fluorimètre LuminoTox pour mesurer les valeurs de F2 et F1). Les efficacités photosynthétiques (Φ_p), les pourcentages d'inhibition et les CIX ont été calculés pour chaque échantillon testé comme pour le Lum-SPA.

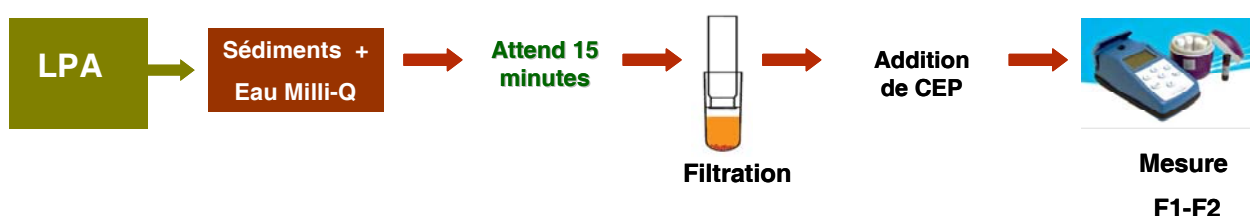


Figure 23: Mode opératoire de la procédure expérimentale du test Luminotox sur lixiviat de la phase solide (Lum-LPA)

c) Test Luminotox sur les lixiviats centrifugés (C-Lum-LPA)

Le test C-Lum-LPA a été réalisé pour séparer les particules de la phase liquide des filtrats du Lum-LPA. Les surnageants obtenus dans le Lum-LPA ont été centrifugés à 3000g pendant 15 minutes. Ensuite, 100 μ L de CEP ont été ajoutés à 2 ml de surnageant. Le

mélange a été exposé pendant 15 minutes à l'obscurité. À la fin du temps d'exposition, les surnageants ont été transférés dans des cuvettes de lecture PMMA. Chaque cuvette a été placée dans le fluorimètre LuminoTox, et les valeurs de F2 et F1 ont été mesurées. Les efficacités photosynthétiques (Φ_p), les pourcentages d'inhibition et les CIx ont été calculés pour chaque échantillon testé comme pour le Lum-SPA.

d) Le Luminotox contact direct (Lum-DCA)

Le Lum-DCA est une autre variante du test Luminotox, dans laquelle aucune filtration pré- ou post-exposition n'est effectuée. Dans cet essai, les CEP sont exposés à différentes quantités d'argiles (voir § e) pendant 15 minutes à l'obscurité, puis le mélange est placé dans les cuves de lecture pour mesurer l'efficacité de la photosynthèse tout comme précédemment.

e) Le LuminoTox avec des argiles

Différents tests Luminotox ont été effectués avec deux types d'argile fournis gracieusement par le LEM (Laboratoire Environnement Minéralurgie) avec les données qui suivent⁹. La kaolinite de Géorgie (USA) provient de la Clay Mineral Society et se caractérise par une capacité d'échange cationique (CEC) de $3,7 \pm 0,1$ mEq/100 g de sédiment sec et une surface spécifique de $22 \text{ m}^2.\text{g}^{-1}$. La bentonite de Géorgie (IBECO) provient de la S&B Industrial Minerals GmbH et se caractérise par une CEC de $98,4 \pm 2$ mEq/100 g de sédiment sec. Les Lum-SPA, Lum-LPA et Lum-DCA ont été réalisés avec différentes quantités d'argile (tableau 8) en triplicat.

⁹ qui figurent dans un rapport confidentiel du LEM

Tableau 8: Conditions testées avec le Lum-SPA, Lum-LPA et Lum-DCA

(K=Kaolinite, B=Bentonite)

Type d'argile	Conditions		
	K (100%)	K/B (50/50%)	B (100%)
Kaolinite (mg)	20	10	0
Bentonite (mg)	0	10	20

Les différentes quantités d'argile ont été dissoutes dans 2 ml d'eau Milli-Q de l'eau. Les Lum-SPA et Lum-LPA ont été réalisés avec le même protocole que celui décrit dans les sections 3.3.2a et 3.3.2b. Finalement, une autre série de tests a été réalisée en utilisant le Lum-SPA, le Lum-LPA et le Lum-DCA avec les deux types et quantités d'argiles décrit dans la tableau 8 mais en ajoutant du sulfate de cuivre (CuSO_4) à 0.6 mg L^{-1} .

e) Dosage de la chlorophylle *a*

Les mesures des teneurs en chlorophylle *a* ont été effectuées à partir de filtrats du Lum-SPA après une exposition des CEP aux argiles (cf. tableau 8). Les filtrats obtenus ont été dilués (1:2) avec du méthanol (90%). Avant les mesures, afin d'éviter les interférences provoquées par des particules d'argile, des extraits ont été centrifugés à $8000g$ pendant 15 minutes. L'absorbance a été lue à 664, 647 et 630 nm avec un spectrophotomètre (UVIKON 933), une lecture a également été réalisée à 750 nm afin de corriger l'interférence de la turbidité. Les concentrations de chlorophylle *a* ont été calculées selon l'équation de Jeffrey et Humphrey (1975).

3.3.3 Exploitation statistique des données

Les CI_{20} et CI_{50} 15 minutes (et leurs intervalles de confiance à 95%) ont été calculées pour le Lum-SPA, le Lum-LPA, le C-Lum-LPA et le Lum-DCA avec le logiciel REGTOX (version 7.0.3, disponible sur http://www.normalesup.org/~vindimian/fr_index.html) et ont été exprimées en g de sédiment sec/L. Les résultats obtenus pour chaque condition testée pour le test avec les argiles ont été comparés avec un test t de Student.

Des corrélations de Pearson ont été effectuées avec les valeurs de CI_{50} du test Lum-SPA et les paramètres physico-chimiques des sédiments testés. Une classification ascendante hiérarchique a été effectuée en utilisant la distance euclidienne et le critère d'agrégation de Ward.

3.4 Résultats et discussion

Pour ce chapitre nous avons divisé les résultats en deux parties. La première se réfère à l'analyse (i) de l'intérêt du Lum-LPA comme test complémentaire au Lum-SPA et (ii) du biais potentiel du test causé par les particules fines de sédiments. Cette partie correspond aux résultats obtenus avec 12 échantillons naturels testés et avec deux argiles (kaolinite et bentonite). Les résultats ont fait l'objet d'une publication soumise à la revue *Chemosphere* (cf. § 3.4.1). La deuxième partie se réfère à l'évaluation écotoxicologique des 21 sédiments (dont les 12 testés utilisés dans la première partie) testés avec les tests Lum-SPA et Lum-LPA.

3.4.1 Evaluation du Lum-LPA comme test complémentaire au Lum-SPA : Effet des particules fines

Publication soumise au journal Chemosphere, présentée ci-dessous dans une version word modifiée pour être mieux intégrée au document.

Assessment of the LuminoTox leachate phase assay as a complement to the LuminoTox solid phase assay: Effect of fine particles in natural sediments

Karen F. Burga Pérez¹, Rayna Charlatchka², Jean-François Férard¹

¹ LIEBE (Laboratoire des Interactions Ecotoxicologie, Biodiversité, Ecosystèmes), Université de Lorraine, UMR CNRS 7146, Campus Bridoux, Bâtiment IBiSE, Rue Delestraint, 57070, Metz, France

² EDF- Electricité de France, R&D, Laboratoire national d'hydrologie et environnement, 78401, Chatou, France

3.4.1.1 Abstract

The LuminoTox solid phase assay (Lum-SPA), developed to assess the potential ecotoxicity of natural polluted sediments, employs stabilized thylakoids isolated from spinach plant extracts. When thylakoids are exposed to polluted samples, the action of pollutants can interfere with transmission of chlorophyll fluorescence linked to Photosystems I and II, causing a decrease in fluorescence emission. To differentiate between bulk and leachate effects, we developed a complementary assay of the Lum-SPA named the LuminoTox leachate phase assay (Lum-LPA). Twelve natural sediments were selected on the basis of their potential ecotoxicity and different quantities of fines. Results showed that in the Lum-LPA, the IC50s were always lower than those observed in the Lum-SPA. Significant inverse correlations were found between the IC50s obtained with the Lum-SPA and the percentage of fines (silt + clay fraction). In order to identify the cause of the higher ecotoxicity found in the Lum-LPA, we tested the supernatant of the

liquid phase recovered after centrifugation (3,000 g), and it appeared far less toxic than the Lum-LPA filtrates. To confirm the hypothesis that sensitivity in the Lum-LPA could be due to the presence of very fine particles, Photosynthetic Enzyme Complexes (PECs) were exposed to two kinds of clay materials with and without copper (0.6 mg.L⁻¹). Similar results were obtained in the Lum-LPA for both cases, revealing the sensitivity of this test to very fine particles.

Keywords: LuminoTox, Photosynthetic Enzyme Complexes, sediment, fine particles, ecotoxicity.

3.4.1.2 Introduction

Thylakoids are site of light dependent reaction of photosynthesis and they have been used as biological models to assess pollutant occurrence in liquid samples (Rouillon, et al., 1995; Boucher and Carpentier, 1999; Laberge et al., 1999; Dewez et al., 2009). Pollutants can bind to specific sites of thylakoids related to the light driven electron transport causing interferences with the transmission of chlorophyll fluorescence linked to Photosystems I (PSI) and II (PSII). Changes in the chlorophyll fluorescence can provide an indication of impact of pollutants on photosynthetic processes (Krause and Weis, 1984; Boucher et al., 1999; Laberge et al., 1999). It has been showed that some heavy metals and herbicides can have an inhibitory action on the donor sites of PSII in thylakoids (Cedeno-Maldonado 1972; Renganathan et al., 1990; Boucher and Carpentier, 1999; Padua et al., 2009).

The LuminoTox (Lab-Bell Inc., Can.) assay employs a programmed luminometer and stabilized thylakoids, isolated from spinach plant extracts. The effectiveness of the Luminotox assay as a screening tool to assess samples ecotoxicity has been demonstrated for individual chemicals and complex matrices like municipal and industrial effluents (Boucher et al., 2005; Dewez et al., 2009) and sediments (Dellamatrice et al., 2006).

To assess the potential ecotoxicity of natural polluted sediments, Dellamatrice et al. (2006) developed a LuminoTox solid phase assay (Lum-SPA). They obtained a significant correlation with the Microtox® solid phase assay (MSPA) with 13 certified reference sediments. Moreover, they observed, with different mixtures of kaolin, a sharp drop when the percentage of fines (defined as sediment particles < 63 µm) was equal to or higher than 20%.

Particle size of sediments (specially the silt and clay fraction) has also been reported as a confounding factor in Mic-SPA (Benton et al., 1995; Quintino et al., 1995). Moreover, Ringwood et al. (1997) demonstrated that light output decreased in a predictable manner as clay + silt content increases and Burga Pérez et al. (2012) proposed a correction method based on fluorochrome staining for the MSPA results. In the same study, Burga Pérez et al. (2012) also proposed a new methodological improvement of the MSPA (Burga Pérez et al., 2012), developing a complementary test called Microtox leachate phase assay (MLPA) to evaluate the ecotoxicity of the leachate phase of natural sediments. This test is performed in the same conditions as the MSPA except for the introduction of bacteria into the sediment solution, which are added after the filtration. Following the same line of research in the present study, we have applied the same approach with the Lum-SPA. We also investigated the relative contribution of the solid and leachate phases in the global ecotoxicity. In this study, we also aimed at differentiating the origin of the ecotoxicity (fine particles or supernatant) into the filtrate leachate phase.

3.4.1.3 Material and Methods

a) Natural freshwater sediments

Twelve sediment samples were collected from different sites in France (11) and Switzerland (1). Samples were stored at 4°C before the test and a subsample was taken for physical and chemical characterization. The analyses consisted of grain size distribution

(Loizeau *et al.*, 1994) and organic matter content measured as loss of ignition (AFNOR 2000).

b) Luminotox assays with natural sediments (figure 24)

The Luminotox Solid Phase Assay (Lum-SPA) was performed according to the protocol developed by Dellamatrice *et al.* (2006). In this test, thylakoids from spinach extracts named PECs, supplied by Lab-Bell (Canada), were rehydrated in 50 mM HEPES and 330 mM sucrose (pH 7.5) during 15 minutes. After this time, 100 μ L of rehydrated PECs were added to 2 mL of sediments previously diluted in Milli-Q water. The resulting mixture was kept in the dark during 15 minutes. Afterwards, a column filter with a diameter of 6 mm, a thickness of 4 mm, and pore size ranging from 15 to 45 μ m (the same type of filter used in the Mic-SPA, material also supplied by R-Biopharm, Lyon-France); was then pushed in the vial containing the mixture. Then 2 ml of filtrate containing post exposed PECs were transferred to a polymethyl methacrylate (PMMA) reading cuvette of four faces optics (Dutscher, No 391002). Each cuvette was placed into the LuminoTox Analyzer (supplied by Lab Bell, Canada) to measure F2 and F1 values (see below), which are measured at a wavelength >700 nm after light excitation at 470 nm. The first parameter (F2) corresponds to the fluorescence related to reduced plastoquinone Qa after rapid application of a high light intensity excitation of the thylakoids within the instrument, and F1 relates to fully oxidized Qa after corresponding application of a low light excitation of the thylakoids (Dellamatrice *et al.*, 2006). These parameters allow calculation of the photosynthetic efficiency (Φ_p) according to the following formula:

$$\Phi_p = [F2 (\text{sample}) - F1 (\text{sample})] / F2 (\text{control})$$

Photosynthetic efficiencies calculated for each samples (tested in triplicate) allowed determination of the percentages of inhibition compared to control in order to generate a concentration-response curve and to determine an inhibition concentration that inhibits the response in x%.

The Luminotox Leachate Phase Assay (Lum-LPA) was conducted with the method developed by Burga-Pérez *et al.* (2012) for the Mic-LPA. We developed an alternative procedure to the Lum-SPA, carried out exactly in the same conditions as the Lum-SPA in terms of volume, concentration of sediments, processing time, except for the time of introduction of biological material into the sediment solution. After preparation of sediment dilutions in triplicate with Milli-Q water, 4 mL of each mixture previously vortexed were placed into borosilicate tubes. These tubes were left in stand-by for 15 minutes, and then a filter (as used in the Lum-SPA) was pushed in and 2 ml of filtrate were placed into another borosilicate tube. Next, 100 μ L of PECs were added to the filtrate and the mixture was exposed during 15 minutes in the dark. Finally, the post exposed mixture was transferred to PMMA reading cuvettes (Dutscher, No 391002) and measured as indicated in § 2.2a.

The Centrifugated Leachate Phase Assay (C-Lum-LPA) was carried out to separate the particles from the liquid phase in the Lum-LPA. Supernatants obtained in the Lum-LPA were centrifuged at 3,000g during 15 minutes. Then 100 μ L of PECs were added to 2 mL of supernatant. The mixture was exposed during 15 minutes in the dark. At the end of this period, it was transferred to PMMA reading cuvettes and measured as above.

c) LuminoTox assays with clays

Luminotox assays were performed with two kinds of clay i) kaolinite of Georgia (USA) provided by the Clay Minerals Society, with a cationic exchange capacity (CEC) of 3.7 ± 0.1 mEq. per 100g dry weight and an specific surface of $22 \text{ m}^2/\text{g}$ and ii) bentonite of Georgia (IBECO) provided by the firm IKO (S&B Industrial Minerals GmbH), with a CEC of 98.4 ± 2 mEq. per 100g dry weight. The Lum-SPA, Lum-LPA and LuminoTox direct contact assay (Lum-DCA) were performed with different amounts of clay (in triplicate). The latter assay refers to another alternative assay where no filtration before or after exposure was performed. In this assay, PECs were exposed to the different conditions (see Table-S1) during 15 minutes in the dark and then the mixture was placed in the reading cuvettes to measure the photosynthetic efficiency. The conditions tested

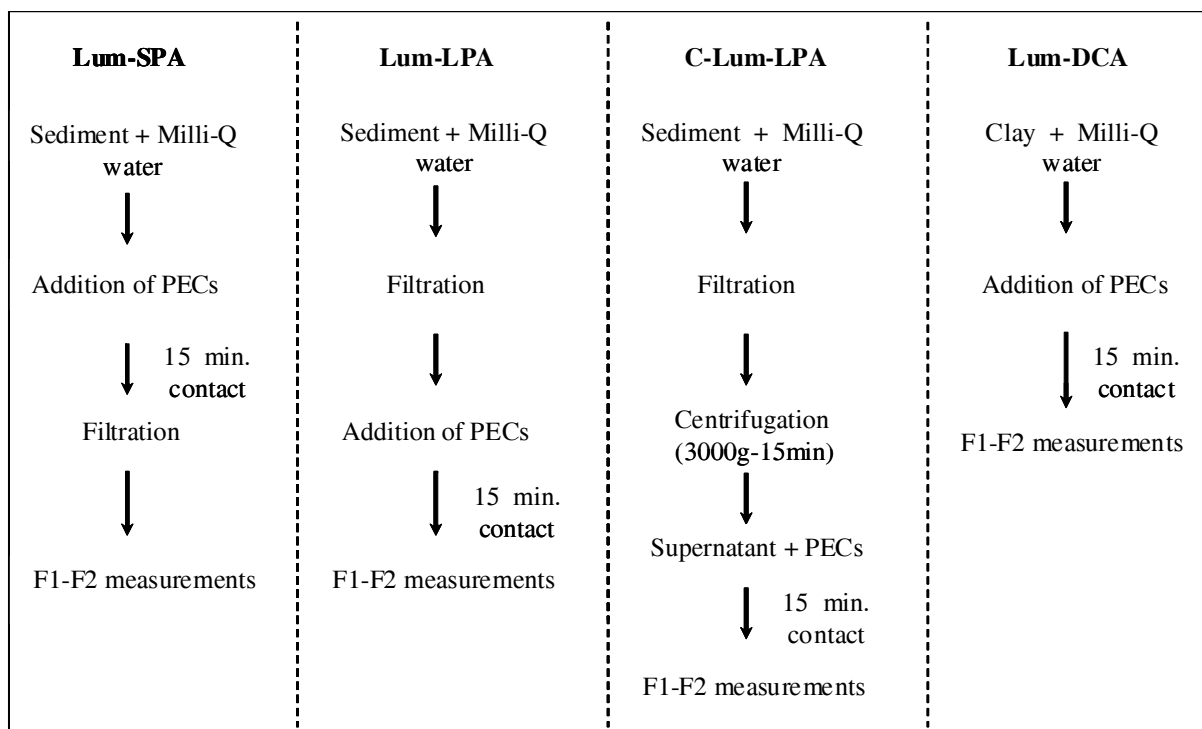
were based on different amounts of clay dissolved in 2 mL of Milli-Q water. The Lum-SPA and Lum-LPA were performed with the same protocol and conditions described in sections 2.2a and 2.2b (figure1).

Another test was conducted with the two types of clays in the same conditions but with copper added as CuSO_4 (0.6 mg L^{-1}). The Lum-SPA, Lum-LPA and Lum-DCA, were also conducted in triplicates and measurements were made as above.

d) Chlorophyll *a* measurements

They were carried out from filtrates of the Lum-SPA after exposure of PECs to both clays (conditions in table1). Filtrates were diluted (1:2) with methanol (90%). Before measurements, to avoid interferences caused by particles, extracts were centrifuged at 8,000 g during 15 minutes. Absorbance was read at 664, 647 and 630 nm with a spectrophotometer (UVIKON 933), and a reading was also performed at 750 nm to correct the interference by turbidity. The concentrations of chlorophyll *a* were calculated according to the equation of Jeffrey and Humphrey (1975).

Figure 24: Experimental procedure Luminotox assays



e) Microtox® Solid Phase Assay (Mic-SPA)

This assay was undertaken according to the protocol proposed by Doe et al. (2005). The luminescent bacteria, recently renamed *Aliivibrio fischeri* (Urbanczyk et al., 2007), were regenerated with 1 mL of reconstitution solution and placed in the reagent well of the Microtox® analyzer for at least one hour. During this time, sediment dilutions were prepared from a general dilution constituted by 7 g of wet sediment with 35 ml 2% sodium chloride (NaCl), this solution was mixed on a magnetic stirrer for 10 minutes. From this solution, 1:2 dilutions were prepared in borosilicate tubes in which 1.5 mL of 2% sodium chloride (NaCl) was previously placed. Bacteria were exposed to each dilution of sediment for 20 minutes, after this time a column filter was pushed in and 0.5 ml of supernatant containing exposed bacteria was pipetted and transferred to a new borosilicate tube in the Microtox® Analyzer 500 where light output was measured after 5 minutes.

The IC50 correction proposed by Burga-Pérez et al. (2012) was applied to the results of the MSPA resulting in a corrected IC50 for every tested sample.

f) Data analysis

Fifteen minute IC50s, IC20s and their 95% confidence intervals were calculated with the REGTOX EV7.0 package (http://www.normalesup.org/~vindimian/fr_index.html) and expressed in g of dry weight sediment per liter (g/L). Pearson correlation coefficient was calculated to analyze the correlation between the physical-chemical parameters of sediment and the IC50 values obtained in the Lum-SPA, Lum-LPA, Mic-SPA, and Mic-LPA. Spearman's rank correlation coefficient analysis was performed to determine significant rank differences between series of data.

ANOVA and Tukey *post-hoc* tests were conducted to analyze any differences between the treatments in the assays with clays with and without CuSO₄ (0.6 mg.L⁻¹). Normality and variance homogeneity were checked before ANOVA testing. Significance between treatments was confirmed when the p of the test was lower than 0.01 or 0.05.

3.4.1.4 Results and discussion

a) Lum-SPA and Lum-LPA with natural sediments

In the Lum-SPA, thylakoids are exposed to contaminants either adsorbed on particles or dissolved in the experimental medium, whereas in the Lum-LPA they are exposed to dissolved contaminants, but also to fine particles that can pass through the filter.

Results of the 12 natural sediments tested are presented in the Table 2. Sediments were ranked according to their IC₅₀ values for the Lum-SPA (series 1) and the Lum-LPA (series 2). According to the Spearman's rank correlation analysis, there was no significant difference between two methodologies ($p < 0.05$). Examples of concentration response curves for the Lum-SPA and Lum-LPA are presented in the Fig. 2. Curiously, it was observed that in the Lum-LPA, the percentages of inhibition were always higher than those observed in the Lum-SPA (Fig. 2). The IC₅₀s of series 1 were significantly higher (Unilateral paired Wilcoxon test, $p < 0.01$) than those of series 2. There was a significant correlation between Lum-SPA and Lum-LPA results ($r=0.82$). Boucher et al. (2005) indicated that PECs are very sensitive to pH and noted that the test should be performed at a pH between 6.5 and 7.8. For both tests, pHs of bulk and leachate solutions fell in this range, the differences between the two series have to be explained by other factor(s) (see Section 3.2).

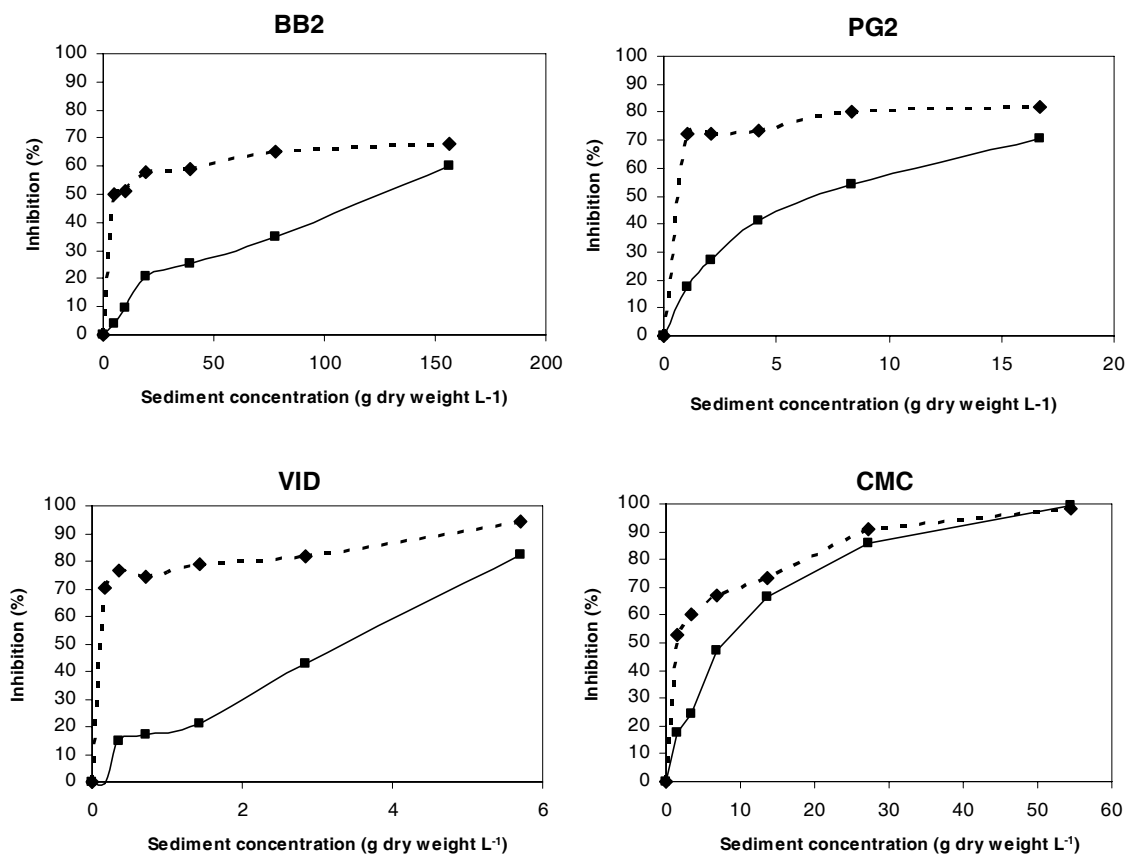


Figure 25: Examples of concentration-response curves for Lum-SPA (solid lines) and Lum-LPA (dotted lines). Responses are expressed in terms of percentages of inhibition. Note the different scales on the x-axis

Tableau 9: Lum-SPA and Lum-LPA results for 12 natural sediments samples (expressed in g dry weight L⁻¹)

Sediment	LuminoTox assays IC ₅₀ (g dry weight L ⁻¹)					
	Lum-SPA	Confidence intervals 95%		Lum-LPA	Confidence intervals 95%	
BB2	121	104	143	4.9	3.1	6.8
PG2	6.3	5.8	6.9	0.03	0.01	0.1
LCB	46.5	41.9	51.7	22.0	16.4	28.8
CMA	13.1	11.0	15.3	1.2	0.1	2.8
CMC	7.8	6.8	8.8	1.6	1.1	2.2
VID	3.2	2.8	3.6	0.13	0.12	0.15
MOR	6.5	4.6	8.9	2.8	2.6	3.0
MAR	4.7	4.3	5.1	0.2	0.01	0.46
PG3	11.9	10.3	13.8	0.8	0.5	0.9
BIO	87.0	80.1	94.1	51.8	29.8	94.5
AMO	18.7	17.0	20.2	11.1	9.4	12.7
NEY	125.5	101.7	152.7	81.8	55.1	126.8

With Lum-SPA, we found a significant inverse correlation between percentages of silt + clay and IC50s (Fig.3). Dellamatrice et al. (2006) also found an inverse correlation between percentages of kaolin and IC50s when testing different mixtures of kaolin and sand, but they did not go further because sediment granulometry was not available. Results presented in Fig. 3 showed that the presence of silt and clay in natural sediments can influence the Lum-SPA responses. The same kind of responses was also found in the MSPA by Burga-Pérez et al. (2012) and other authors cited therein.

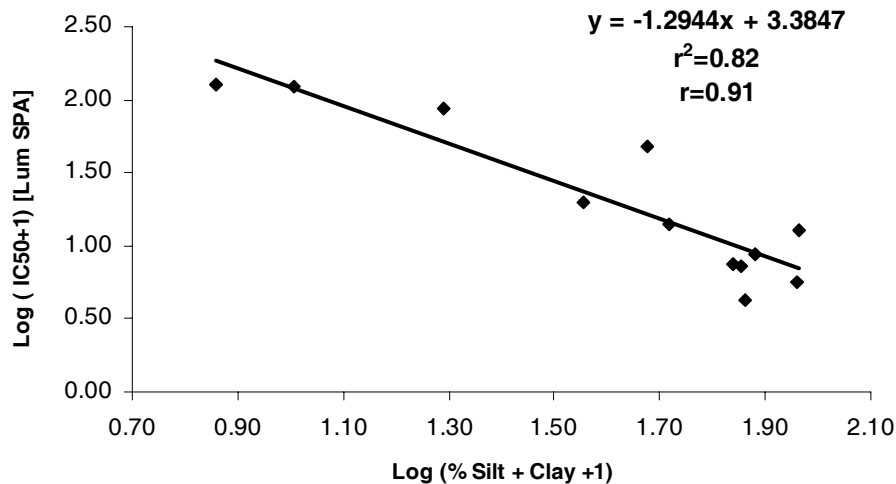


Figure 26: Plot of IC50s obtained with Lum-SPA in relation to percentage of silt + clay for the 12 samples tested

Out of the twelve tested sediments, we selected (on the basis of their low total metal and PAH contents) two sub-groups: one comprised six samples (considered as references sites) and another one six contaminated samples. Analyses of sediments from uncontaminated and contaminated sites supported the model of inverse relationships between Lum-SPA IC50s and sediment silt-clay concentrations (See Figure-S2). Moreover, we found that there was no significant difference between the slopes of least square lines for both groups of sediments (ANCOVA test, $p = 0.85$). Thus, the presence of contaminants did not significantly change the genuine effect of fines on the PECs response.

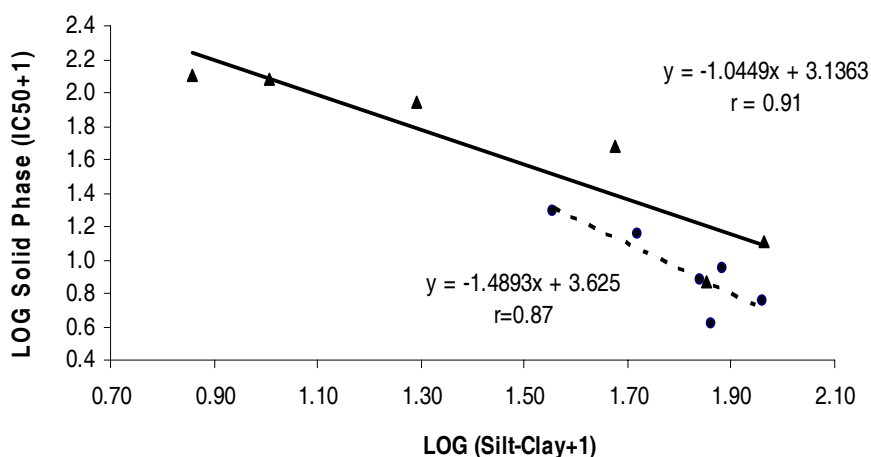


Figure 27: Plot of IC50s for Lum-SPA in relation to percentages of silt + clay (the dotted lines correspond to the samples considered as polluted sediments and the solid line corresponds to samples considered as reference samples)

It has to be noted that there was also a significant inverse correlation between the percentages of organic matter and IC50s (Pearson correlation analysis, $r = -0.67$; data not show). Such a significant inverse correlation has been already reported in the MSPA by Burga Perez et al. (2012) using natural freshwater sediments. Organic matter, such as fulvic and humic acids (HAs), are able to bind a variety of metals, decreasing their bioavailability (Koukal et al., 2003; Tsiridis et al., 2006), but HAs can also affect the electron transfer chain in thylakoids (Pflumacher et al., 2005). Why is the leachate phase assay more sensitive than the solid phase assay?

In order to identify the cause of the high ecotoxicity found in the Lum-LPA, we tested the supernatant of the liquid phase after centrifugation (3,000 g). In this case, responses of many supernatants did not reach 50% of inhibition, and thus results were expressed as IC20s. Results of the 12 samples are presented in Table 2. For 8 samples, where IC20s were not reached we chose to report inhibition observed at the highest sediment concentration tested. For all samples, the C-Lum-LPA (supernatant) IC20s were higher than the Lum-LPA IC20s.

Tableau 10: Lum-LPA supernatant and Lum-LPA results (expressed in g dry weight L⁻¹) for 12 natural sediments samples (n.a = not applicable)

Sediment	C-Lum-LPA		Lum-LPA	
	IC 20 (g dry weight L ⁻¹)	Confidence intervals (95%)	IC 20 (g dry weight L ⁻¹)	Confidence intervals (95%)
BB2	>156.4	n.a.	0.08	(0.01 - 0.2)
PG2	>16.7	n.a.	9.13E-05	(3E-13 - 0.001)
LCB	>33.5	n.a.	4.45	(2.53 - 7.03)
CMA	>21.95	n.a.	0.03	(1.37E-06- 0.17)
CMC	>12	n.a.	0.19	(0.07- 0.35)
VID	1.18	(0.99 - 1.39)	0.08	(0.06 - 0.12)
MOR	>175.2	n.a.	1.30	(1.09 -1.48)
MAR	1.03	(0.24 - 1.93)	0.01	(0.003 - 0.037)
PG3	>31.40	n.a.	0.37	(0.03 - 0.63)
BIO	11.81	(8.79 - 14.77)	0.86	(0.02 - 2.46)
AMO	20.66	(9.38 - 30.20)	5.00	(3.70 - 6.34)
NEY	>134	n.a.	3.51	(1.34 - 6.82)

For all samples, the Lum-LPA supernatant IC20s were higher than the Lum-LPA IC20s. Hence, the ecotoxicity observed in the Lum-LPA seems to be due to the presence of fine particles which passed through the filter (and were eliminated by centrifugation). The explanation of the sensitivity of the Lum-LPA to these particles could be due to the nature of particles in the tested sediments which could be bound to pollutants. To confirm this hypothesis, we tested the sensitivity of PECs to fine particles of two kinds of clay materials (see Section 3.3).

Effects of kaolinite and bentonite

To check the effects of fines two kinds of clay materials were selected in order to explore the influence of specific surface areas of particles, they were tested using Lum-SPA, Lum-LPA and also Lum-DCA. The latter protocol was carried out to check whether selected clay materials induce different degree of PSII inhibition. It was found that the inhibition was significantly weaker than in the Lum-SPA and Lum-LPA (see Figure-S3). In the Lum-

DCA, the PSII inhibition was significantly higher with bentonite than with kaolinite ($p < 0.05$) whereas in the Lum-SPA, it was the opposite. Thus, these differences between both methods could be related to the clay's adsorption capacity to PECs.

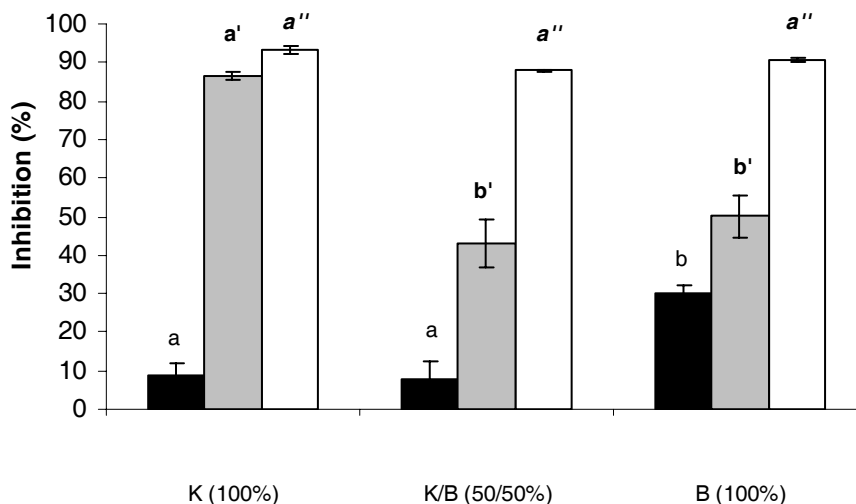


Figure 28: Percentage of inhibition observed in Lum-DCA, Lum-SPA and Lum-LPA (black, grey and white bars, respectively) for 100% bentonite, 50/50 (w/w) bentonite/kaolinite and 100% kaolinite assays (n=3)

To test the hypothesis that there was a differential adsorption of PECs between the tested clays, we performed a measurement of chlorophyll a in the filtrate in the same conditions that PECs were exposed with clays in the Lum-SPA. Results confirmed (figure 4) that : i) both clays adsorb PECs and ii) kaolinite adsorbed PECs about 2.5-fold more than bentonite. Such a difference can be related to i) the different composition of both clays, ii) the different sedimentation rates of both clays and also iii) to different capacities of electron transport inhibition, then causing a decrease in the photosynthetic efficiency of thylakoids. In the Lum-LPA, we observed a very high but constant PSII inhibition whatever the treatment. These results confirmed that, in the filtrate of the Lum-LPA, (i) there were some fine particles that passed through filters and (ii) PECs are very sensitive to these fine particles.

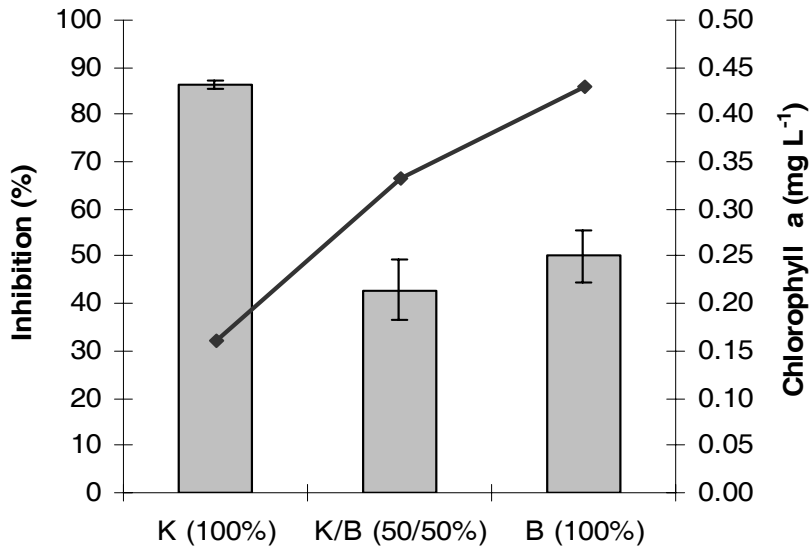


Figure 29: Percentages of inhibition observed in Lum-SPA for 100% bentonite, 50/50 (w/w) bentonite/kaolinite and 100 % kaolinite assays (n=3) and the corresponding chlorophyll a concentrations found in filtrates (n=3)

The same trends were observed in presence (Figure-S4) and in absence of copper: higher inhibition in the Lum-LPA, decrease of inhibition when percentage of kaolinite increases in the Lum-DCA, augmentation of inhibition when percentage of kaolinite increases in the Lum-SPA. It was also observed that the percentage of inhibition diminished when copper was mixed with clays, except when the Lum-LPA is applied. In the Lum-DCA, this decrease was more evident with kaolinite (100%) ($p < 0.01$). Both clays have the capacity to remove copper ions by an adsorption process (Yavuz et al., 2003, Veli and Alyüz, 2006) and decrease bioavailable copper, but the clays can also cause a decrease in the photosynthetic efficiency of thylakoids.

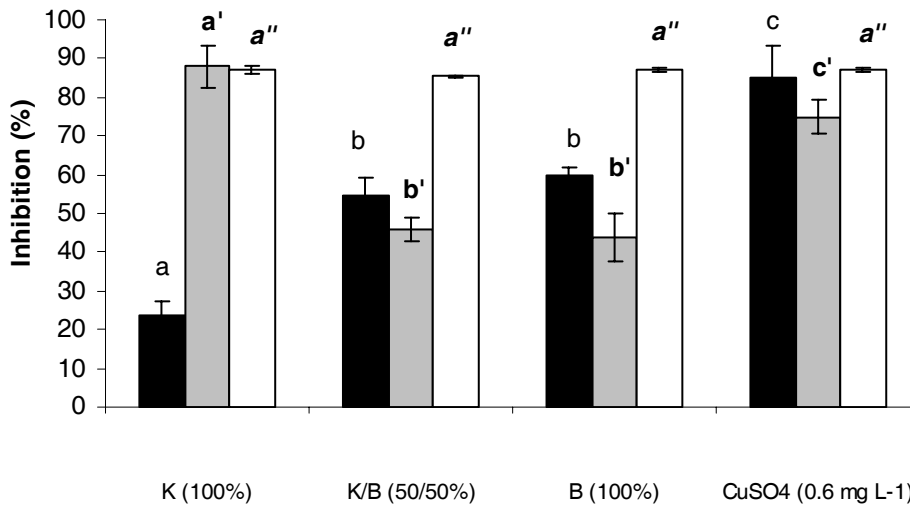


Figure 30: Percentage of inhibition observed in Lum-DCA, Lum-SPA and Lum-LPA (black, grey and white bars, respectively) for 100% bentonite, 50/50 (w/w) bentonite/kaolinite and 100 % kaolinite assays in presence of copper (n=3) and for copper sulphate alone (n=3).

Comparison of Lum-SPA with the Mic-SPA

Both the Lum-SPA and MSPA have similar methodologies and have been demonstrated to be sensitive to fines (Ringwood et al. 1997, Dellamatrice et al. 2006). Regarding the biais caused by fines particules, we proposed in a previous work (Burga-Pérez et al. 2012) a correction for Mic-SPA IC50 values, allowing to obtain unbiased estimates of sediment ecotoxicity. In this study, we found a significant correlation between Lum-SPA and Mic-SPA corrected IC50s (Fig.5). These results seem to indicate that the Lum-SPA is able to discriminate the ecotoxicity effects of sediments despite the potential bias caused by the fine particles.

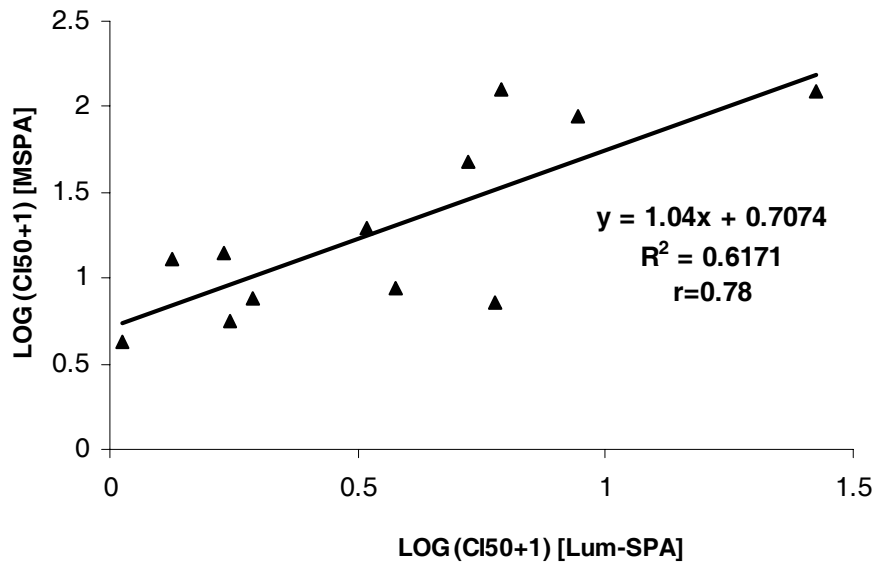


Figure 31: Plot of Lum-SPA IC50s and Mic-SPA IC50s for the tested samples

3.4.1.5 Conclusion

It can be concluded that whatever metals (e.g. copper) are present or not, there is a clear inhibiting effect of fines in filtered or unfiltered experimental media. Results obtained in the Lum-LPA without copper was similar to those obtained in the Lum-LPA with copper, so we can presume that the effect observed is mainly caused by the fine mineral particles of clay. The bentonite/kaolinite ratio influences the observed percentage of inhibition. This study reveals the bias that can occur with quality and quantity of fine particles in the Lum-SPA.

The Lum-LPA performed to assess the leachate phase of tested sediments gives a response influenced by the finest particles that passed through the filter. In the absence of precise knowledge on process(es) that could explain marked differences between Lum-SPA and Lum-LPA results, it can be scientifically hazardous to use the Lum-LPA as a test for evaluating the leachate phase of sediments owing to data interpretation issues.

3.4.1.6 References

- AFNOR 2000 Caractérisation des boues – Détermination de la perte au feu de la matière sèche. Norme NF EN 12879. AFNOR (Ed.), in french
- Bellemare, F., Rouette, M.-E., Lorrain, L., Perron, É., Boucher, N., 2006. Combined use of photosynthetic enzyme complexes and microalgal photosynthetic systems for rapid screening of wastewater toxicity. *Environmental Toxicology* 21, 445-449.
- Benton, M.J., Malott, M.L., Knight, S.S., Cooper, C.M., Benson, W.H., 1995. Influence of sediment composition on apparent toxicity in a solid-phase test using bioluminescent bacteria. *Environ. Toxicol. Chem.* 14, 411-414.
- Boucher, N., Carpentier, R., 1999. Hg²⁺, Cu²⁺ and Pb²⁺ induced changes in Photosystem II photochemical yield and energy storage in isolated thylakoid membranes: a study using simultaneous fluorescence and photoacoustic measurements. *Photosynth. Res.* 59,164-174.
- Boucher, N., Lorrain, L., Rouette, ME., Perron, E., Déziel, N., Tessier, L., Bellemare, F., 2005. Rapid Testing of Toxic Chemicals. *American Laboratory*, 37, 34-37.
- Burga-Pérez Pérez, KF., Charlatchka, R., Sahli, L., Férard, JF., 2012. New methodological improvements in the Microtox® Solid Phase Assay. *Chemosphere* 86, 105-110.
- Cedeno-Maldonado, A., Swader, JA., Heath, RL., 1972. The copper ion as an inhibitor of photosynthetic electron transport in isolated chloroplasts. *Plant Physiol.* 50, 698-701.
- Dellamatrice, P.M., Monteiro, R.T.R., Blaise, C., Slabbert, J.L., Gagné, F., Alleau, S., 2006. Toxicity assessment of reference and natural freshwater sediments with the luminotox assay. *Environmental Toxicology* 21, 395-402.
- Dewez, D., Boucher, N., Bellemare, F., Popovic, R., 2009. Use of different fluorometric systems in the determination of fluorescence parameters from spinach thylakoid membranes being exposed to atrazine and copper. *Toxicological & Environmental Chemistry* 89, 655-664.
- Doe, K., Jackman, P., Scroggins, R., McLeay, D., Wohlgeschaffen, G., 2005. Solid-phase test for sediment toxicity using the luminescent bacterium *Vibrio fischeri*, in: Blaise, C., Férard, J.F. (Eds.), *Small-scale freshwater toxicity investigations (Volume 1)*, Springer, Dordrecht, pp. 107-136.
- Jeffrey, S.W., Humphrey, G.F., 1975. New spectrophotometric equations for determining chlorophyll a, b, c1 and c2 in higher plants, algae and natural phytoplankton. *Biochem. Physiol. Pflanzen.* Bd. 167, 191-194.
- Koukal, B., Rossé, P., Reinhardt, A., Ferrari, B., Wilkonson, K., Loizeau, J. L., Dominik, J., 2007. Effect of *Pseudokirchneriella subcapitata* (Chlorophyceae) exudates on metal toxicity and colloid aggregation. *Water Research* 41, 63-70.
- Krause, G., Weis, E., 1984. Chlorophyll fluorescence as a tool in plant physiology. *Photosynthesis Research* 5, 139-157.
- Laberge, D., Chartrand, J., Rouillon, R., Carpentier, R., 1999. In vitro phytotoxicity screening test using immobilized spinach thylakoid. *Env. Toxicol. Chem.* 18, 2851-2858.
- Loizeau, J.-L., Arbouille, D., Santiago, S., Vernet, J.P., 1994. Evaluation of a wide range laser diffraction grain size analyser for use with sediments. *Sedimentology* 41, 353-361
- Padua, M., Cavaco, A.M., Aubert, S., Bligny R., Casimiro, A., 2010. Effects of copper on the photosynthesis of intact chloroplasts: interaction with manganese. *Physiologia Plantarum* 138, 301-311.
- Pflugmacher, S., Pietsch, C., Rieger, W., Steinberg C.E., 2006. Dissolved natural organic matter (NOM) impacts photosynthetic oxygen production and electron transport in coontail *Ceratophyllum demersum*. *Sci. Total Environ.* 357, 169-175

- Quintino, V., Picado, A.M., Rodrigues, A.M., Mendonça, E., Costa, M.H., Bordalo Costa, M., Lindgaard-Jorgensen, P., Pearson, T.H., 1995. Sediment chemistry - infaunal community structure in a southern European estuary related to solid-phase microtox toxicity testing. *Neth. J. Aqu. Ecol.* 29, 427-436
- Renganathan, M., Bose, S., 1990, Inhibition of photosystem II activity by Cu⁺⁺ ion. Choice of buffer and reagent is critical. *Photosynthesis Research*, 23, 95-99.
- Ringwood, A.H., Delorenzo, M.E., Ross, P.E., Holland, A.F., 1997. Interpretation of MicrotoxTM solid-phase toxicity tests: The effects of sediment composition. *Environ. Toxicol. Chem.* 16, 1135-1140
- Rouillon, R., Sole, M., Carpentier, R., Marty, J., 1995. Immobilization of thylakoids in polyvinylalcohol for the detection of herbicides. *Sensors and Actuators B: Chemical* 27, 477-479
- Tsiridisa, V., Petala, M., Samaras, P., Hadjispyrou, S., Sakellaropoulos, G., Kungolos A., 2006. Interactive toxic effects of heavy metals and humic acids on *Vibrio fischeri*. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 63, 158-167.
- Urbanczyk, H., Ast, J.C., Higgins, M.J., Carson, J., Dunlap, P.V., 2007, Reclassification of *Vibrio fischeri*, *Vibrio logei*, *Vibrio salmonicida* and *Vibrio wodanis* as *Aliivibrio fischeri* gen. nov., comb. nov., *Aliivibrio logei* comb. nov., *Aliivibrio salmonicida* comb. nov. and *Aliivibrio wodanis* comb. Nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 57, 2823-2829.
- Veli, S., Alyüz, B., 2007. Adsorption of copper and zinc from aqueous solutions by using natural clay. *Journal of Hazardous Materials* 149, 226-233.
- Yavuz, O., Altunkaynak, Y., Güzel, 2003. Removal of copper, nickel, cobalt and manganese from aqueous solution by kaolinite. *Water Research* 37, 948-952.

3.4.2 Evaluation ecotoxicologique des 21 sédiments testés avec les tests Lum-SPA et Lum-LPA.

Les résultats du test Lum-SPA et Lum-LPA sont présentés dans le tableau 11, pour 21 échantillons testés. Les valeurs de CI50 calculées sont comprises entre 3,19 et 120,6 g L⁻¹ pour le test Lum-SPA et entre 0,0001 et 81,81g L⁻¹ pour le test Lum-LPA.

Tableau 11: Résultats des deux variantes du test Luminotox pour les 21 sédiments testés (CI50 g sed sec L⁻¹ de milieu)

Sédiment	Code	LSPA			LLPA			
		CI 50	Intervalle de confiance 95%		CI 50	Intervalle de confiance 95%		
Sédiments de la 1ère campagne	1	BB	120,6	103,6	142,5	4,90	3,10	6,8
	2	PG2	6,3	5,78	6,86	0,03	0,01	0,1
	3	LCB	46,5	41,9	51,7	22,03	16,42	28,8
	4	CMA	13,11	11,02	15,32	1,18	0,09	2,82
	5	CMC	7,82	6,758	8,84	1,59	1,05	2,17
Sédiments de la 2ème campagne	6	VID	3,19	3,86	5,01	0,13	0,12	0,15
	7	MOR	6,53	4,55	8,90	2,80	2,62	2,96
	8	MAR	4,67	4,67	5,06	0,20	0,16	0,46
	9	IBA	14,7	12,30	17,60	5,35	4,46	6,3
	10	CAJ	16,8	14,50	19,10	1,27	1,25	1,33
Sédiment de la 3ème campagne	11	PG3	11,9	10,30	13,80	0,75	0,51	0,93
	12	LG2	31,04	24,61	37,12	> 58 *		
	13	BIO	87,02	80,08	94,05	51,81	29,83	94,52
	14	PG5	48,67	43,73	53,88	38,80	24,52	58,94
	15	BIE	25,52	22,89	28,63	1,53	0,67	2,32
	16	AMO	18,66	16,97	20,15	11,11	9,40	12,70
Sédiment JURA	17	NEY	125,5	101,7	152,7	81,81	55,06	126,79
	18	LAV	52,5	40,4	68,3	3,34	0,08	7,81
	19	ETA	30,11	26,24	34,56	4,96	2,30	7,38
	20	CHA	14,19	11,94	16,38	0,0001	0,00002	0,03
	21	SIR	69,29	60,08	77,51	40,05	32,96	47,91

* CI 50 et intervalles de confiance non calculables (la valeur indiquée est donc choisie arbitrairement comme la plus forte concentration testée)

Le classement des sédiments du plus écotoxique au moins écotoxique s'établit pour le test Lum-SPA de la façon suivante :

VID(6) > MAR(8) > PG2(2) > MOR(7) > CMC(5) > PG3(11) > CMA(4) > CHA(20) > IBA(9) > CAJ(10) > AMO(16) > BIE (15) > ETA(19) > LG2 (12) > LCB(3) > PG5(14) > LAV(18) > SIR(21) > BIO(13) > BB2(1) > NEY(17)

Alors que le classement pour le test Lum-LPA a été le suivant :

CHA(20) > VID(6) = PG2(2) > MAR(8) > CMA (4) > CAJ(10) > BIE (15) > CMC(5) > MOR(7) > LAV(18) > BB2(1) > ETA(19) > IBA(9) > LG2 (12) > AMO(16) > LCB(3) > PG5(14) > SIR(21) > BIO(13) > NEY(17)

Des corrélations de Pearson entre les deux variantes du test Luminotox ont été réalisées révélant que les résultats obtenus avec les deux tests sont significativement corrélés ($r=0,77$, $p<0,001$) (figure 32). Toutefois, il apparaît que, contrairement aux tests MSPA et MLPA qui suivent la même approche, les valeurs de CI50 du test Lum-SPA sont systématiquement plus faibles que celles du test Lum-LPA. Comme mentionné dans le § 3.4.1, cette différence serait due aux particules fines qui se sont retrouvées dans le filtrat après la filtration et au sujet desquelles nous avons prouvé que les CEP sont très sensibles aux particules fines.

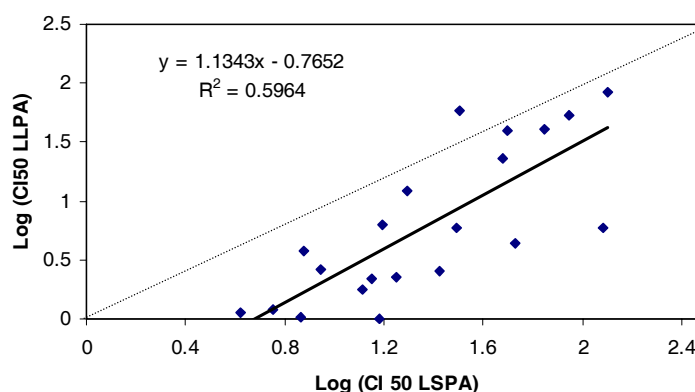


Figure 32: Corrélation observée entre les CI50 obtenues à l'aide des deux variantes des tests Luminotox ($p < 0,001$) pour 21 sédiments testés. La droite en trait plein correspond à la droite de régression, la droite en tirets correspond à la 1ère bissectrice

Remarque : pour le sédiment N°12, la valeur utilisée (58) est une valeur par défaut

A partir des résultats de CI_{50} pour le Lum-SPA, nous avons réalisé une classification ascendante hiérarchisée (distance euclidienne et critère d'agrégation de Ward) des sédiments. La figure 33 présente les 4 groupes des sédiments formés à partir de cette méthode. Les groupes 1 et 2 correspondent aux sédiments les moins écotoxiques, ils sont constitués des sédiments les moins contaminés ($QPEC_m < 0,1$) à savoir BB, NEY, BIO et SIR, tandis que les groupes 3 et 4 correspondent aux sédiments les plus contaminés ($QPEC_m > 0,5$). Le test a également présenté une sensibilité élevée pour le sédiment le plus contaminé (VID).

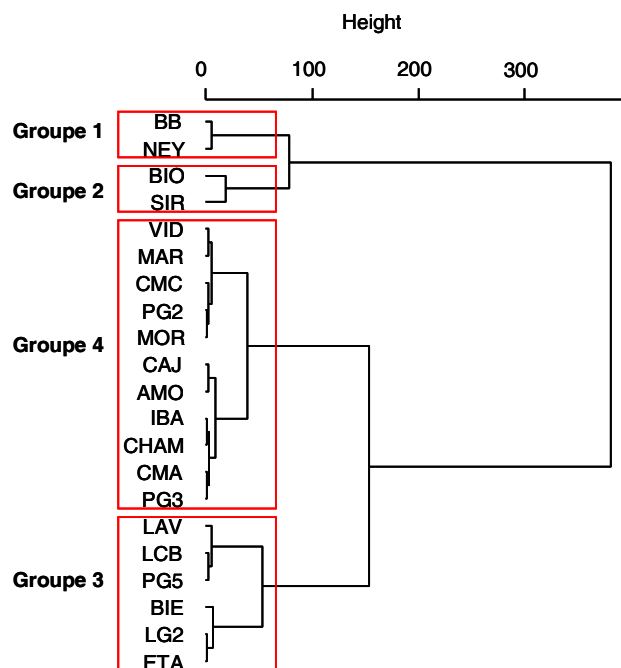


Figure 33: Classification ascendante hiérarchisée des sédiments basée sur les résultats du Lum-SPA (distance euclidienne et critère d'agrégation de Ward)

Les résultats du Lum-SPA de 17 échantillons (sans considérer donc les résultats des sédiments du JURA, due à une absence des données physico-chimiques) ont présenté une relation significative avec certains contaminants mesurés dans les sédiments, contrairement aux résultats du test MSPA où nous n'avons pas trouvé des corrélations significatives avec des paramètres chimiques des sédiments. Les analyses de corrélation de Pearson ont révélé des relations significatives entre les CI_{50} du test Lum-SPA et les limons ($r = -0,79$), le sable ($r = 0,79$), la matière organique ($r = -0,56$), les métaux totaux

comme le chrome ($r=-0,72$), le fer ($r=-0,76$), le cobalt ($r=-0,70$), le nickel ($r=-0,77$), le manganèse ($r=-0,53$), les HAP totaux ($r=-0,58$) et quelques HAP spécifique comme le Benzo-a-anthracène ($r=-0,54$), le Benzo-b-fluoranthène ($r=-0,55$), le Benzo-ghi-pérylène ($r=-0,62$), le Fluoranthène ($r=-0,53$), l'Indéno-1, 2, 3 - cd-pyrène ($r=-0,51$), et le Chrysène ($r=-0,53$).

La granulométrie des sédiments et la quantité de matière organique sont des facteurs qui peuvent jouer un rôle important dans la biodisponibilité des polluants. Comme nous l'avons déjà mentionné dans le chapitre précédant, les particules fines peuvent contribuer à la mobilité et la disponibilité des métaux dans les sédiments (Förstner 1983, Burton 1991, Lin *et al.* 2003). Les HAP, qui sont faiblement solubles dans l'eau, s'associent très facilement aux particules ainsi qu'à la matière organique (Evans *et al.* 1990). En s'appuyant sur les corrélations significatives trouvées entre les résultats obtenus avec le Lum-SPA et certains paramètres chimiques (cf. ci-dessus), il est raisonnable de penser que certains de ces contaminants sont biodisponibles et peuvent se trouver dans la phase dissoute ou attachés aux particules de sédiments et ainsi affecter la chaîne de transport des électrons causant une diminution de l'efficacité photosynthétique des thylakoïdes.

Par ailleurs, la corrélation significative entre les valeurs de CI50 du Lum-SPA et le pourcentage des particules fines et la matière organique pourraient aussi être liée à un effet de masquage de l'écotoxicité réelle des sédiments naturels comme il a déjà été noté dans le § 3.4.1, où nous avons mis en évidence la sensibilité des CEP aux particules fines des sédiments et de deux types des argiles. Par contre, le biais potentiel dû à la matière organique, même si c'est un facteur qu'on ne peut négliger, n'a pas été étudié de manière approfondie dans cette étude. Les substances humiques dans la matière organique peuvent interférer dans les réactions de transport des électrons des organismes. Cette hypothèse a été validée chez certaines plantes et cyanobactéries exposées à différentes substances humiques (Pflugmacher *et al.* 2006). Paul *et al.* (2003) ont trouvé que les quinones qui se trouvent dans les substances humiques testées pourraient être responsables de l'inhibition du transport des électrons (>80%) chez certaines espèces de macrophytes aquatiques. Les substances humiques peuvent se lier avec les quinones du PS II et donc exercer un blocage dans le transfert des électrons (Pflugmacher *et al.* 2006).

Une corrélation significative avec les 21 échantillons testés avec le MSPA et Lum-SPA a été trouvée ($r = 0,58$, $p = 0,0049$) (figure 34). Dellamatrice *et al.* (2006) ont également signalé une corrélation significative entre les deux tests dans leur étude avec des sédiments de référence. Cette corrélation ne signifie pas que les tests donnent toujours les mêmes résultats, car les deux tests peuvent réagir différemment selon le sédiment testé, surtout s'il s'agit des sédiments naturels. Les polluants peuvent se lier à des sites différents au niveau des thylakoïdes provoquant une diminution du signal de fluorescence (Krause et Weis 1984, Boucher *et al.* 1999, Laberge *et al.* 1999). Une partie de l'écotoxicité observée avec le MSPA pourrait être attribuée à une série de processus différents entre les polluants et les cellules (Fulladosa *et al.* 2005).

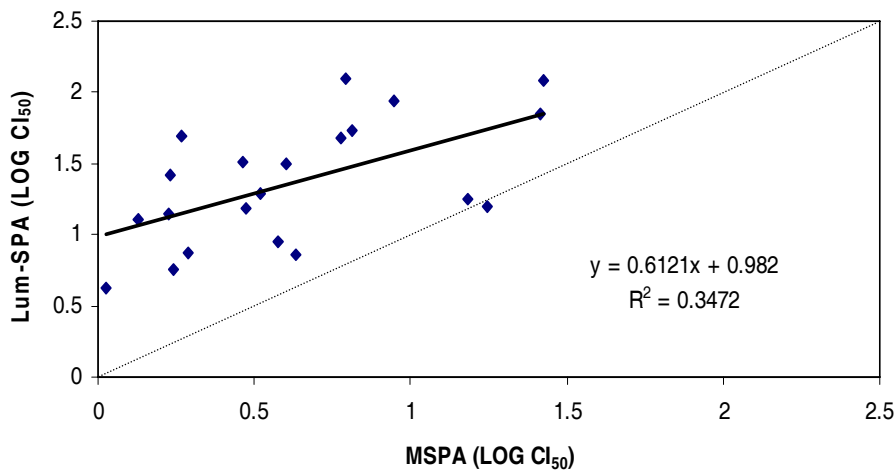


Figure 34: Corrélation observée entre les CI50 obtenues avec le MSPA et Lum-SPA pour 21 sédiments testés. La droite en trait plein correspond à la droite des moindres carrés, la droite en tirets correspond à la 1ère bissectrice

Remarque : pour le sédiment N°12, la valeur utilisée (58) est une valeur par défaut

3.5 Conclusions et perspectives

Notre travail a permis de mettre en évidence la sensibilité du test Luminotox aux particules fines de sédiments naturels ou de mélange d'argiles. Ce biais a été plus marqué quand nous avons testé les sédiments et les mélanges d'argiles avec le Lum-LPA. Un autre biais potentiel qui n'a pas été évalué au cours de ce travail est la matière organique. Ce paramètre pourrait aussi modifier la réponse du test due à que certains composants de la matière organique, comme les substances humiques, pourraient interagir avec les enzymes photosynthétiques en exerçant un blocage dans le transport des électrons. Des recherches pourraient être menées dans cette direction, il serait intéressant par exemple de tester les réponses des CEP à différentes substances humiques pour évaluer sa sensibilité à ces composants. Comme mentionné au chapitre 2, pour corriger l'effet de la matière organique dans les résultats du test il aurait été intéressant de faire des dosages des acides humiques et fulviques avec la méthode de Quentel et Montserrat (2011) et construire ainsi un modèle qui met en relation l'efficacité photosynthétique et les résultats de dosage des substances humiques et fulviques.

Le Lum-SPA, malgré des biais potentiels, discrimine bien les échantillons très contaminés et peu contaminés, nous avons pu obtenir un profil d'écotoxicité pour tous les échantillons testés avec cette méthode. Avec l'information obtenue à partir des analyses physico-chimiques des sédiments sur les sédiments bruts, nous n'avons pas été en mesure d'établir quel(s) polluant(s) est (sont) responsable(s) des effets écotoxiques observés. Par ailleurs, l'appareil LuminoTox ne permet pas d'identifier le site d'action du toxique, toutefois, les résultats obtenus par Bellemare *et al.* (2006) permettent d'émettre l'hypothèse que les polluants réagissent sur les premiers constituants de la chaîne de transport des électrons. Des tests pourraient aussi être conduits avec d'autres types de systèmes comme le PAM ou le PEA en parallèle avec le LuminoTox pour tester la sensibilité des systèmes quand on expose des CEP aux sédiments naturels.

**Chapitre 4 : Evaluation de l'écotoxicité
des sédiments à l'aide de l'algue
*Pseudokirchneriella subcapitata***

4.1 Synthèse bibliographique

4.1.1 Les algues comme bioindicateur de la qualité des milieux

Les essais biologiques utilisant des algues sont utilisés depuis des décennies dans différents contextes tels que l'évaluation de l'écotoxicité de produits chimiques, de matrices environnementales complexes (effluents, éluviats de boues, de sols, de déchets,...) (Blaise et Couture 1984, Dorsey *et al.* 1989, Abalde *et al.* 1995, Källqvist *et al.* 2008). En tant que producteurs primaires, les algues planctoniques sont un élément clé des chaînes alimentaires dans les écosystèmes aquatiques. Elles sont consommées par les organismes zooplanctoniques, qui sont ensuite consommés par d'autres invertébrés, des poissons ou des oiseaux. En raison de leur importance écologique et de leur sensibilité à de nombreuses substances, ces organismes sont inclus dans de nombreux systèmes d'évaluation des risques (Giesy et Hoke 1989, Pandard *et al.* 2006, Nam et An 2010, Lors *et al.* 2011).

Les premières utilisations des microalgues datent du début des années 1970 où il s'agissait d'évaluer le potentiel d'eutrophisation des eaux superficielles, mais très vite elles ont aussi été utilisées pour évaluer l'écotoxicité des produits chimiques et des échantillons environnementaux (Miller *et al.* 1976). D'abord réalisés en erlenmeyers (Chiaudani et Vighi 1978, Fargasova 1998, Kühn et Pattard 1990), ils sont aussi réalisés à présent en microplaques (Blaise *et al.* 1986, Blaise et Vasseur, 2005). Ces bioessais se basent sur des tests d'inhibition de la croissance algale (ISO 8692, 2012) ou sur des tests d'inhibition d'activités enzymatiques telles que l'activité estérase (Franklin *et al.* 2001, Regel *et al.* 2002). Les espèces les plus utilisées sont, entre autres, des algues d'eau douce comme *Pseudokirchneriella subcapitata*, *Chlorella vulgaris*, *Desmodesmus subspicatus*¹⁰, *Navicula pelliculosa* ou marines telle que *Skeletonema costatum*.

Les tests d'écotoxicité utilisant comme matériel biologique des algues ont été initialement développés pour tester des matrices liquides. Leur efficacité et sensibilité ont été prouvées vis-à-vis de produits chimiques (Abalde *et al.* 1995, Kaplan *et al.* 1995), de

¹⁰ auparavant *Scenedesmus subspicatus*

pesticides (Okamura *et al.* 2002), d'effluents industriels (Walsh *et al.* 1980), de rejets de mines (Blaise et Couture (1984), etc. Elles ont été retenues comme élément constitutif de certaines batteries d'essais (Costan *et al.* 1993, Vindimian *et al.* 1999). Les algues ont également été utilisées dans des batteries d'essais pour évaluer l'écotoxicité de matrices solides comme les sols, sédiments, déchets et boues (Férard et Ferrari, 2005), en testant différents extraits comme les eaux interstitielles, les éluviats et les extraits organiques (Ahlf *et al.* 1989, Giesy et Hoke 1989, Davoren *et al.* 2005). Considérant l'importance de tester aussi la phase solide des sédiments, Blaise et Ménard (1998) ont développé un test de «contact direct» avec les sédiments (dénommé ASPA pour Algal Solid Phase Assay) basé sur l'utilisation de *P. subcapitata* et sur la mesure de l'activité estérase des algues après 4 ou 24 heures d'exposition aux différents sédiments avec l'aide d'un cytomètre de flux (test ASPA). En utilisant le même paramètre, Simpson *et al.* (2007) ont développé un test de contact direct avec des sédiments marins avec l'algue marine *Entomoneis cf. punctulata*.

4.1.2 Organisme d'essai

La microalgue *P. subcapitata*¹¹ est un organisme dulçaquicole de la famille des Chlorophycées, représentatif des producteurs primaires. C'est une algue verte unicellulaire autotrophe obligatoire. Elle est considérée comme une microalgue pour sa petite taille (diamètre moyen compris entre 5 et 6 μm); cette cellule a un volume moyen de 15 à 20 μm^3 (mais elle peut atteindre 60-70 μm^3 en phase stationnaire). Elles sont généralement isolées et ne possèdent pas de flagelles. La figure 35 présente une photographie de cette algue en microscopie optique.

¹¹ Auparavant dénommée *Selenastrum capricornutum* puis *Raphidocelis subcapitata*



Figure 35: L'algue verte *Pseudokirchneriella subcapitata*, vue en microscopie optique

(<http://enfo.agt.bme.hu/drupal/node/6665>)

La classification taxonomique d'après Hindák (1990) est la suivante:

Phylum : Chlorophyta
Classe : Chlorophyceae
Ordre : Chlorococcales
Famille : Chlorellaceae
Sous-famille : Ankistrodesmoidae
Genre : *Pseudokirchneriella*
Espèce : *P. subcapitata*

D'après Blaise et Vasseur (2005) pour maintenir la croissance optimale de cette algue, il est nécessaire que la lumière soit en quantité suffisante ($60-80 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$) et de maintenir une température optimale de 24°C .

La sensibilité de cette espèce a été déjà observée sur de nombreuses substances chimiques (Blaise *et al.* 1986, Hickey *et al.* 1991, Angerville *et al.* 2008, Lee et Chen 2009). De même, le test d'inhibition de croissance avec l'algue *P. subcapitata* en milieu liquide a fait l'objet d'une normalisation nationale et internationale.

4.1.3 Test d'inhibition de la croissance des algues

Le test algue classique est un test chronique d'écotoxicité aquatique, monospécifique, statique, normalisé (ISO 8692, 2012) qui consiste à déterminer la concentration efficace qui en 72 heures inhibe 50 % de la croissance de *P. subcapitata* mises en expérimentation (CI₅₀ 72 heures).

Les algues utilisées proviennent d'une culture en phase exponentielle de croissance (culture de 3 jours). Les conditions d'expérimentation sont contrôlées avec une agitation, à 20°C et sous une lumière blanche continue. Le milieu de culture est le milieu oligo L-C. Des concentrations variables de produits chimiques sont testées en conditions axéniques. L'inhibition de la croissance algale est déterminée par un comptage des cellules à l'aide de différents moyens (fluorimétrie, comptage sous microscope à l'aide d'un hématimètre...). L'essai se déroule en flacons ou en microplaques.

4.1.4 Test d'inhibition de l'activité estérase

Les estérases constituent un groupe d'enzymes comprenant les phosphodiesterases et l'acétylcholinestérase. Ces enzymes peuvent être mesurées *in vivo* en utilisant des fluorochromes tels que le diacétate de fluorescéine (FDA). Le FDA est un colorant lipophile non-fluorescent qui peut se diffuser librement à travers la membrane plasmique. Les estérases hydrolysent le FDA dans le cytoplasme produisant ainsi de la fluorescéine, qui est retenue par les cellules viables. La fluorescence de la fluorescéine peut être détectée en cytométrie de flux et elle reflète à la fois une activité estérasique et l'intégrité des membranes cellulaires, tous deux indicateurs de la viabilité cellulaire (Dorsey *et al.* 1989, Franklin *et al.* 2001). La détection de la fluorescence de la fluorescéine en cytométrie de flux a été utilisée pour évaluer l'écotoxicité de sédiments contaminés (Blaise et Ménard 1998, Adams et Stauber 2004, Simpson *et al.* 2007) de substances chimiques comme des herbicides (Gala et Giesy 1990, Adler *et al.* 2007, Rioboo *et al.* (2009), des métaux lourds (Franqueira *et al.* 2000) ou des rejets miniers (Regel *et al.* 2002).

La méthode développée par Blaise et Ménard (1998) consiste à exposer les algues *P. subcapitata* pendant 4 ou 24 heures aux sédiments. Ce test permet de calculer une CI_{50} ou une CI_x . Il nécessite l'emploi d'un cytomètre de flux. Il a été appliqué à six sédiments naturels et sept sédiments de référence certifiés. Les résultats obtenus par Blaise et Ménard (1998) ont montré que les réponses étaient «marginalement» corrélées aux teneurs en HAP et PCB totaux ($p= 0,051$ et $0,078$ respectivement) de 9 de ces sédiments.

4.1.5 Généralités sur la cytométrie en flux et son utilisation en Ecotoxicologie

La cytométrie en flux est une méthode rapide pour la mesure quantitative des cellules individuelles dans un fluide en mouvement. Les cellules passent à travers une source de lumière (habituellement un laser) et des mesures de la densité cellulaire, de la diffusion de la lumière et de la fluorescence sont recueillies simultanément (Duperray *et al.* 1993). Initialement biomédicale, cette technique a été appliquée en Ecotoxicologie pour évaluer l'effet des substances toxiques sur des cellules algales (Gala et Giesy 1990).

Les microalgues sont des cellules idéales pour l'application des analyses cytométriques, car elles contiennent des pigments photosynthétiques tels que la chlorophylle, détectable lorsqu'elle est excitée avec la lumière bleue du cytomètre. Avec la mesure de la fluorescence de la chlorophylle, il est possible de déterminer l'inhibition de la croissance des algues et des changements dans la taille des cellules algales (Gala et Giesy 1990, Franklin *et al.* 2001, Rioboo *et al.* 2009). En outre, des colorants fluorescents spécifiques comme par exemple le diacétate de fluorescéine (FDA), l'iodure de propidium (PI) peuvent être utilisés en cytométrie en flux, fournissant ainsi des informations sur l'état physiologique des cellules d'algues après l'exposition aux toxiques (Cid *et al.* 1995, Blaise et Ménard 1998, Hampel *et al.* 2001, Adams et Stauber 2004).

Un cytomètre en flux est composé de trois systèmes : fluïdique, optique et électronique. Dans le système fluïdique, les échantillons sont aspirés par l'appareil, les échantillons contiennent normalement une concentration comprise entre $2 \cdot 10^5$ et $1 \cdot 10^7$ cellules/mL.

Ensuite, les échantillons passent dans un faisceau laser qui excite les particules à 488 nm. L'instrument possède deux détecteurs qui servent à identifier la morphologie de la cellule. Le détecteur « Forward angle light scatter (FSC) » fournit des informations sur la taille de cellules et le détecteur « Side angle light scatter » (SSC) fournit des informations sur la complexité (e.g. granularité) interne des cellules. La fluorescence est, en outre, collectée à différentes longueurs d'ondes par des photomultiplicateurs avec différents filtres d'émission de fluorescence.

La chlorophylle *a*, qui fluoresce dans le rouge, est détectée à 650 nm (FL3). La fluorescéine, qui provient des cellules exposées au FDA, est détectée à 530 nm (FL1) (Stauber *et al.* 2005). Le schéma détaillé d'un cytomètre est présenté sur la figure 36 ci-dessous.

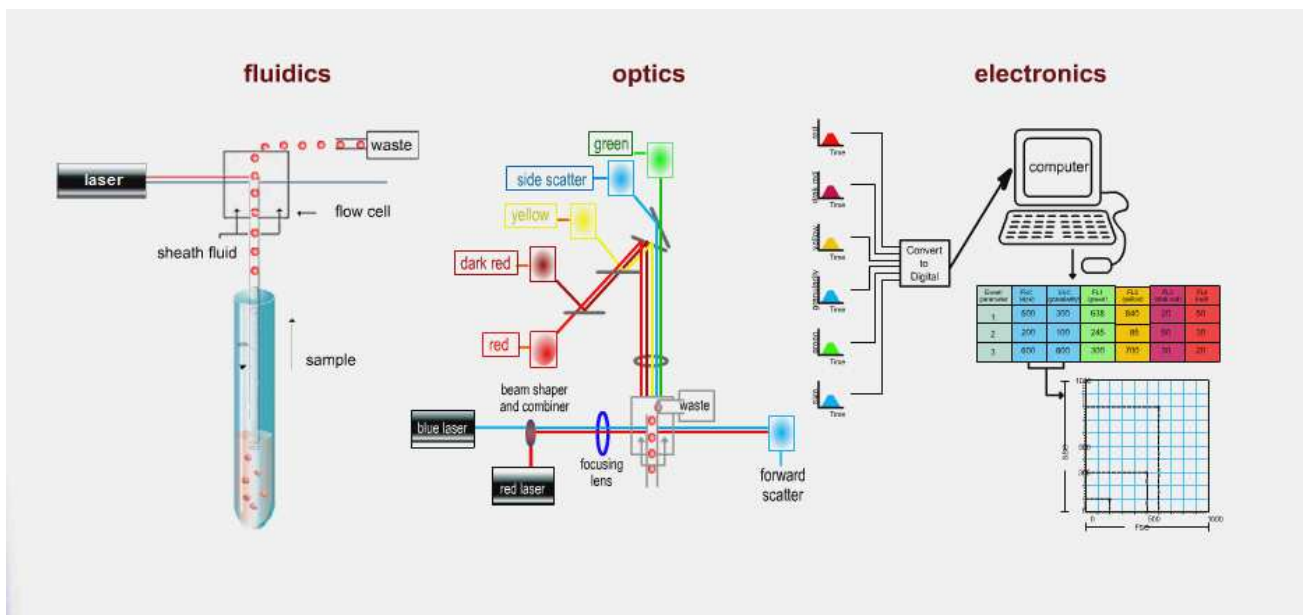


Figure 36: Schéma d'un cytomètre en flux

4.2 Objectifs du travail

Dans cette partie de notre travail de recherche, nous avons étudié la faisabilité et le pouvoir de discrimination du test ASPA développé par Blaise et Ménard (1998) à partir de l'analyse de 21 échantillons de sédiments naturels. Parallèlement à l'application de ce test nous avons développé une autre méthode basée sur l'inhibition de croissance, (test algue en phase solide par inhibition de croissance ou ASPAIC). Ce test est basé sur l'exposition des algues aux sédiments pendant 4 heures et sur la récupération des algues après exposition qui sont alors placées dans des microplaques pendant 72 heures pour évaluer leur capacité de croissance par rapport au témoin. Les mêmes échantillons utilisés dans le test ASPA ont été testés afin de comparer les sensibilités des deux tests. Les deux tests ont utilisé l'algue *P. subcapitata*.

4.3 Matériel et méthodes

4.3.1 Préparation de l'inoculum algal

L'inoculum algal provient d'une pré-culture en phase exponentielle de croissance de quatre jours. Cette pré-culture est maintenue dans une salle réservée à cet effet au sein du LIEBE (Université de Lorraine).

Pour compter le nombre d'algues, 20 μL sont prélevés et transférés dans 20 mL de liquide de comptage (ISOTONER, COULTER). Puis ce mélange est analysé avec le compteur de particules (Coulter Z1). Pour atteindre la concentration voulue pour les deux méthodes (1×10^6 cellules mL^{-1}), une dilution a été faite avec du NaHCO_3 ($56,6 \text{ mg L}^{-1}$) pour le test ASPA ou avec le milieu ISO pour le test ASPAIC (la constitution du milieu ISO se trouve dans la norme ISO 8692, 2012.)

4.3.2 Protocoles expérimentaux

a) Le test algue en phase solide (ASPA) (figure37)

Le test a été effectué sur la base du protocole proposé par Blaise et Ménard (1998). Dans ce test, les algues *P. subcapitata* sont exposées à une série de sédiments dilués selon une gamme de facteur 2 à partir d'une solution à 20 % de sédiment testé (4 g de sédiment humide + 20 ml de solution algale). Les algues sont diluées dans du NaHCO_3 (56,6 mg L⁻¹) à 1×10^6 cellule mL⁻¹

Trois témoins sont nécessaires pour le bon déroulement du test, un témoin algues, un témoin sédiment correspondant à la plus forte concentration testée et un témoin sédiment non contaminé constitué par 20% de sédiment prélevé dans une site de référence historique du laboratoire LIEBE nommé La Maxe (Moselle, France) (Annexe 7). Tous les tubes sont mis en agitation pendant 4 heures à l'obscurité. Après quoi, les tubes sont laissés au repos pendant 5 à 8 minutes, permettant la sédimentation de la plupart des particules ayant un diamètre supérieur à 25 μm (selon Blaise et Ménard, 1998). Pour faire la lecture avec le cytomètre de flux (FACScalibur plus Cell-Quest Software, Becton Dickinson), 2 ml de surnageant sont prélevés toujours à la même distance du ménisque supérieur et transférés dans un tube adapté à la lecture au cytomètre.

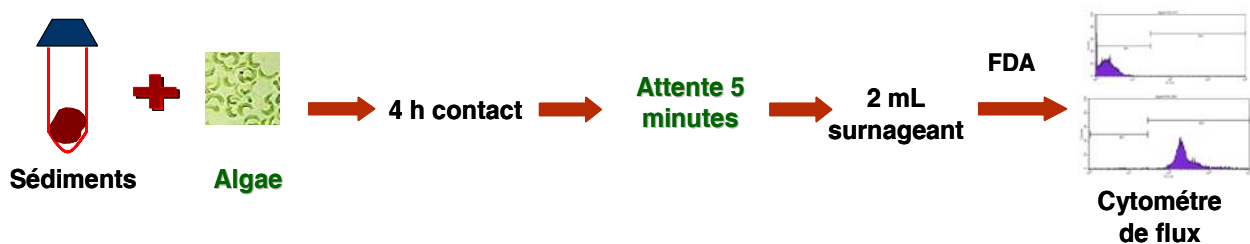


Figure 37: Procédure expérimentale du test ASPA

Pour mesurer l'activité estérase et l'intégrité des membranes des cellules algales exposées à des sédiments, 10 μL de FDA (6 mM) sont ajoutés dans chaque tube. Une attente de 15 minutes est nécessaire avant de procéder à la mesure du nombre de cellules en fonction du log de la fluorescence verte (FL1). La figure 38 permet de visualiser les différences

entre des algues seules analysées sans FDA (fenêtre M1) et avec FDA (fenêtre M2). L'ajout de FDA provoque le déplacement vers la droite de l'histogramme. M2 représente le nombre de cellules algales ayant une activité estérasiqne normale et sont donc considérées comme saines (Blaise et Ménard, 1998). Les pourcentages d'inhibition de la fluorescence sont calculés pour chaque concentration et les CI10-4h exprimées en $g\ L^{-1}$ de sédiment sec déterminées avec la macro Excel REGTOX (version 7.0.3, disponible sur http://www.normalesup.org/~vindimian/fr_index.html).

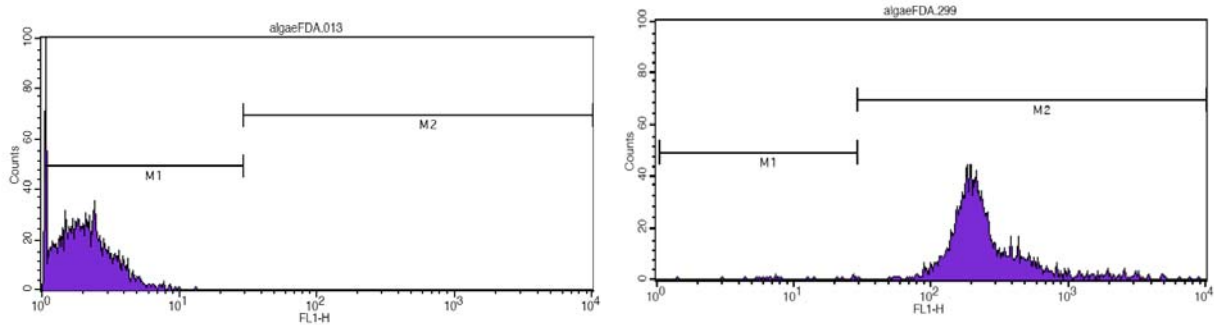


Figure 38: Histogrammes obtenus au cytomètre de flux pour des algues témoins (à gauche sans FDA, à droite avec FDA)

b) Aspects méthodologiques de la caractérisation des algues par cytométrie en flux

Pour réaliser la séparation entre cellules algales et sédiments il est nécessaire d'utiliser un tube témoin « algues seules » et un tube « sédiment + algues », en utilisant les paramètres FSC (Forward angle light scatter) en ordonnées et log FL3 (650 nm) en abscisses. Avec le tube « sédiment + algues », deux nuages de points bien distincts à gauche et à droite du graphique sont observés alors qu'un seul nuage de point est observé sur la droite du graphique avec le tube « algues seules ». Ceci permet de définir une fenêtre spécifique pour la détection des algues (fenêtre R1) et excluant les sédiments afin de compter le nombre d'évènements sur les algues libres (puisque des algues adsorbées sur des petites particules sédimentaires sont aussi susceptibles d'être détectées, cf. figure 39).

Pour faire la mesure de l'activité estérase, le cytomètre est réglé pour qu'il fasse des analyses uniquement en fonction du log de la fluorescence verte FL1 (430 nm) sur des algues seules. L'histogramme obtenu (figure 39) permet d'identifier la population des algues saines. Pour cet essai, le FDA est ajouté à chaque essai. Une attente de 15 minutes est nécessaire pour que la substance réagisse avec les algues. Parallèlement à la mesure des algues dans la région R1, le cytomètre est réglé pour qu'il fasse des analyses en fonction du log de la fluorescence verte FL1 (figure 39) à partir des algues trouvées dans la fenêtre R1. C'est à partir de cet histogramme que nous identifions la population des algues saines.

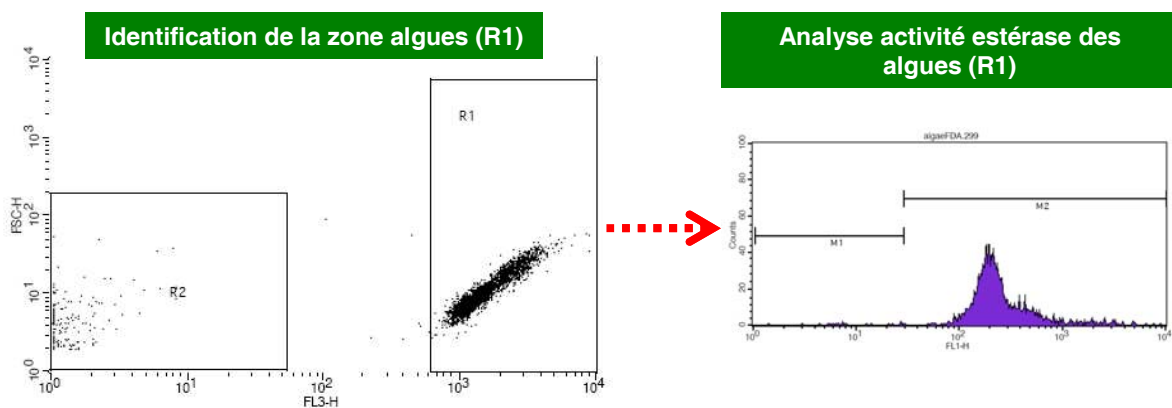


Figure 39: Visualisation des fenêtres de comptage (R1 = Algues) dans le cytomètre de flux

b) Le test algue en phase solide basé sur l'inhibition de croissance (ASPAIC)

De la même façon que précédemment, dans cette variante, nous récupérons les algues après une exposition de 4 heures à différentes dilutions de sédiments. Nous utilisons deux témoins :

- le témoin (sans sédiment) qui contient l'inoculum algal et le milieu ISO (2004) utilisé pour le test algue,
- le témoin sédiment (dilué dans le même milieu ISO).

Des expériences préliminaires ont montré que le milieu à base du seul bicarbonate de sodium ne convenait pas à ce test. Dans ce test (figure 40), nous utilisons une concentration algale initiale de 10^6 cellules mL^{-1} (concentration identique à celle du test ASPA). Après 4 heures de contact (durée identique à celle du test ASPA), les tubes

contenant les algues et les sédiments sont centrifugés à 300g pendant 2 minutes. Cette centrifugation permet de séparer les algues des sédiments sans abimer les algues (conditions optimale prelevement optimisé dans cours de la thèse). Les algues qui se trouvent dans les surnageants sont énumérées à l'aide d'une cellule de Malassez¹², puis toutes les solutions sont ramenées (par simple dilution) à la même concentration algale. Ensuite, 250 µL des algues exposées ou des témoins respectifs sont prélevés et placés dans des microplaques en polystyrène de 96 puits (Greiner Bio-One, réf: 655101). Ces microplaques sont incubées pendant 72 heures à 24±1°C en lumière continue (5000-6000 lux).

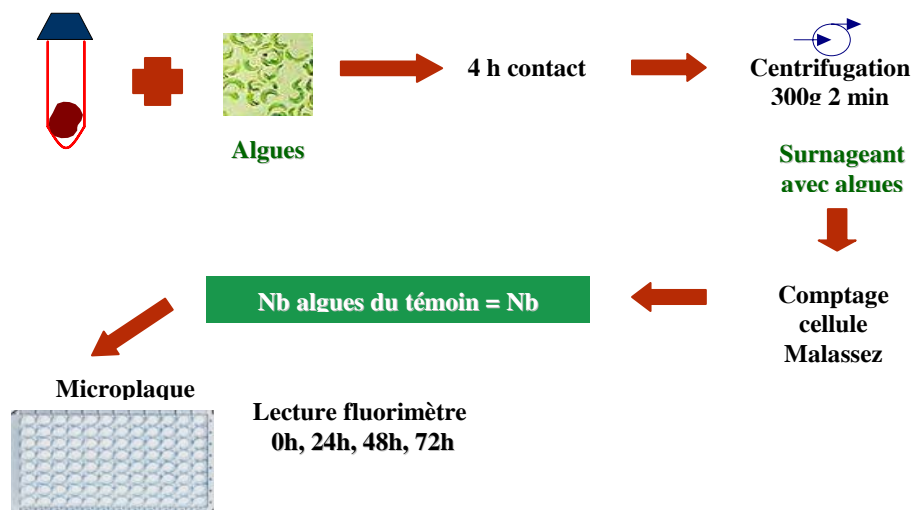


Figure 40: Mode opératoire de la procédure expérimentale du test algues en phase solide basé sur l'inhibition de croissance (ASPAIC)

La mesure de la fluorescence des algues est faite à $t=0$ et chaque 24 heures, pendant 72 heures d'incubation. Ces mesures sont réalisées à l'aide d'un fluorimètre de type Fluostar (excitation/émission : 485/640 nm), lequel fournit des résultats en unités relatives de fluorescence. Avant de procéder au calcul du pourcentage d'inhibition de croissance, les mesures de fluorescence des algues exposées et des algues témoins sont respectivement corrigées à partir de la fluorescence de leurs témoins respectifs. Le calcul du pourcentage

¹² la numération peut aussi se faire au compteur Coulter

d'inhibition de la croissance (IC) pour chaque concentration est réalisé à l'aide de la formule suivante :

$$IC (\%) = \frac{(T_{72h} - T_{0h}) - (E_{72h} - E_{0h})}{(T_{72h} - T_{0h})} \times 100$$

Où,

IC : Inhibition de la croissance

T_{0h} : Fluorescence témoin algue à t=0h

T_{72h} : Fluorescence témoin algue après 72 heures d'incubation

E_{0h} : Fluorescence des algues exposées à la concentration x suite à t=0h

E_{72h} : Fluorescence des algues exposées à la concentration x après 72 heures d'incubation

4.3.3 Exploitation statistique des données

Les CI₁₀ 4 heures et 72 heures pour le test ASPA et ASPAIC respectivement (et leurs intervalles de confiance à 95%) ont été calculées avec la macro Excel REGTOX (version 7.0.3, disponible sur http://www.normalesup.org/~vindimian/fr_index.html) et ont été exprimées en g L⁻¹ de sédiment sec. Des corrélations de Pearson ont été réalisées entre les valeurs de CI₁₀ (ou les concentrations les plus fortes testées pour les sédiments qui n'ont pas présenté d'effets écotoxiques) et les paramètres physico-chimiques des sédiments testés. De même, des analyses de corrélation de Pearson ont été effectuées entre les résultats du test ASPA et les paramètres physico-chimiques.

4.4 Résultats et discussion

Les deux tests ASPA et ASPAIC ont été conduits en parallèle avec chacun des 21 échantillons du programme DIESE.

4.4.1 Résultats du test ASPA

Sur les 21 échantillons testés, seuls 7 sédiments ont présenté des pourcentages d'inhibition supérieurs à 10%. La figure 41 présente les courbes de relation dose-réponse pour ces 7 échantillons. Le sédiment VID est le sédiment qui a présenté le plus fort pourcentage d'inhibition de fluorescence (53,3%), viennent ensuite, par ordre d'écotoxicité décroissante, les sédiments CMA et BIE qui ont respectivement provoqué une inhibition de 23,8% et 20% pour la plus forte concentration testée. Les 4 autres sédiments ont présenté des inhibitions comprises entre 10 et 16% pour les plus fortes concentrations testées. Parmi les 14 autres sédiments testés, les pourcentages d'inhibition se distribuent entre 0,6% (PG5) et 8,9% (CMC). En outre, certains échantillons (BB, PG2, CMC, PG5 et LAV) ont provoqué une stimulation de l'activité estérase, surtout pour les deux plus faibles concentrations testées.

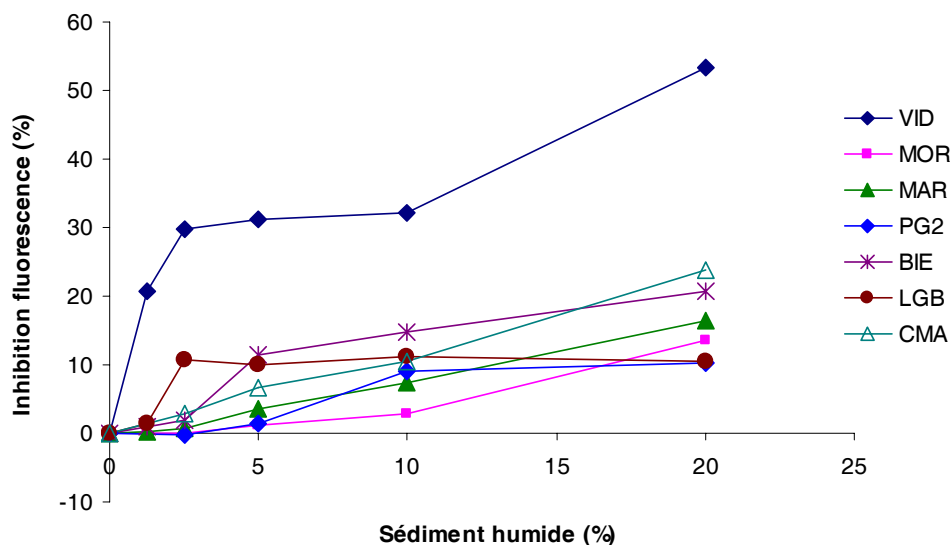


Figure 41: Pourcentages d'inhibition de l'activité estérase en fonction du pourcentage de sédiment humide testé après 4 heures d'exposition.

Pour des raisons essentiellement techniques (impossibilité de tester des concentrations de sédiments supérieures à 20% suite à des colmatages du système d'aspiration du cytomètre de flux), nous n'avons pas pu calculer des CI_{50} . Nous avons donc choisi un autre

paramètre d'effet (CI_{10}) pour pouvoir comparer un maximum de sédiments, le tableau 12 résume les résultats obtenus.

Tableau 12: Résultats du test ASPA pour les 21 sédiments testés
(CI_{10} g de sédiment sec L^{-1} de milieu)

Sédiments		Code	Test ASPA	
			CI_{10} et intervalles de confiance	
			à 95% (g sed sec L^{-1})	
Sédiments de la 1ère campagne	1	BB	>72*	
	2	PG2	51,2	38,7 - 62,6
	3	LCB	>156,4*	
	4	CMA	33,3	26,6 - 40
	5	CMC	86,8	70,8 - 103,4
Sédiments de la 2ème campagne	6	VID	0,75	0,21 - 1,62
	7	MOR	75,9	70,0-80,1
	8	MAR	51,2	46,5 – 56,0
	9	IBA	>84*	
	10	CAJ	>80*	
Sédiments de la 3ème campagne	11	PG3	>64*	
	12	LG2	14,16	13,78 - 14,52
	13	BIO	>94*	
	14	PG5	>64*	
	15	BIE	19,71	13,02 - 27,15
	16	AMO	>67*	
Sédiments du Jura	17	NEY	>140*	
	18	LAV	>144,2*	
	19	ETA	>126*	
	20	CHA	>140*	
	21	SIR	>116*	

* La couleur de fond vert-clair signifie que la CI_{10} n'a pas été atteinte et que dans ce cas c'est la concentration testée la plus élevée qui a été retenue.

Les calculs des CI_{10} pour chaque échantillon nous ont permis de procéder à une classification des échantillons du plus écotoxique au moins écotoxique :

$$VID(6) > LG2(12) > BIE(15) > CMA(4) > PG2(2) = MAR(8) > MOR(7) > CMC (5)$$

>> autres sédiments non classables.

L'analyse de corrélation de Pearson n'a indiqué aucune corrélation entre les paramètres physico-chimiques des sédiments et les valeurs de CI_{10} . Par contre, la relation trouvée entre les valeurs maximales d'inhibition de fluorescence provoquée par chaque sédiment

testé et les paramètres physico-chimiques révèlent des corrélations significatives ($p < 0.05$) avec la matière organique ($r = 0,49$), certains métaux comme le chrome ($r = 0,72$), le fer ($r = 0,51$), le nickel, ($r = 0,733$), le mercure ($r = 0,667$), et le fluoranthène ($r = 0,52$). Pour les sédiments des 1^{ères} et 2^{ème} campagnes et pour les sédiments du Jura, les relations entre les quantités de carbone, d'azote et de phosphore et les valeurs de CI_{10} , n'ont pas donné de corrélations significatives. Mais il existe des corrélations significatives ($p < 0,05$) entre les valeurs d'inhibition maximale et le pourcentage d'azote ($r = 0,82$) et de phosphore ($r = 0,92$).

4.4.2 Résultats du test ASPAIC

Sur les 21 échantillons testés avec cette méthode, 4 échantillons ont provoqué une inhibition de croissance des algues supérieures à 10% après 72 heures d'incubation. La Figure 42, montre des exemples des courbes concentration-réponse pour 6 sédiments testés. Le sédiment VID, est le seul sédiment qui a provoqué des inhibitions de croissance à partir de la plus faible concentration testé. Les trois autres sédiments CHA, CMA, AMO ont provoqué une stimulation de la croissance surtout pour la première concentration, mais à partir de la deuxième concentration testé, un effet inhibiteur des sédiments sur la croissance des algues est observé.

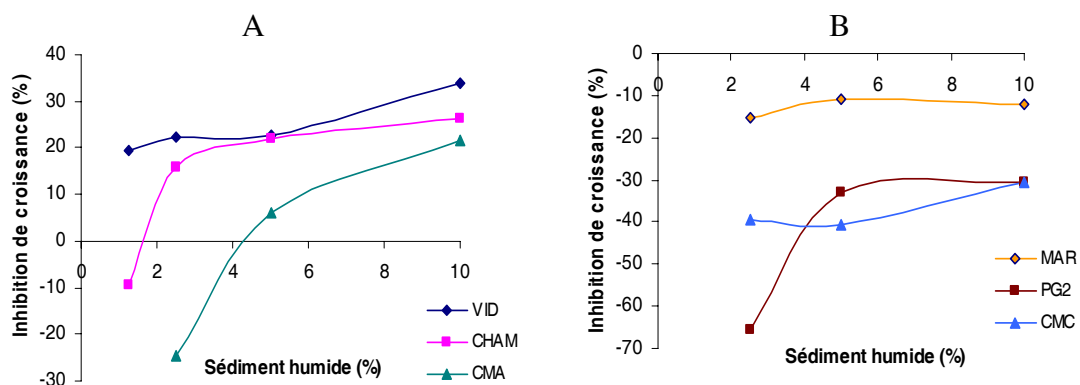


Figure 42: Exemples des courbes de relation dose-réponse A) pour les sédiments qui ont provoqué des inhibitions de croissance aux algues, B) pour les sédiments qui ont provoqué des stimulations de croissance des algues, après 4 heures d'exposition aux sédiments et 72 heures d'incubation en lumière continue.

Pour les sédiments qui ont provoqué des inhibitions de la fluorescence supérieure à 10%, nous avons pu calculer une CI_{10} , le tableau 13 résume les résultats obtenus. A partir de ces résultats, nous avons classé les sédiments du plus au moins écotoxique :

VID(6) > AMO(16) > PG5(2) > CHA(20) > CMA(4) >> autres sédiments non classables.

Des analyses de corrélation de Pearson ont été conduites entre les paramètres physico-chimiques des sédiments, les valeurs de CI_{10} et les pourcentages d'inhibition maximale atteinte pour chaque sédiment. Aucune corrélation n'a été identifiée entre les analyses physico-chimiques et les paramètres de toxicité choisis.

Tableau 13: Résultats du test ASPAIC pour les 21 sédiments testés
(CI_{10} g sédiment sec/L de milieu)

Sédiments	Code	Test ASPAIC	
		CI_{10} et intervalles de confiance	
		à 95% (g sed sec L ⁻¹)	
Sédiments de la 1ère campagne	1	BB2	>72
	2	PG2	>64,4
	3	LCB	>156,4
	4	CMA	14,33 4,18 - 23,61
	5	CMC	>94,4
Sédiments de la 2ème campagne	6	VID	1,198 0,101 - 3,089
	7	MOR	>87,6
	8	MAR	>79,6
	9	ILE	>84
	10	CAJ	>80
	11	PG3	>64
Sédiments de la 3ème campagne	12	LG2	>58
	13	BIO	>47,9
	14	PG5	11,42*
	15	BIE	>70
	16	AMO	7,4*
	17	NEY	>140
Sédiments du Jura	18	LAV	>144,2
	19	ETA	>126
	20	CHA	12,8 0,7 - 32,2
	21	SIR	>116

* la couleur de fond vert-clair signifie que la CI_{10} n'a pas été atteinte mais que la plus forte concentration testée a été retenue à la place

** la couleur de fond jaune signifie que la CI_{10} n'a pu être calculée à l'aide du programme REGTOX. Elle a donc été calculée par simple interpolation linéaire entre le témoin et la plus faible concentration testée ce qui explique l'absence d'intervalles de confiance dans ces conditions.

L'analyse de corrélation entre les deux variantes du test algues (ASPA et ASPAIC) a été menée en utilisant pour le test ASPA les huit CI_{10} disponibles (cf. tableau 12) et pour le test ASPAIC les les trois CI_{10} disponibles (cf. tableau 13) et à défaut la plus forte concentration testée. La figure 43 montre la relation entre ces deux tests, aucune corrélation significative ($p=0.15$) n'a été trouvée entre les deux tests.

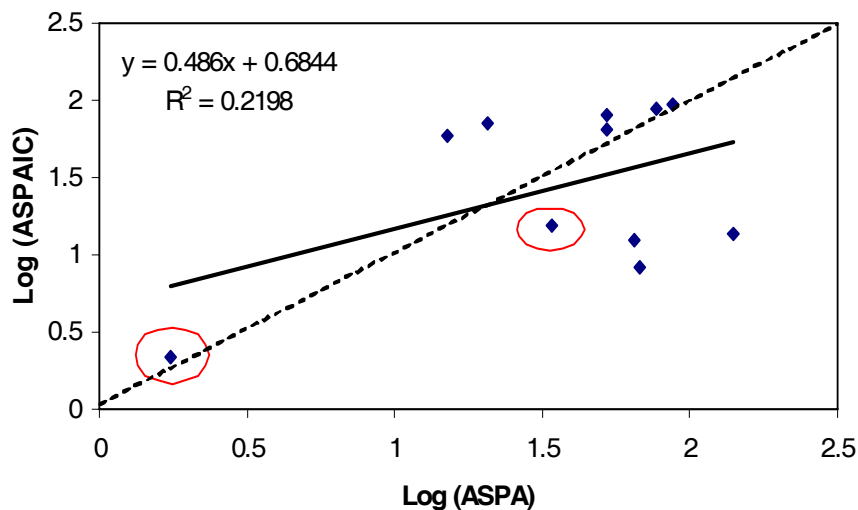


Figure 43: Relation entre les CI_{10} obtenues à l'aide des deux variantes du test algues pour 8 des sédiments testés. La droite en pointillés correspond à la 1^{ère} bissectrice [$\log(\text{ASPAIC}) = \log(\text{ASPA})$]. La droite en trait plein correspond à la droite de régression linéaire et les cercles rouges correspondent aux sédiments qui ont provoqué des effets pour les deux tests algues (ASPA et ASPAIC)

4.4.3 Discussion des résultats

Nous avons développé le test ASPAIC comme une alternative par rapport au test ASPA pour évaluer l'écotoxicité des sédiments. Le test ASPA nécessite l'utilisation et la

connaissance des techniques en cytométrie de flux, ce type d'appareil et de savoir-faire ne sont pas très répandus dans les laboratoires d'analyse. Le test ASPAIC se présentait alors comme une alternative intéressante du fait (i) de sa plus grande facilité de mise en œuvre et (ii) du coût peu élevé de ce test par rapport au test ASPA.

La technique du test ASPAIC a été développée et validée dans un premier temps en utilisant le sédiment lyophilisé de référence certifié SUD-1 (Annexe 8). Ce même sédiment avait été utilisé par Blaise et Ménard (1998) pour la validation du test ASPA. Nous avons conduit les deux tests avec ce sédiment, nous avons obtenu une CI_{50} à 4 heures pour le test ASPA égale à 1,89 % (0,95-2,46) (sédiment sec), alors que Blaise et Ménard (1998) avaient trouvé une valeur légèrement plus élevée (2,5% de sédiment sec). Avec ce même sédiment, le test ASPAIC apparaît plus sensible que le test ASPA puisque la valeur de CI_{50} à 4 heures a été de $0,35 \pm 0,01$ % de sédiment sec.

En considérant la classification des sédiments par rapport à leur $QPEC_m$ (chapitre 2) sur 18 sédiments catégorisés dans les classes 2 (risque moyen) et 3 (risque avéré) sur la base de leurs caractéristiques physico-chimiques, seuls 8 et 5 sédiments respectivement ont présenté des effets toxiques en utilisant les tests ASPA et ASPAIC. En outre, les deux tests ont présenté un faible pouvoir de discrimination pour les échantillons moyennement et très toxiques si on compare les résultats obtenus avec ceux des tests Microtox et Luminotox réalisés sur les mêmes sédiments (cf. chapitres précédents). Cette faible sensibilité contraste également avec les résultats obtenus par Blaise et Ménard (1998).

Un certain nombre de facteurs, reliés à la nature même des sédiments, peuvent expliquer la faible sensibilité que nous avons observée pour ces tests. La différence entre l'écotoxicité potentielle (i.e. estimée d'après la composition chimique des sédiments) et l'écotoxicité observée des sédiments sur les algues peut s'expliquer, du moins en partie, par le contenu des sédiments naturels en matière organique. en effet, la matière organique est un facteur important qui peut contrôler la biodisponibilité des polluants (Burton 1991, Schorer 1997, Lin et Chen 1998). Les ions dissous (ou labiles) des métaux peuvent être complexés par le carbone organique dissous (COD) (Schecher et Driscoll 1985, Hyne *et al.* 2005, Lamelas *et al.* 2005, Gorski *et al.* 2008) ou adsorbés par les particules. Dans notre

étude, nous n'avons pas pu mesurer le COD dans les suspensions de sédiments testés pour corroborer cette hypothèse. Les substances humiques (HS) constituent une fraction importante du COD (Piccolo 2001) et il a déjà été rapporté qu'en présence de ces substances la biodisponibilité des métaux se réduit à cause de la complexation des métaux avec les HS (Shanmukhappa et Neelakantan 1990, Guéguen *et al.* 2003, Koukal *et al.* 2003)

Par ailleurs, le mécanisme de complexation n'est pas l'unique facteur par lequel le COD peut influencer la biodisponibilité des polluants. Le COD peut, du fait du caractère amphiphile des substances humiques, s'adsorber sur des surfaces biotiques par exemple sur les cellules algales et ainsi «protéger» les algues en empêchant le contact des polluants avec la surface de la cellule (Campbell *et al.* 1997, Knauer et Buffle 2001, Koukal *et al.* 2003).

Parmi les résultats obtenus avec le test ASPA, nous avons détecté dans un premier temps une stimulation de la croissance algale pour les premières concentrations testées puis une inhibition de la croissance algale pour des concentrations plus importantes. Ce type de réponse, appelé phénomène d'hormèse, a déjà été bien documenté chez divers organismes, y compris les algues pour certains produits chimiques (Thompson et Couture 1991, Kamaya *et al.* 2006), des effluents industriels et municipaux (Walsh *et al.* 1980, Calabrese et Baldwin 2002). Dans le cas de l'évaluation écotoxicologique des sédiments, Mauffret *et al.* (2010) ont observé des stimulations de la croissance de la diatomée *Cylindrotheca closterium* exposée aux sédiments volontairement additionnés de surfactant synthétique lauryl sulfonate (LAS). Sbrilli et Batistini (2011) ont testé des échantillons de sol et ont conduit des tests en phase solide avec des sols bruts et des éluutriats avec l'algue *P. subcapitata*, ils ont aussi reporté des stimulations de croissance pour les deux types d'essai aux plus faibles doses. Comme le mentionnent Calabrese et Baldwin (1998), l'hormèse pourrait être due à une surcompensation des mécanismes de contrôle homéostatique induits par de faibles doses de substances toxiques.

Finalement, 73% des échantillons testés correspondant aux sédiments des classes 2 et 3 ont provoqué une stimulation de la croissance algale par rapport au témoin, et ceci pour toutes les concentrations testées avec le test ASPAIC. Malgré le fait que nous n'ayons pas

trouvé de corrélations significatives avec des nutriments comme l'azote, le phosphore dosés dans les sédiments bruts (analyse non présentée), nous n'excluons pas l'hypothèse que l'apport de nutriments par les sédiments puisse être une des causes de cette stimulation de croissance comme déjà signalé par Hund (1997) et Horvatic *et al.* (2006). Dans le test ASPAIC les algues, après une exposition de 4 heures aux sédiments, ont été séparées grâce à une faible centrifugation, qui n'a donc évidemment pas éliminée les éléments nutritifs présents. Ceux-ci permettent, au cours des 72 heures d'incubation, de stimuler la croissance des algues et de masquer les effets toxiques des sédiments. Des auteurs comme Walsh *et al.* (1980), Chen (1989), Hund (1997) et Aruoja *et al.* (2004) ont signalé que des concentrations élevées en éléments nutritifs peuvent modifier l'effet de la substance toxique sur la croissance des algues. Lorsqu'un échantillon contient des substances nutritives et des composés toxiques, il y a probablement un équilibre variable selon les concentrations testées entre les facteurs inhibiteurs et stimulants (Sbrilli *et al.* 2003, Aruoja *et al.* 2004).

Dans notre étude, nous nous sommes aperçus que le test ASPA était plus sensible que le test ASPAIC (sauf pour le sédiment SUD-1). Ces résultats sont en opposition avec ceux de Hampel *et al.* (2001) qui dans une étude sur les effets du LAS en phase liquide ont montré que l'inhibition de la croissance algale était un paramètre plus sensible que l'inhibition de l'activité estérase. Comme nous l'avons déjà discuté précédemment, nous avons trouvé que près de 75% des échantillons testés stimulaient la croissance des algues avec le test ASPAIC. En outre, Adams et Stauber (2004) ont trouvé une corrélation significative entre les inhibitions de croissance et l'activité estérase, alors que dans notre étude aucune corrélation n'a pu être mise en évidence. Cette absence de corrélation est probablement due au faible nombre de sédiments testés et aussi aux conditions différentes dans lesquelles les deux tests ont été conduits (milieu différent). De plus, le lien entre la réponse définitive de l'activité estérase et la capacité des cellules à survivre et se reproduire après l'exposition aux sédiments contaminés n'est pas encore bien compris (Adams et Stauber 2004). Il serait donc important de faire plus d'études sur cet aspect afin d'augmenter la pertinence de l'utilisation de l'activité estérase comme critère d'effet subléthal dans les études écotoxicologiques avec des sédiments naturels.

Le fait de conduire le test ASPAIC avec du milieu ISO pourrait également contribuer à la stimulation de la croissance des algues, du fait des nutriments que ce milieu contient. De même, le fait de comparer la croissance des algues après exposition à des sédiments naturels avec un témoin algues sans sédiments, est un autre aspect de ce test pouvant être critiqué et il aurait été intéressant d'utiliser comme témoin un mélange d'algues avec un sédiment possédant des caractéristiques, autres que la présence de toxiques, similaires à celles du sédiment testé, mais ceci aurait nécessité des développements méthodologiques importants.

4.5 Conclusions et perspectives

Les tests ASPA et ASPAIC ont présenté un faible pouvoir de discrimination entre les échantillons des sédiments naturels catégorisés comme moyennement et très toxiques. Toutefois, le test ASPA semble être plus sensible que le test ASPAIC. L'effet des sédiments contaminés sur la croissance des algues pourrait être le résultat d'un équilibre entre plusieurs effets négatifs et positifs parmi lesquels on peut noter la faible biodisponibilité des polluants pour l'organisme, la possible complexation des polluants par la matière organique présente dans les sédiments (e.g. COD, substances humiques).

En outre, comme cela a déjà été évoqué par différents auteurs, la croissance des algues dans le test ASPAIC pourrait être stimulée par des nutriments présents dans le sédiment (comme l'azote et le phosphore) compensant ainsi les effets toxiques causés par les polluants. L'utilisation du test ASPAIC pour évaluer l'effet écotoxique réel des sédiments devrait être systématiquement accompagnée par des analyses d'azote, phosphore. Une méthode qui pourrait être applicable pour compenser le biais causé par l'apport des nutriments dans les sédiments naturels serait dans un premier temps, de quantifier ces nutriments et ensuite, d'ajouter des concentrations équivalentes de nutriments au témoin algues.

Chapitre 5 : Les ostracodes pour évaluer l'écotoxicité des sédiments

5.1 Synthèse Bibliographique

5.1.1 Les Ostracodes

Les ostracodes sont des microcrustacés bivalves qui forment une classe qui regroupe plus de 46 familles réparties dans deux sous-classes : les podocopides et les mydocopides (Horne, 2005). Certains auteurs pensent qu'il y aurait au moins 25 000 espèces dont seulement 12 000 ont été décrites. Parmi elles, 3 000 seulement sont des espèces d'eaux douces (Cohen *et al.* 2007). La majorité des ostracodes adultes mesure entre 0,8 et 3 mm et quelques rares espèces ont une taille macroscopique surtout ceux du genre *Gigantocypris*, qui peuvent arriver à mesurer jusqu'à 20 mm de longueur (Sönmez-Gökçen 1964).

Les ostracodes possèdent deux coquilles de calcite faiblement magnésienne, bordées d'une frange de cils (figure 44). La morphologie de leur coquille varie suivant les milieux où ils vivent. Les espèces d'eau douce ont généralement une coquille lisse, mince et légère, celle des formes marines est très rigide, calcaire et sculptée (Sönmez-Gökçen 1964). La région céphalique et le thorax ne sont pas différenciés. Mis à part 7 paires d'appendices qui sortent de la coquille, le reste du corps est totalement dissimulé à l'intérieur de celle-ci (Dole-Olivier *et al.* 2000, Pérez Liseth *et al.* 2010). Ces appendices servent pour la locomotion, la palpation, la préhension, la mastication et l'enfouissement (Angerville 2009). Selon les espèces, les ostracodes peuvent posséder dans la partie supérieure de la coquille 0, 1 ou 2 yeux, pédonculés ou non, simples ou composés. Leur système digestif est simple : bouche, estomac, intestin, anus.

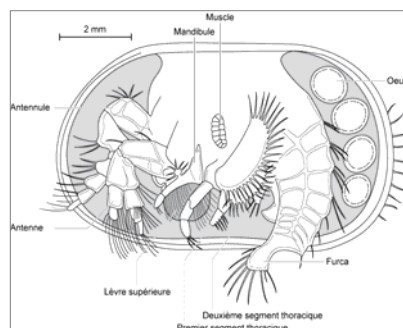


Figure 44 : Anatomie d'un ostracode femelle

(http://paleopolis.rediris.es/cg/CG2011_B02/images/Fig_30.htm)

Les ostracodes d'eau douce se reproduisent soit par parthénogenèse, soit de manière sexuée. Les femelles sont plus abondantes et communes que les mâles. Les œufs peuvent être dormants et ainsi résister à des conditions environnementales défavorables. Comme d'autres crustacés, les ostracodes muent, passant généralement par huit étapes avant d'atteindre l'âge adulte. Le cycle de vie peut durer de quelques mois à plus de 2 ans selon l'espèce (Horne 2005).

L'écologie des espèces appartenant à cette classe est très diversifiée, ils occupent tous les types de masses d'eau à l'exception des zones fortement lotiques. Ils vivent dans les milieux dulçaquicoles (sources, ruisseaux, rivières, étangs, lacs), saumâtres (estuariers) et marins, des plages (Hiruta *et al.*, 2007) aux grands fonds (Blachowiak-Samolyk et Angel, 2007, Heger *et al.* 2007). Certains taxons peuvent même se retrouver dans les eaux souterraines (Karanovic et Marmonier, 2002) ou dans les phytotelmes¹³ de Broméliacées (Lopez *et al.* 2005) La colonisation de ces différents milieux pouvant résulter des déplacements autonomes des ostracodes ou au moyen d'associations phorétiques, par exemple avec des amphibiens (Lopez *et al.* 2005).

Les modes de vie des ostracodes sont très diversifiés, benthiques ou nectobenthiques (i.e. ils nagent dans la colonne d'eau à certains moments, mais peuvent aussi vivre sur le substrat benthique ou sur des plantes) selon Mezquita *et al.* (2005). Ils possèdent une grande variété d'habitudes alimentaires : ils peuvent être filtreurs, détritivores, herbivores ou carnivores (Rossi *et al.* 2011) et forment eux-mêmes une composante importante du régime alimentaire de certains poissons.

Plusieurs paramètres influencent leur développement, chaque espèce y réagissant différemment. Par exemple, la salinité influence en association avec la température et la granulométrie du substrat, la densité de *Terrestrialycythere proboscidis* (Hiruta *et al.* 2007), alors que pour *Limnocythere inopinata*, la salinité augmente la taille de la carapace (Yin *et al.* 2001).

Des modifications de la composition et de la structure des communautés d'ostracodes ont souvent été reportées comme des conséquences de contaminations des écosystèmes

¹³ habitats aquatiques contenus dans un récipient végétal.

aquatiques. Les ostracodes sont très sensibles à la contamination des sédiments par des hydrocarbures, des produits de l'industrie agro-chimique, des métaux lourds et des déchets de l'industrie minière (Bodergat *et al.* 1998, Bergin *et al.* 2006, Ruiz *et al.* 2008, Khangarot et Das 2009, Zenina 2009). Ces contaminations, surtout avec les hydrocarbures, peuvent causer la disparition totale de ces microcrustacés dans les zones proches de rejets toxiques (Ruiz *et al.* 2005). Il n'est donc pas étonnant que des ostracodes aient été utilisés comme matériel biologique dans les tests biologiques. Par exemple, des tests ont été réalisés pour évaluer l'écotoxicité (i) d'insecticides et d'autres biocides avec *Ilyocypris dentifera*, *Cypris vidua*, *Cyretta seurati* (Sánchez-Bayo et Goka, 2006), (ii) des métaux lourds avec *Stenocypris major* (Mohammad *et al.* 2011), (iii) de métalloïdes avec *Cypris subglobosa* (Khangarot et Das, 2009) et (iv) de boues d'épuration (Oleszczuk, 2008) avec *Heterocypris incongruens*.

5.1.2 Test d'écotoxicité avec *Heterocypris incongruens*

(Ramdohr, 1808)

Chial et Persoone (2002) ont développé un microbiotest de contact direct pour évaluer l'écotoxicité des matrices solides en utilisant l'ostracode *Heterocypris incongruens* comme modèle biologique.

5.1.2.1 Systématique de l'organisme

Classe :	Ostracoda
Sous-classe :	Podocopa
Ordre :	Podocopida
Sous-ordre :	Cypridocopina
Super-Famille :	Cypridoidea
Famille :	Cyprididae
Sous-famille :	Cyprinotinae
Genre :	<i>Heterocypris</i>
Espèce :	<i>incongruens</i>

5.1.2.2 Caractéristiques générales

Heterocypris incongruens (figure 45) est une espèce cosmopolite qui peuplent les flaques d'eau temporaires et les petits plans d'eau (Meisch, 2000). Elle se reproduit majoritairement par parthénogénèse, et peut produire des œufs de développement rapide (environ 10 jours) et des œufs dormants qui éclosent quand les conditions environnementales sont favorables (Angell et Hancock, 1989). Ces organismes sont omnivores: leurs sources de nourriture peuvent se composer de bactéries, d'algues, de détritiques organiques, de matières végétales mortes et il a également été observé qu'ils pouvaient se nourrir d'invertébrés vivants et morts comme des cladocères, des copépodes, des chironomes, des oligochètes et d'autres espèces d'ostracodes (Ganning 1971, Rossi *et al.* 2011).

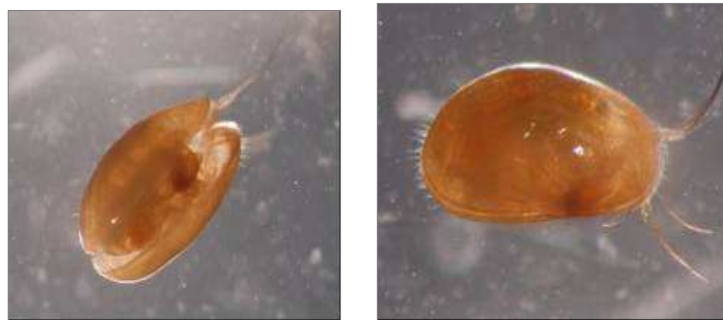


Figure 45 : Vues laterale et frontale de *Heterocypris incongruens*

Photo : Burga K.

Le développement de cette espèce dépend de la température: les organismes ont un fort taux de croissance, mais une faible durée de vie, pour des températures élevées. Selon Gulshan Ara Latifa (1987), la gamme de température tolérée par cet organisme se situerait entre 5 et 30°C. D'après Green (1959), *Heterocypris incongruens* contient trois types de pigments : caroténoïdes, ptéridine et biline, l'absence de pigments héminiques lui confère la capacité de survivre en conditions anaérobies. Cette espèce est peu tolérante à la salinité, selon Ganning (1971), 50% des organismes de la population testée tolère des taux de salinité compris entre 1 et 5% pendant environ 20 jours, et relativement tolérante à la pollution organique (Mezquita *et al.* 1999, Meisch 2000)

5.1.2.3 Test Ostracodtoxkit™

Il s'agit d'un test d'écotoxicité chronique qui est basé sur la mesure de la mortalité et de la croissance d'ostracodes juvéniles de l'espèce *Heterocypris incongruens*. Les organismes sont exposés pendant 6 jours aux sédiments contaminés, et à la fin de l'essai, le taux de mortalité est mesuré ainsi que la longueur de chaque individu, ce qui permet de calculer un pourcentage de mortalité et d'inhibition de la croissance des organismes.

Les premières publications sur le développement de ce test datent de 2002 (Chial et Persoone) et le toxkit a été mis sur le marché en 2003 par l'entreprise MicroBioTests Inc. (Nazareth, France). Chial et Persoone (2002) ont testé la sensibilité et l'efficacité du test Ostracodtoxkit™ en utilisant ce test conjointement avec le test hyallèle (*Hyalella azteca*) sur 26 sédiments prélevés dans diverses rivières et fleuves du bassin hydrographique flamand.

Belgis *et al.* (2003) ont utilisé ce test pour évaluer l'écotoxicité potentielle de 33 sédiments prélevés dans le Lac Supérieur (Canada), conjointement avec les tests de mortalité *Hyalella azteca* et *Chironomus riparius*. Ces auteurs ont observé un coefficient de corrélation significatif ($p < 0,05$; $r^2 = 0,71$) entre les résultats obtenus avec les deux tests sur crustacés, tandis que le coefficient de corrélation entre les données de mortalité des tests ostracode et chironome (bien que significatif) est plus faible ($p < 0,05$; $r^2 = 0,62$). Blaise *et al.* (2004) ont également montré l'efficacité de ce test dans la détection de l'écotoxicité de sédiments pollués avec des hydrocarbures. Ils ont aussi observé une corrélation entre les résultats de ce test et ceux du test *Hyalella azteca* ($p < 0,05$; $r^2 = 0,33$). Comme mentionné précédemment, le test a été utilisé pour évaluer l'écotoxicité de composts de boues activées (Oleszczuk, 2008), mais aussi l'impact de la bioremédiation des sols contaminés par des hydrocarbures (Hamdi *et al.* 2007), l'effet des poussières de différentes rues de Tokyo (Watanabe *et al.* 2011) et tout aussi récemment pour évaluer la sensibilité de ce test aux métaux lourds en milieu liquide (Kudlak *et al.* 2011). Ce test a également été intégré dans une batterie de biotests comme outil de screening pour évaluer l'écotoxicité de sols pollués par des activités minières (García-Lorenzo *et al.* 2009).

Dans ce travail, le test ostracodtoxkit utilisant l'espèce *Heterocypris incongruens* a été choisi pour évaluer le potentiel toxique de sédiments naturels du fait de certains travaux précédemment cités mais aussi parce qu'il permet d'utiliser le sédiment total sans avoir besoin de préparer des extractions, prenant donc en compte toutes les formes de contaminants présents dans le sédiment (Chial et Persoone (2002)). De plus le test est simple, rapide et ne requiert que peu d'échantillons. Au vu de résultats préliminaires sur quelques sédiments, nous avons également décidé de chercher s'il était possible d'optimiser le test et nous avons donc mis en oeuvre une méthodologie dite «modifiée» où les conditions d'essai (nombre des organismes d'essai, type de microplaque, rapport solide/liquide) ont été modifié par rapport au test classique préconisé par Chial et Persoone (2002).

5.2 Objectifs du travail

Dans ce travail, nous avons voulu (i) utiliser les versions classique et modifiée du test ostracode pour évaluer le potentiel écotoxique de sédiments naturels, (ii) comparer l'efficacité des deux versions du test, et iii) chercher le critère d'effet le mieux adapté pour interpréter les résultats.

5.3 Matériel et méthodes

5.3.1 Préparation du milieu d'essai

Le milieu d'essai appelé eau douce standard (Standard Fresh Water, SFW) a été réalisé par nos soins au laboratoire (Belgis et al., 2003, Oleszczuk 2008). La composition fournie par l'EPA(1985) pour l'eau modérément dure (en réalité 64 mg L⁻¹ de Ca CO₃), à savoir :

- 96 mg/L de NaHCO₃,
- 60 mg/L de CaSO₄, 2H₂O,
- 60 mg/L de MgSO₄,
- 4 mg/L de KCl,

Après homogénéisation, le milieu est oxygéné par diffusion d'air ambiant pendant au moins 20 minutes. Il peut être utilisé de suite ou stocké au besoin à 4°C.

5.3.2 Préparation de la solution algale *Pseudokirchneriella subcapitata*

Nous n'avons pas utilisé les algues fournies avec le kit. Les algues utilisées dans ce test (*P. subcapitata*) proviennent d'une pré-culture en phase exponentielle de croissance de quatre jours. La pré-culture est soumise à des conditions contrôlées (lumière blanche en continue de 5000-6000 lux, température de 25°C comme indiqué dans la norme AFNOR T 90-375, 1998).

Les algues ont été centrifugées à 3000 rpm pendant 15 minutes afin de les séparer du milieu de culture, ensuite elles ont été remises en suspension avec du milieu SFW. Pour compter le nombre d'algues dans la suspension, 200 µL ont été prélevés et ont été transférés dans 20 mL de liquide de comptage (ISOTONER, COULTER), puis ce mélange a été analysé avec un compteur de particules (Coulter Z1). Pour réaliser l'inoculum algale à la concentration voulue (2×10^7 cellules/mL), une dilution a été faite avec du milieu SFW.

5.3.3 Préparation des organismes d'essai

L'organisme d'essai provient de kystes d'*Heterocypris incongruens* fourni par R-Biopharm-France (Lyon), les kystes (conservés à $5 \pm 2^\circ\text{C}$ et à l'obscurité) ont été mis en incubation pendant 52 heures, sous éclairage continu (compris entre 3000 et 4000 lux) et à 25°C, dans une boîte de Pétri avec 10 mL de milieu SFW (préalablement oxygéné pendant au moins 20 mn). Après 48 heures d'incubation, 5 mL de la solution algale de *P. subcapitata* sont ajoutés de façon à ce que les premiers kystes éclos trouvent aussitôt une nourriture disponible.

5.3.4 Présentation des protocoles expérimentaux

a) Test ostracode - méthodologie dite classique

Dans chaque puits d'une microplaque de 6 puits (36 mm de diamètre) en polystyrène, 5mL de milieu d'exposition ont été obtenus avec un rapport solide/liquide de 1/4 (comme préconisé par le fournisseur) en ajoutant successivement 1mL de sédiment dilué, 2mL de milieu SFW (préalablement oxygéné) et 2mL d'algues. Nous avons testé pour chaque échantillon 4 dilutions de sédiments (3%, 10%, 30% et 90%) et un témoin (avec le sédiment de référence fourni avec le kit) et trois réplicats pour chaque condition (soit donc 30 organismes par concentration testée). Au début de l'essai, 10 ostracodes juvéniles (âgés de moins de 60 heures) ont été placés dans chaque puits, avant de refermer les microplaques, et de laisser le tout pendant 6 jours à 25°C. En outre, au début de l'essai, 10 ostracodes sont isolés et immobilisés avec quelques gouttes de lugol pour mesurer la taille initiale moyenne du lot utilisé pour la conduite de l'essai ($=L_0$).

A la fin de l'essai, les organismes vivants sont comptabilisés par puits et ensuite immobilisés avec quelques gouttes de lugol pour procéder à la mesure de leur taille. La mortalité (%) est calculée à partir du nombre d'organismes morts à la fin de l'essai par rapport à l'effectif initial. Pour le calcul de l'inhibition de croissance, l'augmentation de la taille a été calculée par rapport à la taille moyenne des ostracodes au début de l'essai (L_0) en utilisant les formules suivantes :

Pour les témoins :

$$\Delta L \text{ témoin} = L \text{ témoin} - L_0$$

Avec :

ΔL témoin (μm) = Variation moyenne de la taille des organismes par puits

L témoin = Taille moyenne (μm) des organismes par puits après 6 jours d'exposition.

L_0 = Taille moyenne (μm) des 10 organismes isolés au début de l'essai

Pour chaque dilution de sédiment :

$$\Delta L_i = L_i - L_0$$

i = Dilution de sédiment testée (3%, 10%, 30%, 90%)

ΔL_i (μm) = Variation moyenne de la taille des organismes par puits,

L_i = Taille moyenne (μm) des organismes dans chaque puits après 6 jours d'exposition,

L_0 = Taille moyenne (μm) des 10 organismes isolés au début de l'essai

Finalement le pourcentage d'inhibition pour chaque concentration de sédiment testée est calculé à partir de la formule suivante :

$$\text{Pourcentage d'inhibition} = 100 - (\Delta L_i / \Delta L \text{ témoin}) \times 100$$

c) Test ostracode - méthodologie dite modifiée

Le tableau 14 illustre les différences entre le test classique et le test modifié. Celles-ci concernent le fait que nous avons voulu tester i) chaque ostracode individuellement d'où le choix de microplaques de 24 puits (15 mm de diamètre) et ii) un rapport sédiment/volume de milieu d'exposition plus élevé de façon à privilégier des concentrations plus élevées au sein du milieu d'exposition tout en maintenant les proportions utilisées dans la méthode classique. Pour le reste, nous avons suivi la même procédure que pour la méthode classique.

	Test classique	Test modifié
Microplaque	6 puits	24 puits
Rapport solide/liquide	1/4	1/2
Nombre d'organismes par puits	10	1

Tableau 14: Différences entre le test classique et le test modifié

5.3.5 Exploitation statistique des données

Pour chaque échantillon et méthodologie testés, cinq paramètres ont été calculés :

- a) La CI_{10} (et ses intervalles de confiance à 95%) calculée à l'aide de la macro Regtox 7.0.3 pour Microsoft Excel (disponible sur http://www.normalesup.org/~vindimian/fr_index.html)
- b) L'inhibition de croissance maximale atteint parmi les concentrations testées.
- c) Les valeurs de pente calculées à partir de la régression linéaire entre concentration (exprimée en g de sédiment sec/L) et pourcentage d'inhibition de croissance.
- d) La CL_{10} avec l'aide de feuilles probit.
- e) Le pourcentage de mortalité maximale atteint parmi les concentrations testées

Une analyse en composantes principales (ACP) a été réalisée pour chaque méthodologie sur le tableau des paramètres de toxicité (17 sédiments x 5 paramètres). L'ACP synthétise l'information apportée par les cinq paramètres de toxicité en un nombre plus réduit de variables d'intérêt décroissant (i.e. les composantes principales). La première composante principale est donc la variable qui explique le plus la variabilité, en terme de toxicité, existant entre les sédiments. Afin de ne conserver que le paramètre le plus pertinent parmi les cinq disponibles, nous avons donc décidé de sélectionner, pour chaque méthodologie, le paramètre montrant la plus forte corrélation avec la première composante principale de l'ACP correspondante. Ensuite, une classification des sédiments a été réalisée avec une analyse de classification ascendante hiérarchisée (distance euclidienne et critère d'agrégation de Ward) en considérant le paramètre sélectionné.

Pour chaque méthode, les sédiments ont été classés en fonction du paramètre sélectionné. La similarité entre les classements obtenus par les deux méthodes a été testée avec une analyse de corrélation de Spearman.

5.4 Résultats et discussion

Les deux tests «classique» et «modifié» ont été conduit en parallèle avec tous les échantillons du programme DIESE.

5.4.1 Résultats avec le test classique

Le pourcentage de mortalité pour chaque dilution de sédiment testée est présenté dans le tableau 15. Sur les 21 échantillons, 8 n'ont présenté aucune mortalité, 7 ont provoqué une mortalité comprise entre 15 et 30 %, 6 autres ont présenté une mortalité supérieure à 30% et le sédiment BIE a montré la plus forte mortalité (60%).

Tableau 15: Mortalité (%) des ostracodes après 6 jours d'exposition aux sédiments naturels avec le test classique

Sédiment	Code	Sable 100%	3%	10%	30%	90%	
Sédiments de la 1ère campagne	1	BB2	0	0	0	0	
	2	PG2	0	0	0	0	
	3	LCB2	0	0	0	0	
	4	CMA	0	0	0	0	
	5	CMC	0	3,3	13,3	3,3	0
Sédiments de la 2ème campagne	6	VID	0	0	0	26,7	
	7	MOR	0	0	0	0	
	8	MAR	0	0	0	36,7	46,7
	9	IBA	0	0	0	0	0
	10	CAJ	0	0	0	0	0
	11	PG3	0	0	0	0	20
Sédiments de la 3ème campagne	12	LGB	3,3	0	6,7	16,7	16,7
	13	BION	3,3	6,7	10	10	13,3
	14	PG5	6,7	3,3	3,3	53,3	23,3
	15	BIE	3,3	0	3,3	13,3	60
	16	AMO	0	10	10	20	23,3
	17	NEY	3,3	13,3	23,3	10	33,3
Sédiments du JURA	18	LAV	0	0	0	0	3,3
	19	ETA	0	0	0	0	40
	20	CHA	0	0	0	0	46,7
	21	SIR	0	0	0	0	16,7

La figure 46 représente les pourcentages d'inhibition de croissance pour chaque sédiment et concentrations testées, les échantillons ont été regroupés par campagne d'échantillonnage. Nous observons, surtout pour les sédiments de la 2ème et 3ème campagne, que pour les deux plus faibles concentrations il y a souvent stimulation de la croissance, et que l'inhibition de croissance des ostracodes s'observe, dans la plupart des cas, pour les concentrations de 30% et 90% en sédiment. Tous les sédiments, à

l'exception du sédiment BB ont présenté des pourcentages d'inhibition de croissance supérieurs à 20%. Les sédiments VID, MOR, BIE et CHA ont présenté des valeurs d'inhibition de croissance supérieures à 50%, le sédiment VID présentant la plus forte inhibition de croissance des ostracodes.

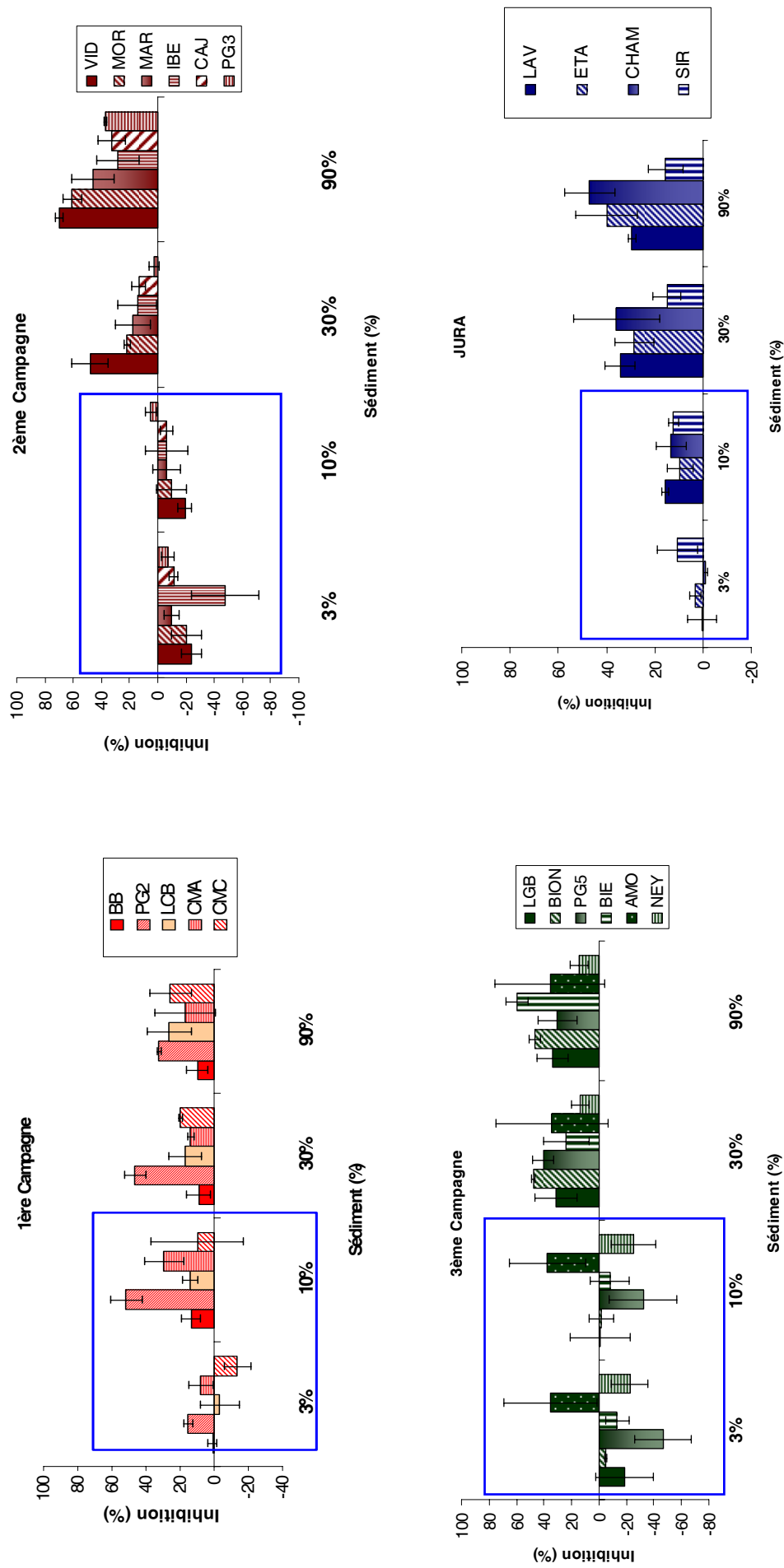


Figure 46: Inhibition de croissance (%) des ostracodes après 6 jours d'exposition aux 21 sédiments naturels de la 1ère, 2ème, 3ème campagnes et aux sédiments provenant du département du JURA pour les 4 concentrations testées. Les carrés bleus indiquent les deux plus faibles concentrations testées (3 et 10%)

Comme mentionné dans la section matériel et méthodes, 5 paramètres d'écotoxicité différents ont été calculés (CL10, pourcentages de mortalité maximal atteint, CI10, pourcentages d'inhibition de croissance maximal atteint et enfin pentes des courbes inhibitions de croissance vs. concentration de sédiment). Les CL10 et CI10 ont été calculés afin d'avoir un maximum de données comparables d'un sédiment à l'autre. Il en est de même pour ce qui concerne les pourcentages de mortalité et de croissance maximal atteints. Enfin les pentes des courbes inhibitions de croissance vs. concentrations de sédiment ont été déterminées en tant que descripteur additionnel (Rand et Petrocelli, 1985). En outre, il est apparu que ce dernier paramètre était bien corrélé aux descripteurs physico-chimiques (cf. Annexe 9).

Les résultats de chaque paramètre sont présentés pour chaque sédiment dans l'annexe 10 . Dans le cadre des études de l'ANR DIESE, nous avons réalisé une ACP avec les résultats relatifs aux 17 sédiments des 1ères, 2èmes et 3èmes campagnes qui ont aussi fait l'objet de tests avec la batterie de macrobiotests. L'ACP obtenue (variance totale expliquée = 71,4 %) permet d'observer la position des cinq paramètres concernés (figure 47). Il en ressort que les deux paramètres relatifs à la mortalité sont relativement redondants; il en est de même pour les trois paramètres relatifs à la croissance.

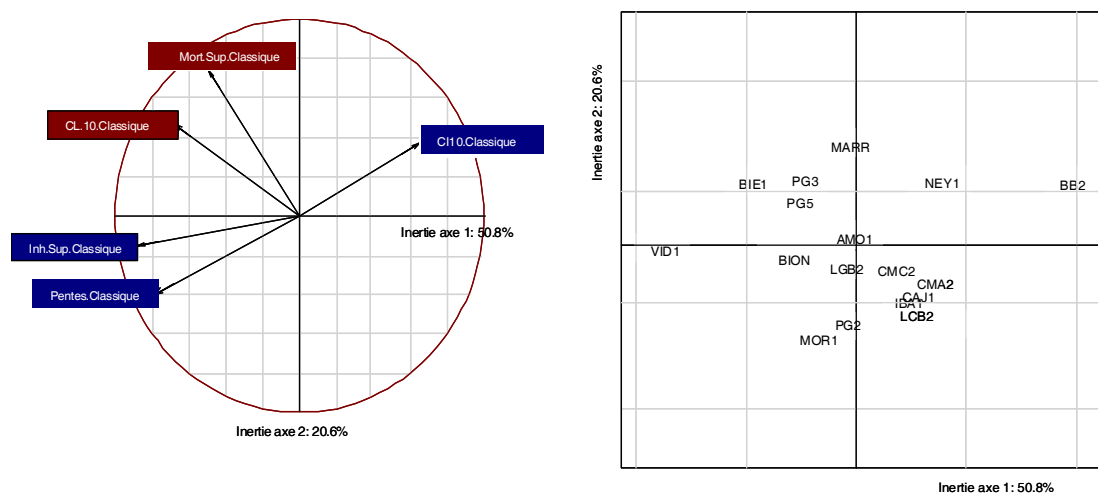


Figure 47 : ACP réalisée sur les cinq paramètres sélectionnés pour évaluer l'écotoxicité des sédiments avec le test ostracode classique. La figure à gauche présente le cercle des corrélations

Nous avons donc sélectionné un paramètre dans chaque groupe de paramètres. C'est ainsi que nous avons retenu le pourcentage d'inhibition de croissance maximal atteint car très proche du cercle des corrélations et aussi de l'axe F1 représentatif, à nos yeux, de l'écotoxicité des sédiments (attesté par les résultats obtenus sur les autres tests de la batterie). De plus ce paramètre est facile et rapide à calculer. En ce qui concerne le critère mortalité, nous avons retenu le pourcentage de mortalité maximal atteint car il était, lui aussi, proche du cercle des corrélations, pratique et rapide à déterminer. En outre, il est quasiment orthogonal par rapport au paramètre précédent. La figure 48 permet d'observer qu'avec ces deux seuls paramètres (pourcentages de mortalité et d'inhibition de croissance maximaux atteints), l'axe 1 reste représentatif de l'écotoxicité mais l'emplacement des sédiments les uns par rapport aux autres est légèrement modifié.

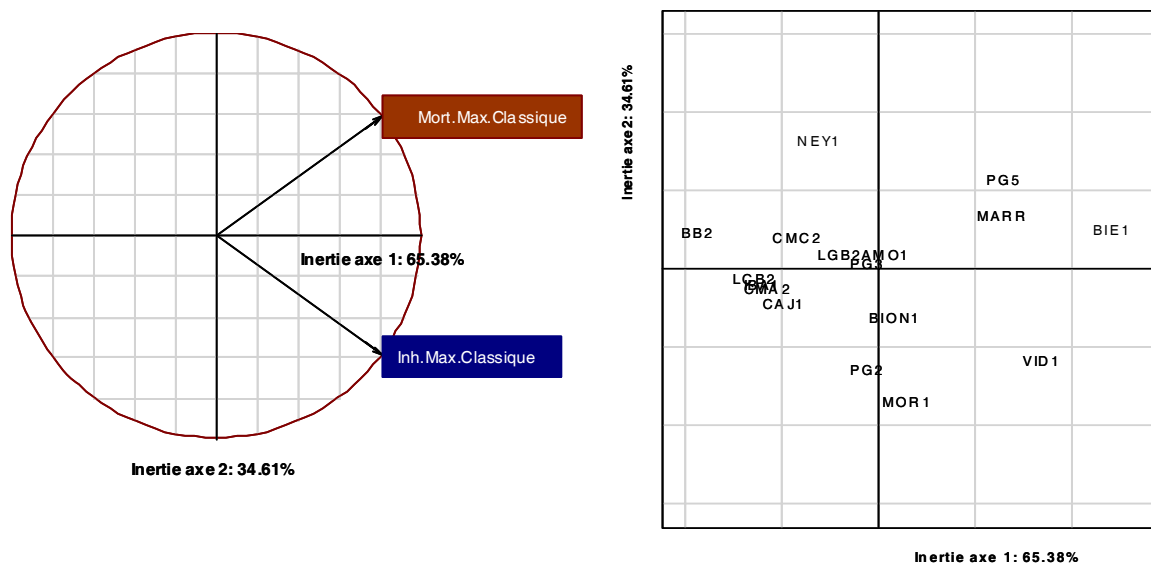


Figure 48 : ACP réalisée sur les deux paramètres sélectionnés pour évaluer l'écotoxicité des sédiments avec le test ostracode classique. La figure à gauche présente le cercle des corrélations

Nous avons réalisé des classifications ascendantes hiérarchisées (distance euclidienne et critère d'agrégation de Ward) avec les deux paramètres (pourcentages de mortalité et d'inhibition de croissance maximaux atteints) et le seul pourcentage d'inhibition de croissance maximal atteint (figure 49A,B). Dans le cadre des autres études réalisées au sein de l'ANR DIESE, nous avons privilégié une approche distinguant trois catégories de sédiments, et donc deux seuils, comme dans l'approche QPEC_m de MacDonald *et al.* (2000). La figure 49B apparaît être plus en accord avec les résultats obtenus avec les autres microbiotests. De ce fait, nous avons choisi d'accorder une préférence au paramètre pourcentage d'inhibition de croissance maximal atteint dans la cadre du calcul d'un indice microbiotest (cf. chapitre 6)

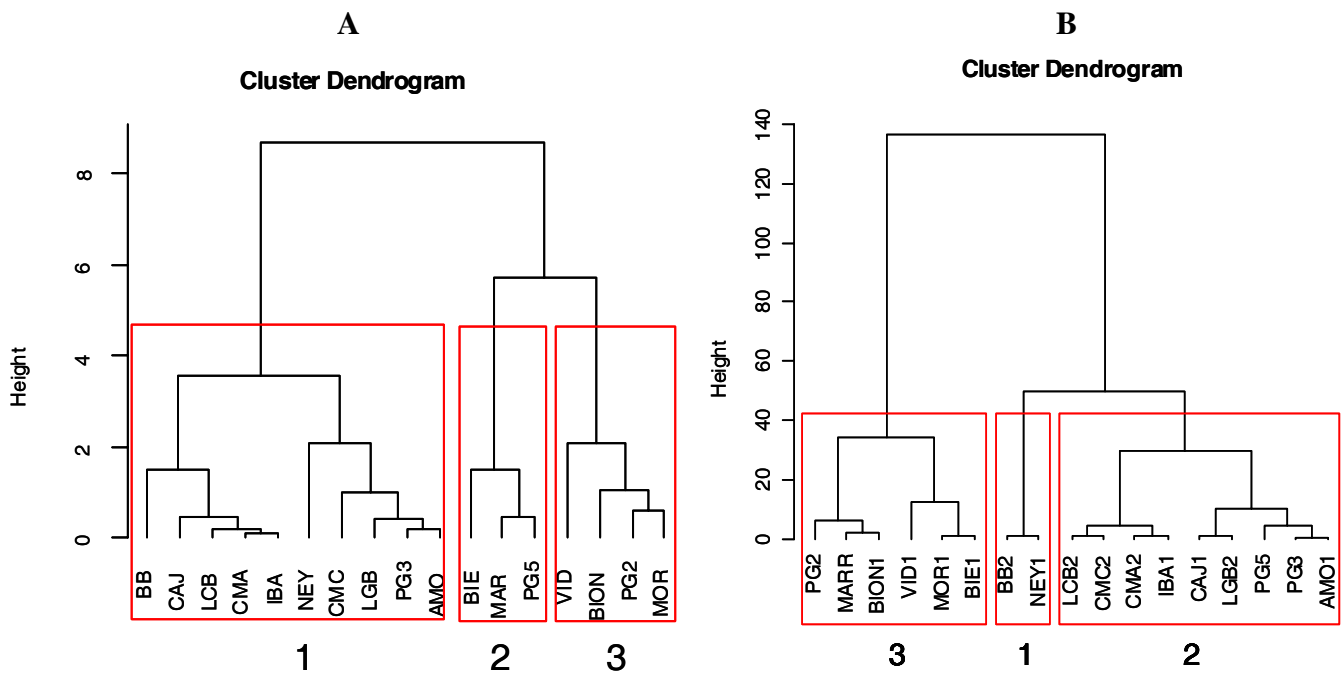


Figure 49: Classification ascendante hiérarchisée (distance euclidienne et critère d'agrégation de Ward) réalisée avec : A) pourcentage maximal de mortalité atteint, B) pourcentage maximal d'inhibition de croissance atteint

En outre, l'analyse de corrélation de Pearson entre les pourcentages de mortalité maximaux atteints et les descripteurs physico-chimiques a montré qu'il existe des corrélations significatives positives ($p < 0,05$) seulement avec le rapport carbone/azote ($r = 0,52$) et le CaCO_3 ($r = 0,52$). En ce qui concerne, le pourcentage d'inhibition de croissance maximal atteint, des corrélations significatives ont été observées avec les PCB totaux ($r = 0,60$), la matière organique ($r = 0,55$), le limon ($r = 0,55$), le sable ($r = -0,53$), l'AVS ($r = 0,49$), les HAP totaux ($r = 0,48$), et des métaux comme le cuivre ($r = 0,69$) et le mercure ($r = 0,59$).

5.4.2 Résultats avec le test modifié

Le tableau 16 résume les résultats de mortalité pour les sédiments testés avec cette méthodologie.

Tableau 16: Mortalité (%) des ostracodes après 6 jours d'exposition aux sédiments naturels avec le test modifié

Sédiment	Code	Sable (100 %)	3%	10%	30%	90%
Sédiments de la 1ère campagne	1	BB	4,2	4,2	4,2	8,3
	2	PG2	8,3	12,5	16,7	12,5
	3	LCB	0,0	4,2	4,2	4,2
	4	CMA	8,3	8,3	0,0	4,2
	5	CMC	8,3	20,8	8,3	12,5
Sédiments de la 2ème campagne	6	VID	0,0	0,0	16,7	95,8
	7	MOR	12,5	0,0	0,0	12,5
	8	MAR	4,2	0,0	16,7	4,2
	9	IBA	4,2	0,0	0,0	4,2
	10	CAJ	8,3	16,7	0,0	4,2
	11	PG3	0,0	0,0	0,0	0,0
Sédiment de la 3ème campagne	12	LGB	4,2	0,0	0,0	16,7
	13	BIO	0,0	16,7	16,7	25
	14	PG5	0,0	12,5	12,5	16,7
	15	BIE	4,2	4,2	0,0	12,5
	16	AMO	8,3	0,0	16,7	25
	17	NEY	12,5	0,0	0,0	8,3
Sédiment JURA	18	LAV	12,5	12,5	0,0	12,5
	19	ETA	0,0	0,0	0,0	8,3
	20	CHAM	8,3	0,0	0,0	16,7
	21	SIR	0,0	8,3	4,2	0,0

Par rapport aux résultats obtenus avec le test classique, nous observons sur les 21 échantillons testés que 9 ont présenté une mortalité inférieure à 15%, 10 ont provoqué une mortalité comprise entre 15 et 30%, et seulement 2 (CHA et VID) ont présenté une mortalité supérieure à 30%, le sédiment VID se caractérise dans ce cas par un pourcentage de mortalité maximal de 100% (par rapport à seulement de 26,7% obtenu avec le test classique).

La figure 50 représente les pourcentages d'inhibition de croissance pour chaque sédiment et concentrations testés. Nous observons, surtout pour les sédiments de la 2^{ème} campagne, qu'il y a stimulation de la croissance pour les plus faibles concentrations (3%). Nous constatons qu'en général avec cette méthode il y a moins de stimulation de croissance qu'avec la méthode classique. Par ailleurs, mis à part les sédiments de la 1^{ère} campagne où les pourcentages d'inhibition de croissance sont quasiment constants quelle que soient les concentrations testées, les relations concentrations-effets semblent dans ce cas plus visibles.

En outre, contrairement aux résultats obtenus avec la méthode classique, nous constatons que 6 sédiments (dont BB) se caractérisent par des inhibitions de croissance inférieures à 20%, et 12 sédiments (PG2, CMC, MOR, MAR, CAJ, BIO, PG5, BIE, AMO, LAV, ETA et CHA) ont présenté des valeurs d'inhibition de croissance supérieures à 50%. En toute logique, il faudrait également y ajouter le sédiment VID, où la mortalité a été très importante pour les plus fortes concentrations (cf. tableau 16). Néanmoins, il faut noter que les résultats du test modifié présentent, en général, des écart-types plus importants que ceux observés avec le test classique.

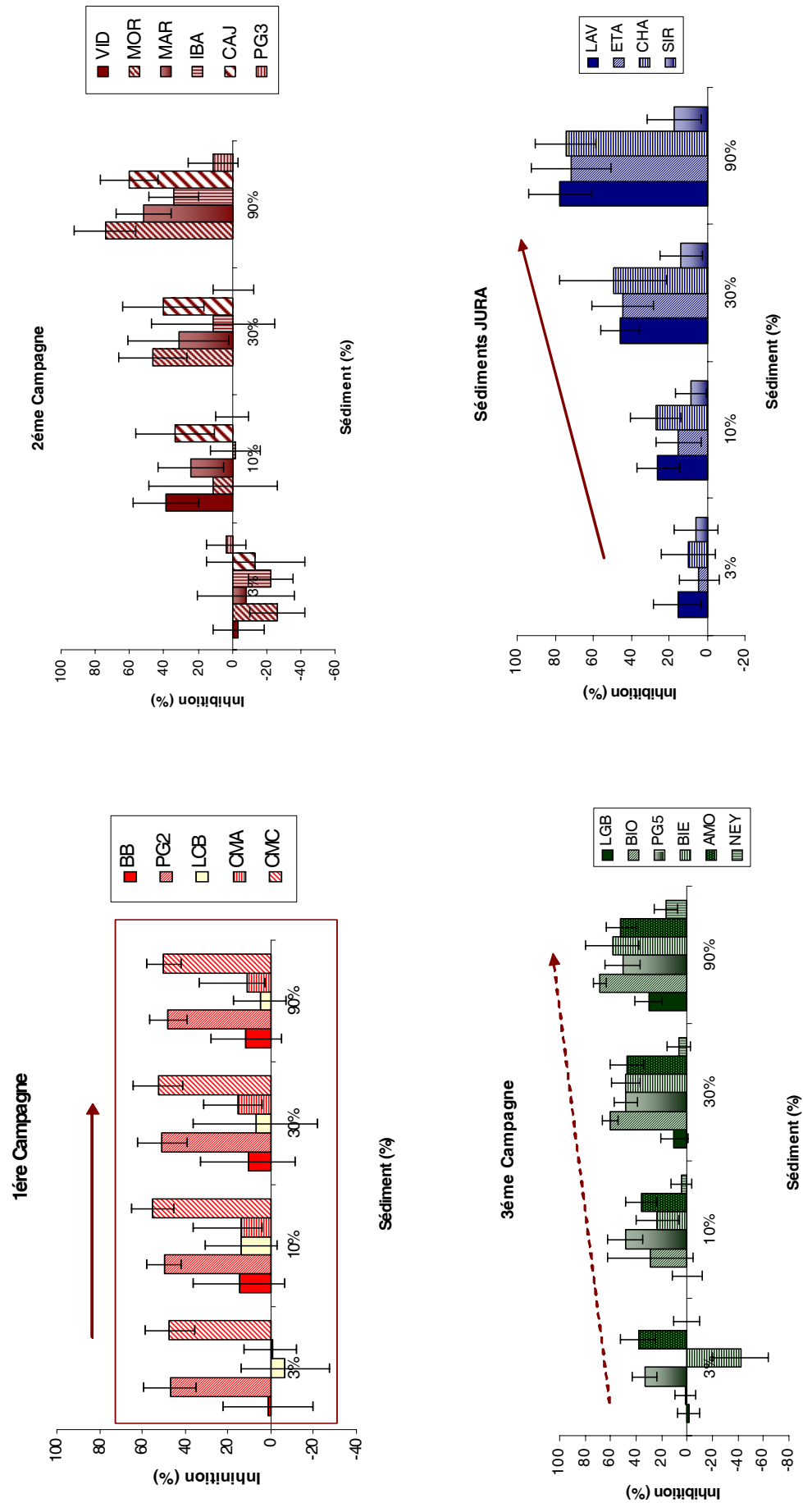


Figure 50: Inhibition de croissance (%) des ostracodes après 6 jours d'exposition aux sédiments naturels de la 1ère, 2ème, 3ème campagnes et aux sédiments provenant du département du JURA pour les 4 concentrations testées

En tenant compte de la remarque qui précède concernant le sédiment VID, nous avons fait l'hypothèse que pour ce dernier l'inhibition de croissance maximale atteinte était de 100 % aux deux plus fortes concentrations. Dans ces conditions, le test de rang de Spearman montre qu'il n'y a pas de différences significatives ($p < 0.05$) entre les classements des sédiments obtenus avec les deux méthodes et ce quel que soit le paramètre considéré (pourcentage de mortalité maximal atteint, pourcentage d'inhibition de croissance maximal atteint), comme l'illustrent les figures 51 A,B.

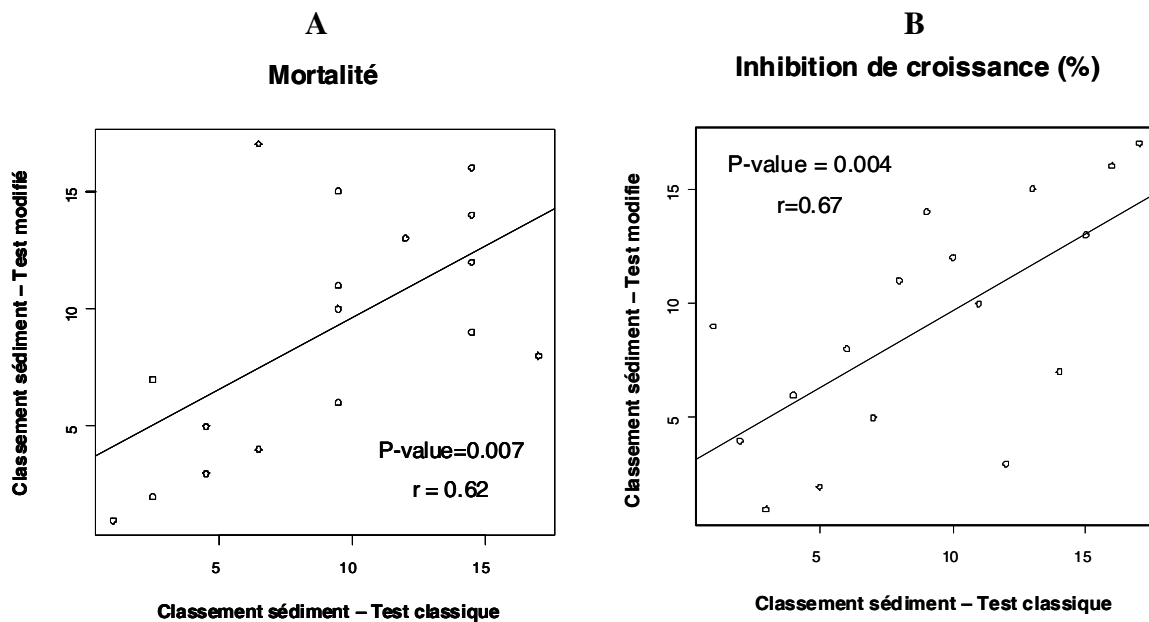


Figure 51 (A, B): Représentation graphique de la corrélation obtenue entre les deux méthodes en utilisant le critère A) pourcentage de mortalité maximal atteint et B) pourcentage d'inhibition de croissance maximal atteint (test de rang de Spearman, seuil 5%)

De la même façon que précédemment, nous avons réalisé des classifications ascendantes hiérarchisées (distance euclidienne et critère d'agrégation de Ward) avec les deux paramètres (pourcentages de mortalité et d'inhibition de croissance maximaux atteints) et le seul pourcentage d'inhibition de croissance maximal atteint (figure 52A,B). Dans les deux cas, le classement des sédiments est modifié par rapport au test classique

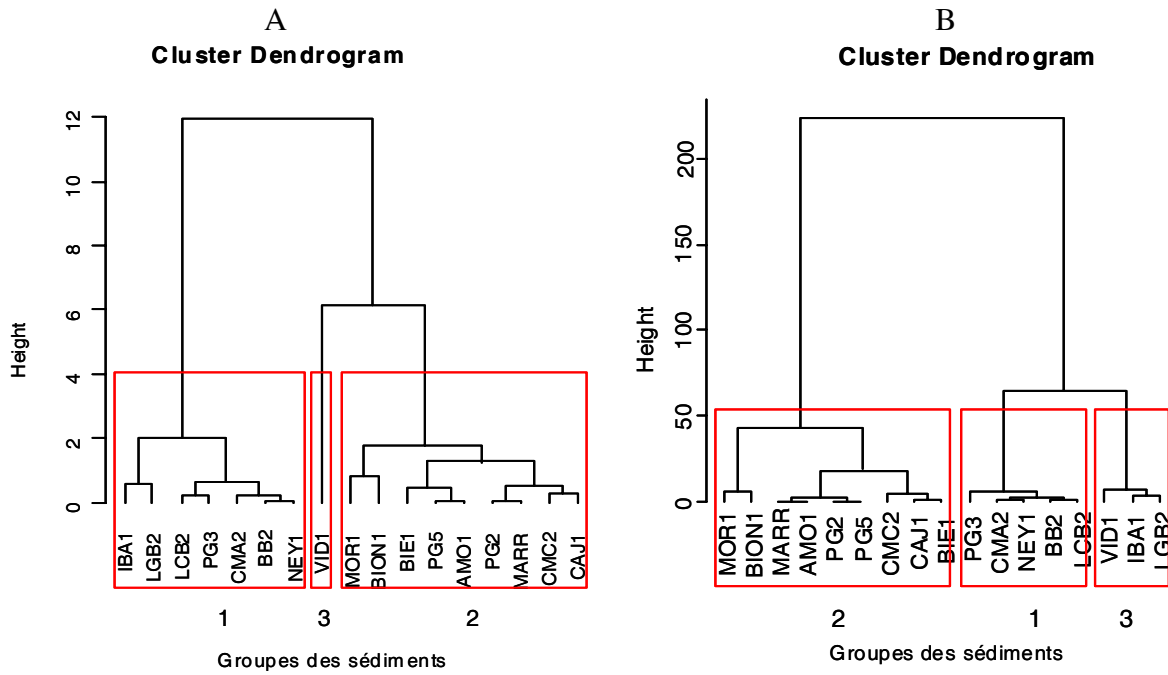


Figure 52 : Classification ascendante hiérarchisée (distance euclidienne et critère d'agrégation de Ward) réalisée avec : A) pourcentage maximal de mortalité atteint, B) pourcentage maximal d'inhibition de croissance atteint – Test modifié

Comme pour le test classique, nous avons corrélé (test de Pearson) les pourcentages de mortalité maximaux atteints et les descripteurs physico-chimiques et il existe dans ce cas des corrélations significatives ($p < 0.05$) avec quelques métaux comme le Cr ($r = 0,58$), le Ni ($r = 0,58$), le Zn ($r = 0,45$) et le Fe ($r = 0,43$). Par contre, la même analyse de corrélation de Pearson réalisée entre les pourcentages d'inhibition de croissance maximaux atteints et les descripteurs physico-chimiques n'a mise en évidence qu'une seule corrélation significative avec le Co ($r = 0,49$).

5.4.3 Discussion des résultats

Le test ostracode classique préconise l'utilisation d'une seule concentration. Certains auteurs diluent le sédiment sec testé avec du sédiment de référence fourni par le kit (Manuzadsanias *et al.* 2007). Quant à nous, nous avons préféré réaliser des dilutions croissantes de sédiment humide en introduisant des quantités pondérales différentes. Ces deux façons de réaliser les différentes concentrations n'ont pas été comparées dans le présent travail, mais la méthode que nous avons choisie permet de tester le sédiment sans modification de texture (granulométrie).

Le test ostracode classique recommande l'utilisation d'un rapport solide/liquide de 1/4. Nous avons formulé l'hypothèse qu'avec un tel rapport solide/liquide, les sédiments (et l'eau interstitielle) seraient trop dilués, ce qui limiterait la sensibilité de détection du test. Pour tester cette hypothèse, nous avons testé une version modifiée du test ostracode en ajustant le rapport solide/liquide à 1/2, afin que l'ostracode soit plus en contact avec les particules du sédiment, sur lesquelles seraient adsorbés des polluants, et en contact avec une phase aqueuse plus concentrée.

D'après les résultats de mortalité, le test modifié semble plus sensible que le test classique puisque les pourcentages de mortalité observés sont plus élevés. Toutefois, la pertinence de ce paramètre semble discutable, car malgré la facilité d'utilisation et le caractère pratique prônés par le fournisseur, les ostracodes restent des organismes fragiles et délicats à manipuler. Au moment de la répartition des individus dans les 24 puits de la microplaque du test modifié nous avons observé qu'une fois l'ostracode déposé dans le puits, celui-ci pouvait se retrouver bloqué au niveau de la surface à cause de la tension superficielle provoquant ainsi la mort de l'organisme. Or, cet effet s'accroît quand le rapport solide/liquide diminue. En effet, au début de nos expériences, nous avons fait des tests préliminaires avec le sédiment de référence pour tester des rapports solide/liquide 1/1 et 1/2 avec des volumes finaux de 1 et de 1.5 mL. Les taux de mortalité obtenus étaient alors de 41,7, 25,0 et 12,5% respectivement pour les combinaisons «1/1 et 1 mL», «1/2 et 1 mL» et «1/2 et 1,5 mL». De plus, nous avons noté que les ostracodes morts se trouvaient à la surface du milieu testé et qu'il s'agissait d'ostracodes de petite taille. Le

volume de 4mL semble donc être optimal dans ce test. Il aurait sans doute été intéressant de tester un rapport solide/liquide de 1/2 avec ce volume mais ceci n'a pas pu être réalisé faute de matériel adéquat et de temps. En effet, nous avons testé parallèlement d'autres améliorations avec l'aide d'étudiants stagiaires (Lena Feuerstoss et Pang-Bo Yang), à savoir l'estimation par analyse d'images et de vidéos (i) de la taille de chaque individu au début de l'essai et (ii) de certains paramètres comportementaux des ostracodes (durée de déplacement, durée d'immobilisation et vitesse de déplacement) en présence de deux concentrations de cuivre (1 mg L^{-1} et $1,8 \text{ mg L}^{-1}$). Dans le premier cas (mesures de taille de chaque ostracode au début de l'essai) les résultats (non fournis) de ces essais n'ont malheureusement pas été concluants malgré les efforts fournis. Concernant les tests comportementaux comme outil de réponse précoce de l'écotoxicité des sédiments, nous avons obtenu des résultats préliminaires (non fournis) lesquels montrent des différences significatives ($p < 0.05$) avec les trois paramètres mesurés entre le témoin et la deuxième concentration du cuivre testé. Ces résultats méritent d'être analysés plus en détail malheureusement par manque de temps cette étude n'a pas pu être achevée et d'autres tests avec des mélanges des polluants pourraient être nécessaires pour confirmer l'utilisation de cet outil pour mesurer les réponses précoces (des précisions sur la méthodologie sont présentées dans l'annexe 11). En outre, il aurait également été intéressant de vérifier si la sensibilité de l'essai peut être améliorée en utilisant un lot d'ostracodes plus nombreux pour mesurer la taille au début de l'essai.

L'inhibition de croissance des ostracodes est un critère d'écotoxicité des sédiments plus pertinent mais également plus sensible que la mortalité (Chial et Persoone 2002, Joner *et al.* 2004, Oleszczuk, 2008). Nos résultats vérifient ce fait dans le cas par exemple du test classique où un plus grand nombre de sédiments présentent une écotoxicité significative ($> 20\%$) lorsque l'on considère l'inhibition de croissance ($n = 18$, cf. Fig. 46) que lorsque l'on considère la mortalité ($n = 8$, cf. Tableau 15). Par ailleurs, les variations représentées par les écart-types dans les résultats d'inhibition de croissance pour les deux méthodes (Figures 46 et 50) pourraient être expliquées par les différences de tailles initiales observées chez les ostracodes. En effet, nous avons observé au début de nos expériences, que la taille des ostracodes n'était pas exactement identique entre les individus. Nous avons voulu mesurer tous les individus au début de l'essai avant de les exposer aux

sédiments, mais nous n'avons pas pu aboutir dans notre démarche du fait de la grande fragilité de ces organismes qui a fortement limité la possibilité de les manipuler.

Le pourcentage d'inhibition de croissance maximal atteint semble être un meilleur estimateur de l'écotoxicité des sédiments naturels que la mesure de CI_{10} ou de la pente de la relation concentrations-effets. De plus, le calcul des CI_{10} et CL_{10} est discutable car pour certains sédiments nous n'avons pas trouvé une relation adéquate concentrations-réponses (cf. figures 46 et 50).

Nous avons pu mettre en évidence dans certains cas (plutôt avec les sédiments de la 1^{ère}, 2^{ème} et 3^{ème} campagnes) une stimulation de la croissance des ostracodes pour les faibles concentrations de sédiment. Cette stimulation de croissance pourrait provenir de la matière organique (MO) présente dans les sédiments, laquelle MO contrôle le développement des ostracodes (Annapurna et Rama Sarma 1982). Il s'agit, selon toute vraisemblance, d'un cas classique de masquage d'écotoxicité où pour de faibles concentrations en sédiment, la MO aurait des effets bénéfiques qui masqueraient les effets délétères des toxiques présents dans les sédiments (Selivanovskaya et Galitskaya 2011). Toutefois, la MO pourrait aussi jouer un rôle contraire à concentrations plus élevées, à partir de nos analyses de corrélation de Pearson nous avons observé une corrélation significative entre le pourcentage d'inhibition de croissance maximal atteint et la MO ($r=0,55$), mais aussi avec les concentrations de PCB totaux ($r=0,60$), et les HAP totaux ($r=0,48$). En effet, du fait des complexes entre la MO et certains polluants comme les HAP et PCB (Castro et Valle, 1995), les organismes se nourrissant de MO, comme *Heterocypris incongruens*, peuvent de ce fait absorber de fortes quantités de ces polluants. La sensibilité de *Heterocypris incongruens* aux HAP ont été déjà montrés par d'autres auteurs (Joner *et al.* 2004, Hamdi *et al.* 2007, Oleszczuk 2008, Coccia *et al.* 2009). Hamdi *et al.* (2007) ont trouvé des corrélations significatives entre les concentrations en anthracène, pyrène et benzo(a)pyrène et la mortalité et l'inhibition de croissance de cette espèce. D'après nos résultats nous pouvons émettre l'hypothèse que l'inhibition de croissance observée sur les ostracodes exposés à certains sédiments pourrait être en grande partie liée à l'ingestion de MO ou des particules de sédiment sur lesquels se seraient fixés des contaminants potentiellement dangereux (HAP, PCB, métaux).

Les résultats des deux méthodes sont corrélés et les différentes analyses des résultats obtenus ne nous permettent pas vraiment de trancher dans un sens ou dans l'autre. Toutefois, la manipulation dans le test classique est plus pratique, plus rapide et moins délicate que celle du test modifié. La version classique du test ostracode est donc celle que nous recommandons dans l'avenir faute de n'avoir pu y apporter des améliorations substantielles.

5.5 Conclusions

L'utilisation du test ostracode avec *Heterocypris incongruens*, permet d'évaluer la toxicité des sédiments, il reflète l'écotoxicité de l'ensemble de l'échantillon en tenant compte des formes adsorbées, susceptibles de se désorber, dissoutes des toxiques présents dans le sédiment. Dans cette étude, l'inhibition de croissance est un critère d'effet qui nous semble plus approprié pour estimer plus efficacement l'écotoxicité des sédiments.

Le test ostracode avec *Heterocypris incongruens*, est donc un test facile à appliquer, peu onéreux, mais il faut impérativement faire attention à ce que l'organisme ne reste pas bloqué à la surface des milieux, au risque d'observer de forts pourcentages de mortalité, y compris dans le témoin. Le point faible de ce test est qu'on ne peut pas vraiment suivre la croissance de chaque ostracode testé parce qu'on ne connaît pas la taille initiale de l'individu et que l'on doit se référer à la taille moyenne de 10 ostracodes issus de la population initiale. Malgré cela, les résultats obtenus dans notre étude seront utilisés pour l'analyse globale des sédiments (voir chapitre 6)

Chapitre 6 : Intégration des réponses de la batterie de microbiotests

6.1 Introduction

Afin d'avoir un regard global de l'écotoxicité des sédiments, il nous est apparu nécessaire d'intégrer les différentes réponses de notre batterie de microbiotests. Pour cela, nous avons adapté à nos tests deux méthodes d'intégration déjà développées : l'IBR (Integrative Biomarker Response) et l'indice PEEP (Potential Ecotoxic Effects Probe). L'utilisation d'une batterie de microbiotests constituée de trois des microbiotests présentés précédemment (Microtox phase solide, Luminotox phase solide et le test ostracodtoxkit) et l'intégration de leurs résultats ont fait l'objet d'une publication à soumettre dans le journal **Science of the Total Environment**. Les résultats discutés proviennent de l'application de la batterie de microbiotests et des deux méthodes d'intégration sur 17 sédiments provenant des 1^{ère}, 2^{ème} et 3^{ème} campagnes.

6.2 Résultats: Publication à soumettre

A novel microbiotest battery to assess and compare the ecotoxicity of freshwater sediments

Karen F. Burga-Pérez^{1,2}, Simon Devin^{1,2}, Marc Babut³, Jean-François Férard^{1,2}

¹ **Université de Lorraine**, LIEBE (Laboratoire des Interactions Ecotoxicologie, Biodiversité, Ecosystèmes), UMR 7Franceetz, F-57070, France

² **CNRS**, LIEBE (Laboratoire des Interactions Ecotoxicologie, Biodiversité, Ecosystèmes), France146, Metz, F-57070, France

³ **IRSTEA**, UR MALY, F-69336 Lyon, France

6.2.1 Abstract

Three solid phase microbiotests were selected as screening tools to evaluate the ecotoxicity of seventeen natural sediments. The microbiotests battery involves the Microtox® Solid Phase Assay, the Luminotox solid phase assay and the Ostracodtoxkit™. Results showed that the three microbiotests discriminate the sediments according to their ecotoxicity. In addition, correlation analysis between each endpoint and the physico-chemical parameters measured on the sediments was highly variable among the endpoints of the three microbiotests, the only consistent result being the significant correlation with the percentage of silt and sand in the sediments. The different microbiotests also responded differently to the same sediment confirming the fact that each test has its own specific sensitivity. In order to have a global view of the battery responses, the IBR (Integrated Biotest Responses) and modified PEEP (Potential Ecotoxic Effects Probe) indices were applied and compared. Results showed that both indices were significantly correlated, but no significant correlation was found with Q_{PEC}

(Quotient of measured pollutant concentration to Probable Effect Concentration (PEC) defined by Mac Donald *et al.* (2000)) values.

6.2.2 Introduction

Among the compartments of aquatic ecosystems that must be monitored, evaluated and protected, sediments are essential in this respect. Indeed, sediments constitute the final deposition of pollutants trapped by suspended solids in the water column. Through resuspension, sediments could act as endogenous sources of contamination, becoming a primary factor in the degradation of surface water quality (Appleby & Scarratt 1989, Chapman *et al.* 1998, Eggleton & Thomas 2004)

Hazards associated with polluted sediments have been initially extrapolated from methods that only consider quantification of contaminant concentrations (e.g. mean quotient of measured contaminant concentrations to predicted effect concentrations or Q_{PEC} , (MacDonald *et al.* 2000). However several authors have claimed that these methods are insufficient to assess the potential ecotoxicity of contaminated sediments. Bioassays play an important role in the assessment of ecotoxicity of sediments because (i) they evaluate the bioavailable fraction of the contaminants, and (ii) they integrate the effects of all contaminants including additive, synergistic, and antagonistic effects (Vasseur & Férard 1993, Cleveland *et al.* 1997, Pedersen *et al.* 1998, Volpi-Ghirardini *et al.* 1999, Lee *et al.* 1999).

Microbiotests have been used widely as an evaluating tool of aquatic contaminated environments because of their low cost and easy application (Blaise 1991, Janssen *et al.* 2000). They have mainly been applied on aqueous elutriates, interstitial waters and/or organic extracts (Bombardier & Bermingham 1999, Chial & Persoone 2002). Moreover several authors proposed appropriate tests to evaluate the potential ecotoxicity of the solid phase (Brouwer *et al.* 1990, Blaise & Ménard 1998, Lannalainen *et al.* 1999, Chial & Persoone 2002, Blaise *et al.* 2004, Dellamatrice *et al.* 2006) The assessment of whole sediment may provide more information about ecotoxic effects because all possible

pathways of contaminant uptake are taken into account such as particle contact, food, pore water (Feiler *et al.* 2005).

Various classification and scoring systems have been developed to assess ecotoxicity effluents, wastewaters, sediments and soils, such as the Potential Ecotoxic Effects Probe (PEEP, Costan *et al.* 1993), the Potentially Affected Fraction (PAF, Roghair *et al.* 1997), the sediment toxicity index (SED-TOX, Bombardier & Bermingham 1999), the waste PEEP index (Férard et Ferrari, 2005). Advantages and limitations of some indices have been compared recently (Manudsadzianas *et al.* 2010). The SED-TOX index has been extensively discussed by Bombardier (2005). The integrated biomarker responses (IBR) index approach initially combines several biomarkers responses into a general stress index using organisms such as mussels or fish (Beliaeff & Burgeot 2002, Damiens *et al.* 2007, Oliveira *et al.* 2009, Serafim *et al.* 2012). But this index could be applied on other biological responses. In this study, a multi-trophic battery composed of three solid phase microbiotests was applied to screen the potential ecotoxicity of 17 sediments. In order to have a global view of battery responses, we adapted the IBR index to biotest responses and called it Integrated Biotest Responses and we compared it to the PEEP index (Costan *et al.* 1993) and to Q_{PEC} scores (MacDonald *et al.* 2000).

6.2.3 Material and Methods

6.2.3.1 Natural sediments

Seventeen sediment samples were collected from different sites in France (n=16) and Switzerland (n=1). They were selected according to their contamination profile and variations in their structural properties (grain size distribution and organic matter). Samples were stored at 4°C until the tests were performed and a subsample was taken for physical and chemical characterization. Most of the parameters measured were managed by the IRSTEA (Lyon, France). The pH measurement was performed using a pH meter (Ponselle PVRT-EC). The Eh measurement was performed with an electrode Pt-Ag/AgCl (Ponselle PVRT-EC). The electrodes were positioned at 5 cm of depth in the

sediments and the measurements were performed in triplicate after 10 minutes of equilibration. Then, the results were adjusted using a standard hydrogen electrode (SHE). The grain-size distribution was measured on wet sediment with a Coulter LS-100, according to Loizeau *et al.* (1994). To calculate the percentage of humidity, 100g of each sediment were dried for 48 hours at 50°C. The dried sediments were crushed to the analyses of carbonates, nitrogen and organic carbon, organic matter (OM) by loss of ignition (AFNOR, 2000). The quality of OM contained in the sediment was measured by determination of the amount in nitrogen (N) and carbon (C), to calculate the ratio C/N. The analysis of metals (As, Cd, Co, Cr, Cu, Fe, Hg, Mn, Ni, Pb and Zn) was performed by ICP-MS (Thermo X7 series II) according to a standardized method (ISO, 2005). Mercury was analyzed directly on the dry sediment and measured by an automated Hg analyzer (AMA-254) following a standardized procedure (US EPA, 1998). The accuracy of measurement methods is routinely checked with certified reference material sediment (IAEA-433, IAEA-158). Finally, PAHs and PCBs analyses were performed to another laboratory LDA (La Drome Laboratoires, France), following the standard procedure (AFNOR, 2000).

The potential risk associated to global contamination of sediments was determined according to the consensus based sediment quality criteria of MacDonald *et al.* (2000). The mean quotients of all measured contaminant concentrations to their respective predicted effect concentrations (Q_{PEC}) were calculated for all sediments.

6.2.3.2 Microbiotests

a) Microtox solid phase assay

The Microtox® solid phase assay (MSPA) is based on the inhibition of bioluminescence of the marine bacteria *Aliivibrio fischeri* (Urbanczyk *et al.* 2007). This test has become one of the most popular for the evaluation of solid phase matrices (van Beelen 2003) and has been included in several studies to assess the potential ecotoxicity of sediments as a representative of decomposer organisms in aquatic environments (Mankiewicz-Boczek *et*

al. 2008, Mamindy-Pajany *et al.* 2011). The test uses the lyophilized luminescent marine bacteria *A. fischeri*. It was performed according to Doe *et al.* (2005). Reagents and material as tubes and filters adapted to MSPA were supplied by R-Biopharm (Lyon, France). Prior to the experiments, bacteria were reconstituted with 1 mL of reconstitution solution. The suspension was added and placed in the reagent well of the Microtox® analyzer for at least one hour. During this time, sediment dilutions were prepared according to the protocol of Burga Pérez *et al.* (2012). After reconstitution and preparation of sediments dilutions, bacteria were exposed to each dilution of sediment for 20 minutes. At the end of the exposure, a column filter was pushed in and 0.5 ml of supernatant containing exposed bacteria was transferred to a new borosilicate tube. Light output was measured after 5 minutes with a Microtox® Analyzer 500.

In a previous work (Burga Pérez *et al.* 2012), we have demonstrated the existence of a bias associated with the finest particles and proposed a correction method. This correction was applied to the results of the MSPA and a percentage of bioluminescence inhibition was calculated as well as the corresponding IC₅₀.

b) Luminotox solid phase assay

The Luminotox solid phase assay (LSPA) uses photosynthetic enzyme complexes (PECs) and a fluorometer specially adapted for measuring fluorescence from their photosynthetic activity. Dellamatrice *et al.* (2006) developed the LSPA to assess the potential ecotoxic effect of sediments. The biological material was isolated thylakoids from spinach extracts (PECs), supplied by (Lab-Bell Inc., Trois-Rivières, Qc, Canada). These PECs were rehydrated in a reagent buffer (50 mM HEPES and 330 mM sucrose at pH 7.5) and stabilized during 15 minutes prior to the experiments. Sediments dilutions were prepared with Milli-Q water. After stabilization, 100 µL of rehydrated PECs were added to 2 mL of diluted sediments and were incubated in the dark during 15 mn. At the end of this time the same type of column filter used in the MSPA (diameter of 6 mm,, thickness of 4 mm, and pore size from 15 to 45 µm) was pushed in and approximately 2 ml of supernatant containing post exposed PECs were transferred to a PMMA reading cuvette with four optic faces (Dutscher, No 391002). Each cuvette was placed into the

LuminoTox Analyzer (supplied by Lab Bell, Canada) to measure F2 and F1 values (see below), which are measured at a wavelength >700 nm after light excitation at 470 nm. The first parameter (F2) corresponds to the fluorescence related to reduced plastoquinone Qa after rapid application of a high light intensity excitation of the thylakoids within the instrument, and F1 relates to fully oxidized Qa after corresponding application of a low light excitation of the thylakoids (Dellamatrice *et al.*, 2006). These parameters allow calculation of the photosynthetic efficiency (Φ_p) according to the following formula:

$$\Phi_p = \frac{F2(\text{sample}) - F1(\text{sample})}{F2(\text{control})}$$

Photosynthetic efficiencies calculated for each samples (tested in triplicate) allowed determination of the percentages of inhibition compared to control in order to generate a concentration-response curve and to determine an IC50.

c) Ostracodtoxkit assay

The Ostracodtoxkit assay was developed by Chial & Persoone (2002) using the ostracod *Heterocypris incongruens*. This organism was chosen to represent the effects on benthic invertebrate species. This test, since its development, has been increasingly used to assess natural or spiked sediments and sludges (Joner *et al.* 2004, Hamdi *et al.* 2007, Coccia *et al.* 2009, Kudlak *et al.* 2011). The ostracod test was conducted according to the protocol of Chial and Persoone (2002) with some modifications (see below). In this assay, the cysts of *H. incongruens* supplied by R-Biopharm (Lyon, France) were incubated during 52 hours at 25°C under continuous light. After hatching, juvenile ostracods were transferred into 6-well polystyrene microplate (36 mm diameter). Every well contained 1 ml of diluted sediment, 2 ml of medium standard fresh water (previously oxygenated) and 2 mL of a *Pseudokirchneriella subcapitata* solution at 2×10^7 cells/mL. We tested four dilutions for each sample of sediment (3%, 10%, 30% and 90%) and a control using reference sediment supplied with the kit. Each condition was tested with three replicates. After the preparation of the exposure medium, ten juvenile ostracods were placed in each well, and were incubated in the dark at 25°C for 6 days. In addition, at the beginning of the

assay, 10 ostracods were isolated and immobilized with a few drops of Lugol to measure their size (L0). At the end of the test, organisms were counted per well and then immobilized with a few drops of Lugol to measure their size. Mortality (%) was calculated from the number of dead organisms at the end of the assay. Modifications were related to i) prefeeding of ostracods that have been made with *P. subcapitata* (instead of *Spirulina platensis*), ii) several sediment concentrations (instead of one) were tested simultaneously, iii) feeding of ostracods with a *P. subcapitata* solution at 2×10^7 (instead of $1.5 \text{ cells} \times 10^7$) cells/mL. All these modifications gave accurate results for controls.

Growth inhibition was determined for live ostracods at the end of the assay, and was calculated according to the following formula:

$$\text{Inhibition (\%)} = 100 - (\Delta L_i / \Delta L \text{ témoin}) \times 100$$

where

i = Sediment dilution tested (3%, 10%, 30%, 90%)

ΔL (μm) = Variation of size of the ostracods,

L_i = Average size (μm) of the organisms for every well,

L0 = Average size (μm) of 10 organisms at beginning of the assay

6.2.3.3 Integration of results

a) Integrated Biotest Responses (IBR)

The index was adapted from the Integrated Biomarker Responses (IBR) developed by Beliaeff et Burgeot (2002). In our study, data of each microbiotest results were first standardized (Y_i) for all tested sediments, according to the formula:

$$Y_i = (X_i - m) / s$$

where:

X_i (i ranging from 1 to 17) corresponds to the result of each microbiotest

m = Average response of all sediments tested for one microbiotest

s = Standard deviation of all sediments tested for one microbiotest

Then, the individual score (S_i) was calculated:

$$S_i = Y_i + |\min|$$

where :

$|\min|$ represents the absolute value of Y_i minimum along all the sediments tested.

The results were graphically summarized with a radar diagram for each sediment. The final IBR score was calculated from the total area of the triangle formed by each individual score.

b) PEEP index

The PEEP index was developed by Costan *et al.* (1993) to classify waste effluents according to their ecotoxic load. We adapted the PEEP index (P) to our context study and it was calculated according to the formula:

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

where N is the number of tests, n the number of tests to which the answer is different from the control and T_i correspond to the response obtained for the i^{th} microbiotest in toxic units.

6.2.3.4 Statistical analysis

The IC_{50} s and their 95% confidence intervals were calculated with the MS Excel macros package REGTOX EV7.0 (http://www.normalesup.org/~vindimian/fr_index.html) and expressed in grams of dry weight of sediment per liter ($g L^{-1}$).

A Principal Component Analysis (PCA) was applied on the data set composed by 17 sediments and 32 physico-chemical parameters and also on a data set composed by 17

sediments and the three selected microbiotests responses (after suppression of ASPA data, see below for explanations).

Pearson correlation coefficients were calculated to analyze the correlation between the physico-chemical parameters of sediment and the IC_{50} values obtained with microbiotests. Spearman's rank correlation coefficient analysis was performed to test sediment rank differences between series of data of indices (Q_{PEC} , IBR and PEEP).

6.2.4 Results

6.2.4.1 Sediment characterization

Figure 53 illustrates the results of the PCA performed on the physico-chemical parameters of the sediments. The two first PCA axes explained 39.4% and 17.2% of the total variance, respectively. Results of the analysis suggest that the first axis describes a global contamination gradient, most of the pollutants being negatively correlated with the first axis. The scores of the sediments on the second axis likely gives some information about the nature of the contamination, since there are different pollutant groups found on the positive and negative side of the axis. The analysis also revealed that a group of contaminants (mostly composed of PAHs), located in the part of the factorial plane defined by negatives values for both axes, seemed to be correlated with the silt and the organic matter. Figure 53b shows the distribution of the sediments according to their physico-chemical characterisation. Sediment VID seems to have the highest global contamination opposite to the sediments NEY and BB characterized by a lower concentration of contaminants and a particle size conformed mostly by sand.

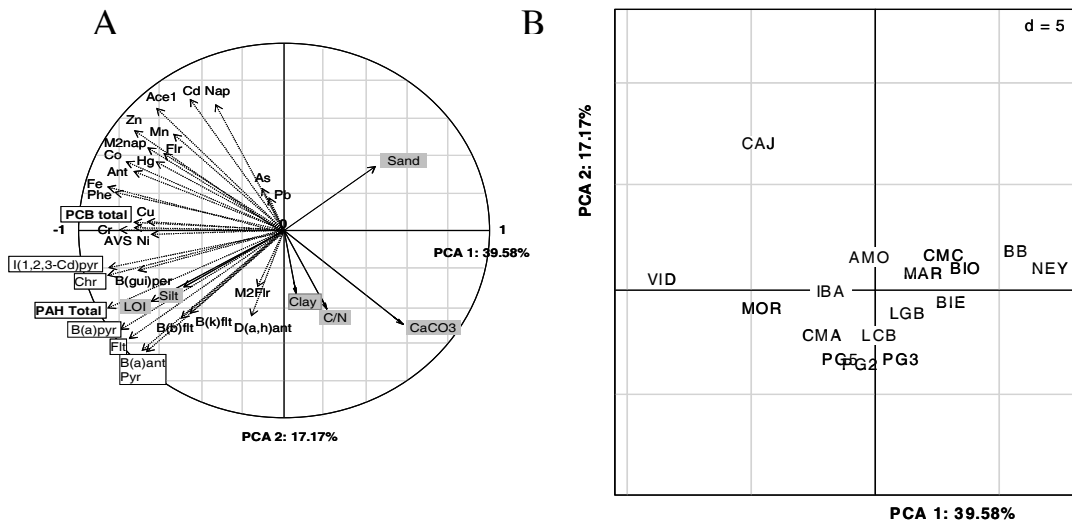


Figure 53: Principal component analysis performed on the 17 sediments x 32 physico-chemical parameters data set. A) Correlation circle of the physico-chemical parameters on the first factorial plane, B) distribution of the sediments on the first factorial plane according to their physico-chemical characteristics.

According to their Q_{PEC} values, sediments can be categorized into three classes. BB and NEY that did not present potential ecotoxic effects were classified in class 1 ($Q_{PEC} < 0.1$). Most of the tested sediments (7 samples) presented Q_{PEC} values between 0.1 and 0.5 (class 2) suggesting that these samples could present potential ecotoxic effect. Sediments MOR, CAJ, VID and AMO presented major ecotoxic effects ($Q_{PEC} > 0.5$, class 3).

6.2.4.2 Microbiotests

a) Microtox solid phase assay

The IC_{50} values calculated for each tested sediment are presented in table 17. Sediments BB, IBA and CAJ showed the highest IC_{50} values and sediments CMA, VID and PG3 the lowest IC_{50} values, sediment VID being the most ecotoxic. Pearson's correlation analyses with physico-chemical parameters revealed that IC_{50} s exhibited a significant negative correlation with silt ($r = -0.52$, $p = 0.03$) and a positive correlation with sand ($r = 0.53$, $p = 0.03$). No correlations with total metals, PAHs or PCBs were found with this bioassay.

b) Luminotox solid phase assay

Ecotoxicity data expressed by IC_{50} after 15 minutes of exposure to sediment concentrations are shown in the table 17. Sediments BB, NEY and BIO displayed the highest IC_{50} values and sediments VID, MAR and PG2 the lowest, sediment VID being again the most ecotoxic sample. Pearson's correlation analyses with physico-chemical parameters revealed significant correlations with silt ($r = -0.79$, $p = 0.0002$), sand ($r = 0.79$, $p = 0.0002$), organic matter ($r = -0.56$, $p = 0.02$), and some metals like chromium ($r = -0.72$, $p = 0.001$), iron ($r = -0.76$, $p = 0.0004$), cobalt ($r = -0.70$, $p = 0.002$), nickel ($r = -0.77$, $p = 0.0003$), manganese ($r = -0.53$, $p = 0.03$) as well as total PAHs ($r = -0.58$, $p = 0.014$) and some specific PAHs like benzo-a-anthracene ($r = -0.54$, $p = 0.03$), benzo-b-fluoranthene ($r = -0.55$, $p = 0.02$), benzo-ghi-perylene ($r = -0.62$, $p = 0.007$), fluoranthene ($r = -0.53$, $p = 0.03$), indeno-1,2,3-cd-pyrene ($r = -0.51$, $p = 0.04$), and chrysene ($r = -0.53$, $p = 0.04$).

c) Ostracodtoxkit test

The maximum percentages of mortality calculated for tested sediments are shown in Figure 54. Of the 17 samples, seven sediments did not cause any mortality, seven samples caused between 13 and 20% of mortality and the other six caused mortality higher than 30%, with sediment BIE exhibiting the highest mortality (60%). Figure 2 also displays the percentage of maximum growth inhibition for each sediment. All sediments, with the exception of BB, showed a growth inhibition percentage higher than 20%. Sediments VID, MOR, BIE caused the highest growth inhibition. For most sediments, the percentage of maximum growth inhibition was the more sensitive endpoint and was chosen for calculation of indices (see below). Pearson's correlation analyses revealed a significant correlation with silt ($r = 0.55$, $p = 0.02$) and sand ($r = -0.53$, $p = 0.03$), organic

Tableau 17: Results of the Microtox solid phase assay, Luminotox solid phase assay for the 17 tested sediments

Sediments	<i>Microtox solid phase assay</i>			<i>Luminotox solid phase assay</i>		
	IC50 (g dry weight/L)	Confidence Interval (95%)		IC50 (g dry weight/L)	Confidence Interval (95%)	
BB	48.7	37	71.5	120.6	103.6	142.5
PG2	9.6	7.5	12	6.3	5.8	6.9
LCB	6.7	5.3	8.3	46.5	41.9	51.7
CMA	0.9	0.8	1.0	13.1	11.0	15.3
CMC	3.7	3.5	4	7.8	6.8	8.8
VID	0.067	0.06	0.07	3.2	3.9	5.01
MOR	1.0	0.95	1.1	6.5	4.6	8.9
MAR	0.8	0.73	0.96	4.67	4.31	5.06
IBA	20.7	16.97	25.7	14.7	12.3	17.6
CAJ	14.7	13.2	16.4	16.8	14.5	19.1
PG3	0.5	0.3	0.7	11.9	10.3	13.8
LGB	2.4	1.6	3.4	31.0	24.6	37.1
BIO	8.1	7.2	9.0	87.0	80.1	94.1
PG5	1.59	0.82	1.62	48.7	43.7	53.9
BIE	1.3	0.9	1.8	25.5	22.9	28.6
AMO	1.3	1.0	1.7	18.7	17.0	20.2
NEY	5.6	3.9	7.7	125.5	101.7	152.7

matter ($r=0.55$, $p=0.02$), AVS ($r=0.49$, $p=0.043$), some total metals like chromium ($r=0.51$, $p=0.04$), iron ($r=0.48$, $p=0.05$), copper ($r=0.69$, $p=0.002$), mercury ($r=0.59$, $p=0.01$), total PCBs ($r=0.60$, $r=0.01$), total PAHs ($r=0.48$, $p=0.049$), benzo-b-fluoranthene ($r=-0.55$, $p = 0.02$), fluoranthene ($r= 0.55$, $p=0.02$)

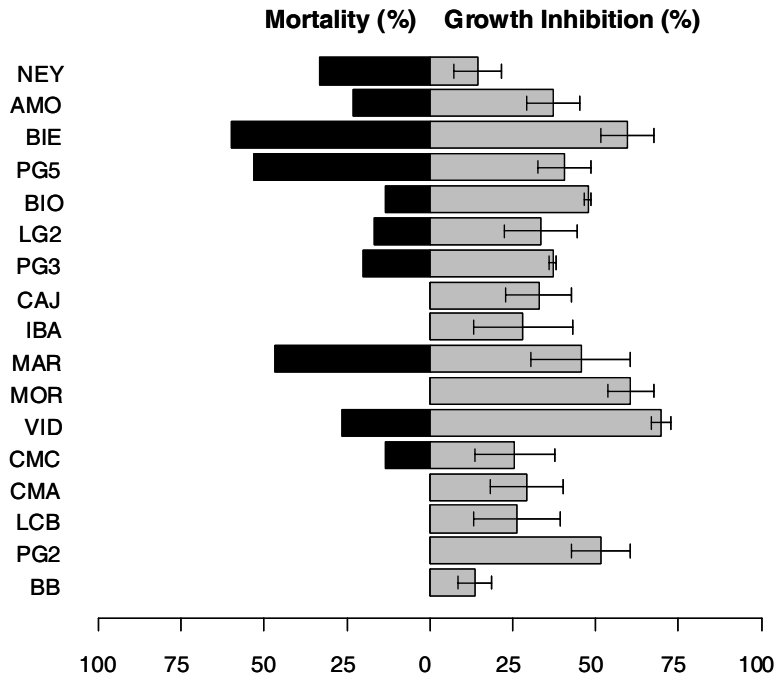


Figure 54: Maximum percentage of mortality (on the left) and maximum percentage of grow stracodition (on the right) of the ostracod *Heterocypris incongruens* exposed to the 17 tested sediments

6.2.4.3 Integrating the responses

a) Multivariate analysis

Figure 55 shows the correlation circle between the microbiotest endpoints and the two first principal components which explained respectively 68.4% and 16.6% of the total variance. The first axis describes an ecotoxicity gradient with ostracods for MSPA and LSPA and low ostracod growth inhibition (i.e. low ecotoxicity) that were associated with the positive side of first principal component. The distribution of the sediments on the first factorial plane located the sediment according to the gradient of toxicity. On the negative side of the first principal component, sediments VID, MOR, PG2, BIE and MAR corresponded to high ecotoxic effects and on the other side of the axis, sediments BB and NEY exhibited particularly low ecotoxic effects.

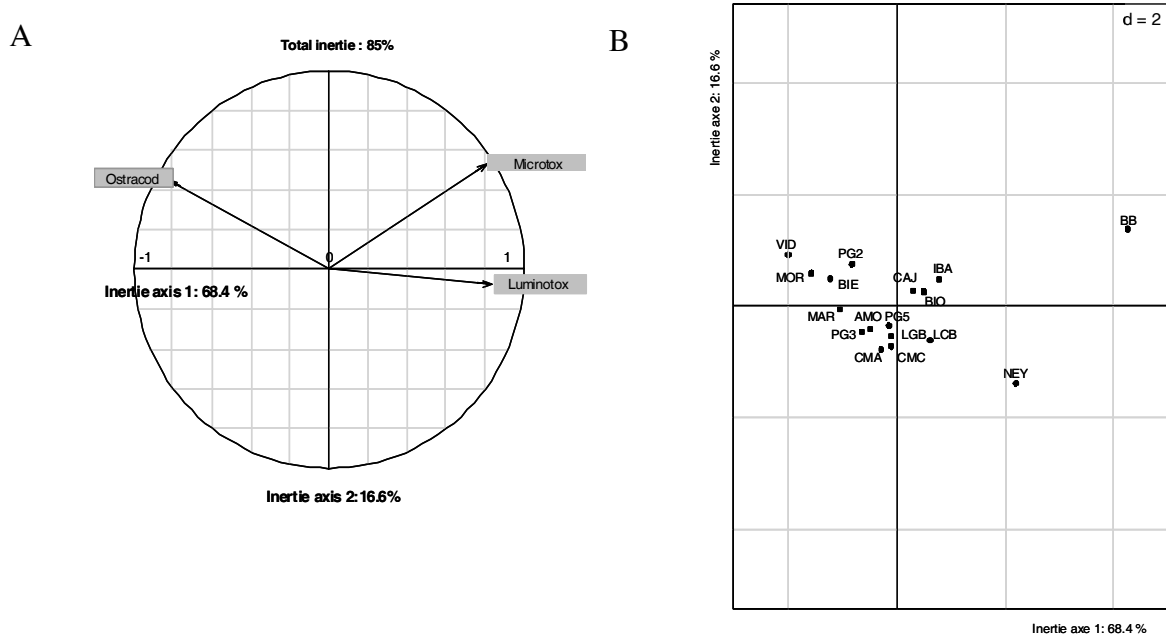


Figure 55: Principal components analysis performed on the 17 sediments x 3 microbiotests' array A) Correlation circle between microbiotests endpoints and the two first principal components, B) distribution of sediments according to their microbiotest endpoints values

b) Indices to integrate the response of microbiotests

Results: corrected MSPA (IC_{50}), LSPA (IC_{50}), and ostracod test (percentage of growth inhibition) were selected to build an integrated biotest response index (IBR). The graphic representations of the IBR for each of the 17 sediments are presented in the figure 56. For each sediment, the area of the triangle represents the IBR score obtained from the integration of the normalized endpoints of all the microbiotests. The IBR representation provides information on both the global integrated response and the individual test responses.

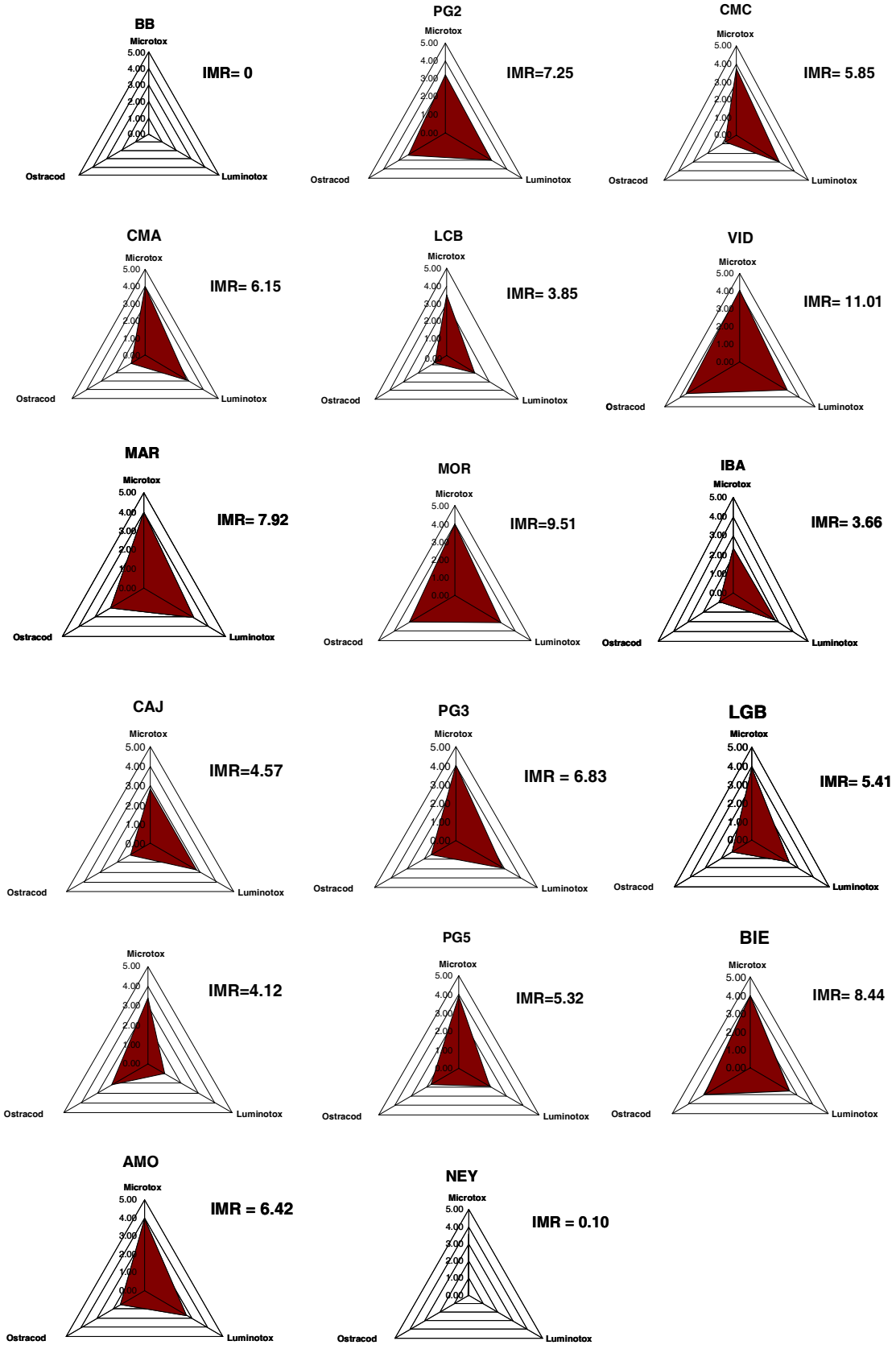


Figure 56: Graphical representations of the IBR for the 17 sediments tested

The IBR scores in our study varied from 0 to 11, and sediments were ranked according to these scores (Table 18). BB and NEY sediments had the lowest scores whereas VID and MOR sediments obtained the highest. Pearson's correlation analyses were performed between physico-chemical characteristics of the sediments and IBR scores. Results revealed significant correlations ($p < 0.05$) with organic matter ($r = 0.59$), silt ($r = 0.73$), sand ($r = -0.72$), AVS ($r = 0.52$), some metals as Cr ($r = 0.70$), Fe ($r = 0.66$), Co ($r = 0.55$), Ni ($r = 0.72$), Cu ($r = 0.67$), Hg ($r = 0.49$), total PCBs ($r = 0.56$), total PAHs ($r = 0.56$), benzo-a-anthracene ($r = 0.53$), benzo-a-fluoranthene ($r = 0.58$), benzo-ghi-perylene ($r = 0.49$), fluoranthene ($r = 0.62$) and pyrene ($r = 0.51$).

Tableau 18: Ranking of sediments according to QPEC score, IBR index and PEEP index

Sediments	Q _{PEC} score		IBR index		PEEP index	
	Score	Ranking	Score	Ranking	Score	Ranking
BB	0.04	2	0	1	0.85	1
PG2	0.15	4	7.25	13	1.47	6
LCB	0.19	8	3.85	4	1.29	5
CMA	0.23	11	6.15	10	2.09	14
CMC	0.21	9	5.85	9	1.62	8
VID	0.72	16	11.01	17	3.17	17
MOR	0.53	14	9.51	16	2.07	13
MAR	0.23	12	7.92	14	2.16	15
IBA	0.27	13	3.66	3	1.15	2
CAJ	0.7	15	4.57	6	1.18	3
PG3	0.14	3	6.83	12	2.34	16
LGB	0.22	10	5.41	8	1.68	9
BIO	0.15	5	4.12	5	1.22	4
PG5	0.15	6	5.32	7	1.83	10
BIE	0.17	7	8.44	15	1.93	11
AMO	2.49	17	6.42	11	1.93	12
NEY	0.02	1	0.1	2	1.49	7

The PEEP index scores are also summarized in table 2, where scores varied from 0.83 to 3.17. Sediments BB, IBA and CAJ were characterised by the lowest PEEP scores and the sediments VID, PG3 and CMA by the highest. Correlation analysis of Pearson were conducted between IBR and PEEP scores, and figure 57 shows the significant relation between both indices ($r = 0.80$). No significant correlations were found between IBR and Q_{PEC}, and PEEP and Q_{PEC}, respectively.

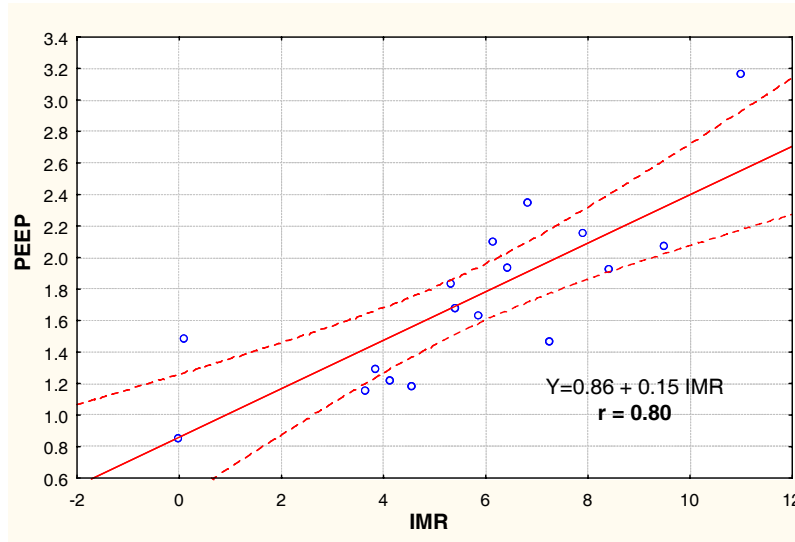


Figure 57: Linear relationship (solid line) and 95% confidence interval (dotted lines) between IBR and PEEP scores. The equation of the linear regression and the Pearson’s correlation are given.

However, ranking sediments according to their IBR or PEEP scores were correlated to ranking of sediments based on their Q_{PEC} values. Pearson’s rank correlation test did not exhibit significant correlations (figure 58a,b). However, the correlation was higher (and nearly significant) when considering the IBR compared to the PEEP (data not shown).

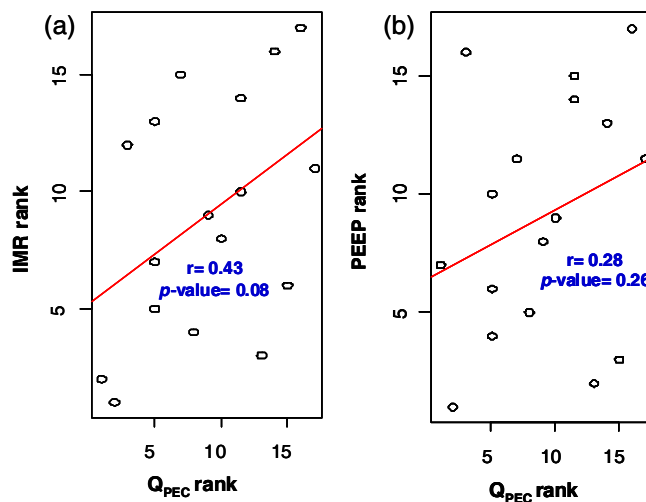


Figure 58: Correlation between IBR (a) and PEEP sediment ranking (b) with the Q_{PEC} sediment ranking. The solid line corresponded to the linear regression between both parameters

6.2.5 Discussion and conclusion

In the present study, 17 freshwater sediments samples were collected from different sites and tested to evaluate their potential ecotoxicity using a screening battery of microbiotests. Of the 17 sediments, four were constituted mostly by sand fractions and the other samples exhibited silt fractions between 51% and 88.5%. The silt fraction of the sediments seems to be closely related to the quantity of organic matter presented in the sediments ($r=0.60$, $p=0.01$, see fig. 1). Many previous field studies suggest that the organic matter content of river sediment increases with decreasing particle size (e.g. Evans *et al.* 1990). Schorer (1997) found that most of the organic matter content in their sediments was more present in the fine silt and fine sand fractions than in the clay fraction. They hypothesized that these results were linked to the presence of different types of organic material in the sediment. Moreover, in our study the organic pollutants seemed to be more related to organic matter content than heavy metals, in fact a significant correlation was found between total PAHs and organic matter ($r=0.67$, $p=0.03$). These results were in agreement with the literature. Indeed, due to their low aqueous solubility and highly hydrophobic nature (Nesterova *et al.* 1982), PAHs tend to be associated with organic matter and to accumulate in sediments (Di Toro *et al.* 1991, Law & Biscaya 1994, Mitra *et al.* 1999)

The three microbiotests identified sediment VID as the more ecotoxic. This result is consistent with the chemical classification of sediments since, according to its Q_{PEC} value (MacDonald *et al.* 2000), this sediment was categorized as ecotoxic (class 3). Moreover, all three tests also allowed identifying sediment BB as the least ecotoxic sediment, also in accordance with the chemical characterization (class 1) of this sediment. For other sediments the sensitivity of each assay varied with respect to the tested sediments, especially with sediments categorized in class 2. These results are consistent with the fact that bioassay responses can provide information about bioavailable pollutants that are present in sediments (Giesy *et al.* 1990, Burton 1991, Blaise *et al.* 2000, Mamindy-Pajany *et al.* 2011). In our study the three selected microbiotests supplied information of the potential global ecotoxicity of the sediments since both dissolved and adsorbed contaminants were taken into account during exposure. In this respect, it is a realistic

approach to evaluate the bioavailability of contaminants in sediments (Harkey *et al.* 1994, Lib & Ahlf 1997, Mamindy-Pajany *et al.* 2011).

Sediment AMO was characterised by the highest Q_{PEC} value. However, considering the distribution of the sediments along the first PCA factorial axis (i.e. a proxy of the global contamination gradient, Fig. 1) sediment AMO was not located in the higher values of this contamination gradient. The mismatch between the sediment Q_{PEC} values and its position along the contamination gradient could possibly be explained by the high concentration of lead and arsenic, two highly potentially ecotoxic compounds (Mouchet *et al.* 2007, Karadjova *et al.* 2008) whose concentration variability among sediments was not well explained by the first factorial plane (Fig. 1). It is worthy to note that this sediment was not very ecotoxic according to the three microbiotests used in our study. These results could indicate that these particular pollutants were not bioavailable for the organisms. The intensity of the correlation with the physico-chemical parameters was highly variable among the endpoints of the three microbiotests. The only consistent result was the significant correlation found between each endpoint test and the percentage of silt and sand in the sediments. These correlations could be attributed to the pollutants bound to the sediment particles or could be related to a bias of the assay associated to fine particles.

For MSPA, several authors have reported a bias associated to the MSPA and the nature of the sediments, the finest particles being able to influence test responses (Benton *et al.* 1995, Quintino *et al.* 1995, Ringwood *et al.* 1997). We have demonstrated that the finest particles contribute to the loss of bacteria after filtration causing a significant loss of the potential bioluminescence used for the calculation of the IC_{50} (Burga-Pérez *et al.* 2012a).

In the LSPA, a potential bias caused by the finest particles has been reported by Dellematrice *et al.* (2006) and we have also noted this (Burga Pérez *et al.* 2012b), but we did not quantify this bias.

Until now, no bias related to finest particles has been reported for the Ostracodtoxkit. In addition, organic matter can play a role in the bioavailability of pollutants in natural

sediments (Evans *et al.* 1990, Castro & Vale 1995, Höss *et al.* 1997, Schorer 1997, Gao *et al.* 1998, Lin et Chen 1998), but also could cause a bias in the response of some tests. The organic matter content was significantly correlated with the LSPA and ostracod measurement endpoints. In the case of the LSPA, it has been reported that humic substances can interfere with the electron transport in plant and cyanobacterial thylakoids (Pflugmacher *et al.* 2006). Paul *et al.* (2003) showed that the quinones found in humic substances could be responsible for the high inhibition of the electron transport (> 80%) in some species of aquatic macrophytes. Moreover, humic substances can bind with quinones of PS II and thus block the electron transfer (Pflugmacher *et al.* 2006).

In the case of the Ostracodtoxkit test with *Heterocypris incongruens*, growth inhibition was a more sensitive endpoint than mortality. The same tendency was observed in other studies (Chial & Persoone 2002, Joner *et al.* 2004, Oleszczuk 2008). These organisms, when exposed to the contaminated matrix, probably saw their energy balance favor maintenance and survival functions at the expense of their development (Barata & Baird 2000). Due to the different pathways on which contaminants can interfere, ostracods are important organisms to include in a battery of microbiotests to assess solid matrices ecotoxicity. Firstly, these organisms could be directly exposed to toxicants linked to the solid phase through their locomotion activity (they swim at the surface of the sediment and may hide in it). Secondly, they can be contaminated through dietary exposure, these organisms having a wide range of feeding habits (filter feeders, scavengers, herbivores, carnivores (Rossi *et al.* 2011)). Thirdly, they can resist to very low dissolved oxygen concentration (up to 2 ppm) (Margalef 1953, Green 1959). Organic matter contained in sediments can be beneficial, as a preferential food source, for these organisms (Annapurna & Rama Sarma 1982). However, this presence can also be detrimental to ostracods. Indeed, organic pollutants (e.g. PAHs) are mainly bound to organic matter thus increasing ostracod exposure to these toxicants, to which they are sensitive (Joner *et al.* 2004, Hamdi *et al.* 2007, Oleszczuk 2008, Coccia *et al.* 2009).

One of the goals of our study was to develop an easy and practical tool that integrates the results of the battery of microbiotests. The integrated microbiotest response (IBR) index was adapted from IBR index to provide an index that reflects the global ecotoxicity of the

sediments. Moreover, the graphical representation of the IBR (figure 4) has the advantage of conserving the initial information of the individual contribution of each microbiotest to the final score. The graphics in figure 2 show that the different microbiotests can respond differently to the same sediment. These differences in sensitivity could be attributed to the fact that not all toxicants present in the sediments (i) are available for each test organism and (ii) affect the same metabolic processes and cause the same effects among organisms, because pollutants have different modes of action and target receptors (Burton 1991) These results also confirmed the fact that each test has its own specific sensitivity suggesting that the utilisation of a single organism in the assessment of ecotoxicity is definitely insufficient (Dutka *et al.* 1983, Castillo *et al.* 2000)

Both the IBR and PEEP indices display similar patterns regarding the classification of sediments. However, when comparing more thoroughly sediment ranking obtained with Q_{PEC} with either the IBR index or the PEEP index (figure 6,a,b), no significant correlation was found between the chemical sediment ranking and both integrative indices ranking.

Our work emphasizes the necessity of developing integrative risk assessment methodologies for highly complex matrices such as sediments. Incomplete chemical analyses have limited utility to evaluate the ecotoxic effect of sediments (Davoren *et al.* 2005, Mamindy- Pajany *et al.* 2010), because they cannot integrate the combined effects (antagonistic or synergistic) nor the bioavailability of toxicants to organisms. To overcome these limitations, the development of sensitive integrative bioassessment methods (e.g. battery of bioassays and integrative indices) based on organisms with complementary exposure and toxicity pathways to toxicants presents in sediments should be encouraged.

6.2.6 References

- AFNOR (2000) Caractérisation des boues Dosage des hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP) et des polychlorobiphényles (PCB) (in French).
- Annapurna, C. & Rama Sarma, D. (1982) Sediment-ostracode relationship in the Bimili backwater and the Balacheruvu tidal stream. *Proceedings of Indian Academy of sciences (Animal Sciences)*, **91**, 297-303.
- Barata, C. & Baird, D. (2000) Determining the ecotoxicological mode of action of chemicals from measurements made on individuals: results from short-duration chronic tests with *Daphnia magna* Straus. *Aquat. Toxicol*, **48**, 195-209.
- Beliaeff, B. & Burgeot, T. (2002) Integrated biomarker response: A useful tool for ecological risk assessment. *Environmental Toxicology and Chemistry*, **21**, 1316-1322.
- Bellemare, F., Rouette, M., Lorrain, L., Perron, A. & Boucher, N. (2006) Combined use of photosynthetic enzyme complexes and microalgal photosynthetic systems for rapid screening of wastewater toxicity. *Environmental Toxicology*, **21**, 445-449.
- Benton, M. J., Malott, M. L., Knight, S. S., Cooper, C. M. & Benson, W.H. (1995) Influence of sediment composition on apparent toxicity in a solid-phase test using bioluminescent bacteria. *Environmental Toxicology and Chemistry*, **14**, 411-414.
- Blaise, C. (1991) Microbiotests in aquatic ecotoxicology: Characteristics, utility, and prospects. *Environmental Toxicology and Water Quality*, **6**, 145-155.
- Blaise, C. & Ménard, L. (1998) A Micro-Algal Solid-Phase Test To Assess the Toxic Potential of Freshwater Sediments. *Water Qual. Res. J. Canada*, **33**, 133-155.
- Blaise, C., Gagné, F. & Bombardier, M. (2000) Recent Developments in Microbiotesting and Early Millennium Prospects. *Water, Air, & Soil Pollution*, **123**, 11-23.
- Blaise, C., Gagné, F., Chèvre, N., Harwood, M., Lee, K., Lappalainen, J., Chial, B., Persoone, G. & Doe, K. (2004) Toxicity assessment of oil-contaminated freshwater sediments. *Environmental Toxicology*, **19**, 267-273.
- Bombardier, M. (2005) *The SED-TOX Index for toxicity assessment of contaminated solid matrices*. In C. Blaise & J.F. Férard (Eds.), *Small-scale freshwater Toxicity Investigations*, 422 p. Springer, Netherlands.
- Bombardier, M. & Bermingham, N. (1999) The SED-TOX index: Toxicity-directed management tool to assess and rank sediments based on their hazard-concept and application. *Environmental Toxicology and Chemistry*, **18**, 685-698.
- Boucher, N., Lorrain, L., Rouette, M., Perron, E., Déziel, N., Tessier, L. & Bellemare, F. (2005) Rapid Testing of Toxic Chemicals. *American Laboratory*, **37**, 34-37.
- Brouwer, H., Murphy, T. & McArdle, L. (1990) A sediment-contact bioassay with *Photobacterium phosphoreum*. *Environmental Toxicology and Chemistry*, **9**, 1353-1358.
- Burga-Pérez, K.F.B., Charlatchka, R., Sahli, L. & Férard, J.F. (2012a) New methodological improvements in the Microtox® solid phase assay. *Chemosphere*, **86**, 105-110.
- Burga-Pérez, K.F.B., Charlatchka, R. & Férard, J.F. (2012b) Assessment of the LuminoTox leachate phase assay as a complement to the LuminoTox solid phase assay: Effect of fine particles in natural sediments. *submitted*
- Burton, G. A. (1991) Assessing the toxicity of freshwater sediments. *Environmental Toxicology and Chemistry*, **10**, 1585-1627.
- Castillo, G. C., Vila, I. C. & Neild, E. (2000) Ecotoxicity assessment of metals and wastewater using multitrophic assays. *Environmental Toxicology*, **15**, 370-375.
- Castro, O. G. & Vale, C. (1995) Total PCB-organic matter correlation in sediments from three estuarine areas of Portugal. *Aquatic Ecology*, **29**, 297-302.

- Chial, B. & Persoone, G. (2002) Cyst-based toxicity tests XIII- Development of a short chronic sediment toxicity test with the ostracod crustacean *Heterocypris incongruens*: Methodology and precision. *Environmental Toxicology*, **17**, 528-532.
- Cleveland, L., Little, E., Petty, J., Johnson, B., Lebo, J., Orazio, C. & Dionne, J., Crockett, A. (1997) Toxicological and chemical screening of Antarctica sediments: use of whole sediment toxicity tests, Microtox, Mutatox and semipermeable membrane devices (SPMDs). *Marine Pollution Bulletin*, **34**, 194-202.
- Coccia, A. M., Gucci, P. M., Lacchetti, I., Beccaloni, E., Paradiso, R., Beccaloni, M. & Musmeci, L. (2009) Hydrocarbon contaminated soil treated by bioremediation technology: microbiological and toxicological preliminary findings. *Environmental Biotechnology*, **5**, 61-72.
- Costan, G., Bermingham, N., Blaise, C. & Férard, J.F. (1993) Potential ecotoxic effects probe (PEEP): A novel index to assess and compare the toxic potential of industrial effluents. *Environmental Toxicology and Water Quality*, **8**, 115-140.
- Damiens, G., Gnassia-Barelli, M., Loques, F., Romeo, M. & Salbert, V. (2007) Integrated biomarker response index as a useful tool for environmental assessment evaluated using transplanted mussels. *Chemosphere*, **66**, 574-583.
- Davoren, M., Ní- Shúilleabháinn, S., Halloran, J., Hartl, M., Sheehan, D., O'Brien, N., Van Pelt, F. & Mothersill, C. (2005) A Test Battery Approach for the Ecotoxicological Evaluation of Estuarine Sediments. *Ecotoxicology*, **14**, 741-755.
- Debenest, T., Gagné, F., Petit, A., André, C., Kohli, M. & Blaise, C. (2010) Ecotoxicity of a brominated flame retardant (tetrabromobisphenol A) and its derivatives to aquatic organisms. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology and Pharmacology*, **152**, 407 - 412.
- Dellamatrice, P.M., Monteiro, R.T., Blaise, C., Slabbert, J.L., Gagné, F. & Alleau, S. (2006) Toxicity assessment of reference and natural freshwater sediments with the LuminoTox assay. *Environ. Toxicol.* , **21**, 395-402.
- Dewez, D., Boucher, N., Bellemare, F. & Popovic, R. (2007) Use of different fluorometric systems in the determination of fluorescence parameters from spinach thylakoid membranes being exposed to atrazine and copper. *Toxicological and Environmental Chemistry*, **89**, 655-664.
- Di Toro, D.M., Zarba, C.S., Hansen, D.J., Berry, W.J., Swartz, R.C., Cowan, C.E., Pavlou, S.P., Allen, H.E., Thomas, N.A. & Paquin, P.R. (1991) Technical basis for establishing sediment quality criteria for nonionic organic chemicals using equilibrium partitioning. *Environmental Toxicology and Chemistry*, **10**, 1541-1583.
- Dutka, B., Nyholm, N. & Petersen, J. (1983) Comparison of several microbiological toxicity screening tests. *Water Research*, **17**, 1363-1368.
- Evans, K.M., Gill, R.A. & Robotham, P.W.J. (1990) The PAH and organic content of sediment particle size fractions. *Water, Air, & Soil Pollution*, **51**, 13-31.
- Feiler, U., Ahlf, W., Höss, S., Hollert, H., Neumann-Hensel, H., Meller, M., Weber, J. & Heining, P. (2005) The SeKT Joint Research Project: Definition of reference conditions, control sediments and toxicity thresholds for limnic sediment contact tests. *Environmental Science and Pollution Research*, **12**, 257-258.
- Gao, J., Maguhn, J. & Spitzauer, P. (1998) Distribution of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs) in Pore Water and Sediment of a Small Aquatic Ecosystem. *International Journal of Environmental Analytical Chemistry*, **69**, 227-242.
- Giesy, J. P., Rosiu, C. J., Graney, R. L. & Henry, M.G. (1990) Benthic invertebrate bioassays with toxic sediment and pore water. *Environmental Toxicology and Chemistry*, **9**, 233-248.
- Green, J. (1959) Pigmentation of an ostracod, *Heterocypris incongruens*. *Journal of Experimental Biology*, **36**, 575-582.
- Guerlet, E., Vasseur, P. & Giambérini, L. (2010) Spatial and temporal variations of biological responses to environmental pollution in the freshwater zebra mussel. *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, **73**, 1170-1181.

- Hamdi, H., Benzarti, S., Manusadzianas, L., Aoyama, I. & Jedidi, N. (2007) Solid-phase bioassays and soil microbial activities to evaluate PAH-spiked soil ecotoxicity after a long-term bioremediation process simulating landfarming. *Chemosphere*, **70**, 135-143.
- Harkey, G.A., Landrum, P.F. & Klaine, S.J. (1994) Comparison of whole-sediment, elutriate and pore-water exposures for use in assessing sediment-associated organic contaminants in bioassays. *Environmental Toxicology and Chemistry*, **13**, 1315-1329.
- Höss, S., Haitzer, M., Traunspurger, W., Gratzner, H., Ahlf, W. & Steinberg, C. (1997) Influence of Particle Size Distribution and Content of Organic Matter on the Toxicity of Copper in Sediment Bioassays Using *Caenorhabditis elegans* (Nematoda). *Water, Air, and Soil Pollution*, **99**, 689-695.
- ISO (2005), Water quality - Application of inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS) - Part 2: Determination of 62 elements, 46p.
- Janssen, C., Vangheluwe, M. & Van Sprang, P. (2000) *A brief review and critical evaluation of the status of microbiotests*. In G. Persoone, C. Janssen & W. De Coen (Eds.), *New microbiotests for routine toxicity screening and biomonitoring*, pp. 27-37. Plenum Publishers, New York.
- Joner, E.J., Hirmann, D., Szolar, O.H., Todorovic, D., Leyval, C. & Loibner, A.P. (2004) Priming effects on PAH degradation and ecotoxicity during a phytoremediation experiment. *Environmental Pollution*, **128**, 429-435.
- Karadjova, I.B., Vera I. Slaveykova, V.I. & Dimiter L. Tsalev D.L. (2008) The biouptake and toxicity of arsenic species on the green microalga *Chlorella salina* in seawater. *Aquatic Toxicology*, **87**, 264-271.
- Kudlak, B., Wolska, L. & Namiesnik, J. (2011) Determination of EC50 toxicity data of selected heavy metals toward *Heterocypris incongruens* and their comparison to "direct-contact" and microbiotests. *Environmental Monitoring and Assessment*, **174**, 509-516.
- Lannalain, J., Juvonen, R., Vaajasaari, K. & Karp, M. (1999) A new flash method for measuring the toxicity of solid and colored samples. *Chemosphere*, **38**, 1069 - 1083.
- Law, R. & Biscaya, J. (1994) Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH): problems and progress in sampling, analysis and interpretation. *Marine Pollut Bull*, **29**, 235-241.
- Lee, K., Nagler, J., Fournier, M., Lebeuf, M. & Cyr, D. (1999) Toxicological characterisation of sediments from Baie des Anglais on the St. Lawrence estuary. *Chemosphere*, **39**, 1019-1035.
- Lib, W. & Ahlf, W. (1997) Evidence from Whole-Sediment, Porewater, and Elutriate Testing in Toxicity Assessment of Contaminated Sediments. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, **36**, 140 - 147.
- Lin, J. & Chen, S. (1998) The relationship between adsorption of heavy metal and organic matter in river sediments. *Environment International*, **24**, 345-352.
- Loizeau, J., Arbouille, D., Santiago, S. & Vernet, J. (1994) Evaluation of a wide range laser diffraction grain size analyser for use with sediments. *Sedimentology*, **41**, 353-361.
- MacDonald, D.D., Ingersoll, C.G. & Berger, T.A. (2000) Development and Evaluation of Consensus-Based Sediment Quality Guidelines for Freshwater Ecosystems. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, **39**, 20-31.
- Mamindy-Pajany, Y., Hamer, B., Roméo, M., Gêret, F., Galgani, F., Durmisi, E., Hurel, C. & Marmier, N. (2011) The toxicity of composted sediments from Mediterranean ports evaluated by several bioassays. *Chemosphere*, **82**, 362-369.
- Mankiewicz-Boczek, J., Nalecz-Jawecki, G., Drobniwska, A., Kaza, M., Sumorok, B., Izydorczyk, K., Zalewski, M. & Sawicki, J. (2008) Application of a microbiotests battery for complete toxicity assessment of rivers. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, **71**, 830 - 836.
- Manusadzianas, L., Sadauskas, K., Vitkus, R., 2010, Comparative study of indices used in toxicity evaluation of effluents, *Desalination*, **250**, 383-389.
- Margalef, R. (1953) Los Crustáceos de las Aguas Continentales Ibéricas. *Biología de las Aguas Continentales*, **10**, 1-253.

- Mitra, S., Dickhut, R. M., Kuehl, S. A. & Kimbrough, K.L. (1999) Polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) source, sediment deposition patterns, and particle geochemistry as factors influencing PAH distribution coefficients in sediments of the Elizabeth River, VA, USA. *Marine Chemistry*, **66**, 113-127.
- Mouchet, F., Cren, S., Cunienq, C., Deydier, E., Guilet, R. & Gauthier L. (2007) Assessment of lead ecotoxicity in water using the amphibian larvae (*Xenopus laevis*) and preliminary study of its immobilization in meat and bone meal combustion residues. *BioMetals*, **20**, 113–127
- Nesterova, N., Den 'Ga, Y. & Vorob'Yev, V. (1982) Aromatic hydrocarbons in surface waters of the north Atlantic Ocean and Mediterranean Sea. *Oceanology*, **22**, 709-711.
- Oleszczuk, P. (2008) *Heterocypris incongruens* as a tool to estimate sewage sludge toxicity. *Environmental Toxicology and Chemistry*, **27**, 864-872.
- Oliveira, M., Maria, V., Ahmad, I., Serafim, A., Bebianno, M., Pacheco, M. & Santos, M. (2009) Contamination assessment of a coastal lagoon (Ria de Aveiro, Portugal) using defence and damage biochemical indicators in gill of *Liza aurata*--an integrated biomarker approach. *Environ Pollut*, **157**, 959-967.
- Paul, A., Pflugmacher, S. & Steinberg, C. (2003) Correlation of spin concentration in humic substances with inhibitory effects on photosynthesis of aquatic macrophytes. *Akad gem Wiss.Erfurt, Sitzungsber Math-Naturw Klasse*, **12**, 209-221.
- Pedersen, F., Bjørnstad, E., Andersen, H. V., Kjølholt, J. & Poll, C. (1998) Characterization of sediments from Copenhagen Harbour by use of biotests. *Water Science and Technology*, **37**, 233-240.
- Pflugmacher, S., Pietsch, C., Rieger, W. & Steinberg, C. (2006) Dissolved natural organic matter (NOM) impacts photosynthetic oxygen production and electron transport in coontail *Ceratophyllum demersum*. *Science of the Total Environment* , **357**, 169-175.
- Quintino, V., Picado, A. M., Rodrigues, A. M., Mendonça, E., Costa, M. H., Costa, M. B., Lindgaard-Jorgensen, P. & Pearson, T.H. (1995) Sediment chemistry - Infaunal community structure in a southern European estuary related to solid-phase Microtox toxicity testing. *Aquatic Ecology*, **29**, 427-436.
- Ringwood, A. H., DeLorenzo, M. E., Ross, P. E. & Holland, A.F. (1997) Interpretation of Microtox® solid-phase toxicity tests: The effects of sediment composition. *Environmental Toxicology and Chemistry*, **16**, 1135-1140.
- Roghair, C., Struijs, J. & De Zwart, D. (1997) *Measurement of toxic potency in fresh waters in the Netherlands; Part A: Methods*. Nat. Inst. Publ. Health & Environment., The Netherlands. RIVM-Report no 607504 004.
- Rossi, V., Benassi, G., Belletti, F. & Menozzi, P. (2011) Colonization, population dynamics, predatory behaviour and cannibalism in *Heterocypris incongruens* (Crustacea: Ostracoda). *Journal of Limnologie*, **70**, 102-108.
- Schorer, M. (1997) Pollutant and organic matter content in sediment particle size fractions. *Freshwater Contamination*, **243**, 59-67.
- Serafim, A., Company, R., Lopes, B., Fonseca, V., FranÃ§sa, S., Vasconcelos, R., Bebianno, M. & Cabral, H. (2012) Application of an integrated biomarker response index (IBR) to assess temporal variation of environmental quality in two Portuguese aquatic systems. *Ecological Indicators*, **19**, 215-225.
- Urbanczyk, H., Ast, J., Higgins, M., Carson, J. & Dunlap, P. (2007) Reclassification of *Vibrio fischeri*, *Vibrio logei*, *Vibrio salmonicida* and *Vibrio wodanis* as *Aliivibrio fischeri* gen. nov., comb. nov., *Aliivibrio logei* comb. nov., *Aliivibrio salmonicida* comb. nov. and *Aliivibrio wodanis* comb. nov.. *Int J Syst Evol Microbiol*, **57**, 2823-2829.
- US EPA (1998) Mercury in solids and solutions by thermal decomposition, amalgamation, and atomic absorption spectrophotometry, Method 7343.
- van Beelen, P. (2003) A review on the application of microbial toxicity tests for deriving sediment quality guidelines. *Chemosphere*, **53**, 795-808.

- Vasseur, P. & Férard, J. (1993) Evaluation de la toxicité des effluents industriels. *Carrefour scientifique et technique "H2O 1991"*, 73-75.
- Volpi-Ghirardini, V., Birkemeyer, T., Novelli, A., Delaney, E., Pavoni, P. & Ghetti, P. (1999) An integrated approach to sediment quality assessment: the Venetian lagoon as a case study. *Aquatic Ecosystem Health and Management*, **2**, 435-447.

Chapitre 7 : Synthèse, discussion générale et conclusions

7.1 Synthèse et discussion générale

L'objectif général de notre travail de recherche avait pour but la validation méthodologique de plusieurs tests en phase solide pour pouvoir ensuite les appliquer à n'importe quel sédiment. Dans un premier temps, nos efforts se sont focalisés sur la mise en évidence et si possible la quantification des biais potentiels liés aux caractéristiques géochimiques des sédiments préalablement signalés ou non dans la littérature. Nous avons également cherché à optimiser des tests existants, par exemple en élaborant des variantes de ces mêmes tests. Finalement, nous avons appliqué les techniques optimisées et/ou développées au reste des sédiments échantillonnés contaminés ou non et couvrant la gamme la plus large possible de granulométrie et de quantité de matière organique.

La batterie de microbiotests prévue au départ était constituée de 6 microbiotests appliqués à la phase solide, c'est-à-dire aux sédiments bruts (plus ou moins dilués avec un milieu différent pour chacun). Parmi ces 6 tests, à savoir les tests Microtox® en phase solide, algue en phase solide, Luminotox en phase solide, Ostracodtoxkit®, Phytotoxkit® et MARA, seuls 4 de ces 6 tests ont finalement été étudiés. À partir de ces quatre microbiotests, nous en avons retenu trois (Mic-SPA, Lum-SPA et ostracodtoxkit) car ils ont donné des réponses significatives avec tous les échantillons testés.

Ecotoxicité observée et écotoxicité potentielle : les résultats des trois microbiotests sélectionnés sont-ils représentatifs de la composition chimique des sédiments ?

Les organismes sélectionnés dans notre étude, avec leurs conditions d'essai et leurs critères d'évaluation respectifs, ont présenté des réponses différentes pour chaque sédiment testé. Les deux variantes du test algue et les deux critères d'effet sélectionnés (inhibition de l'activité estérase et inhibition de la croissance) ont été les seuls tests qui n'ont pas été sensibles, quels que soient les échantillons testés, et ce contrairement à ce qui a déjà été signalé par différents auteurs sur la plus grande sensibilité du test algues par rapport à la réponse du test Microtox®. Selon nos conditions d'essai et le type d'échantillon, les algues n'ont pas pu discriminer les échantillons moyennement et très

contaminé de notre étude. Ce faible pouvoir de discrimination des effets toxiques des tests ASPA et ASPAIC pourrait être lié aux caractéristiques naturelles des sédiments. L'apport en nutriments pourrait stimuler la croissance algale dans le test ASPAIC, des effets bénéfiques d'éléments comme l'azote ou le phosphore pourraient alors être plus importants que les effets néfastes de polluants présents dans la phase dissoute et la phase particulaire. Par ailleurs, le fait d'avoir obtenu une stimulation de croissance avec le test ASPAIC pourrait nous donner des informations sur des risques potentiels d'eutrophisation des écosystèmes aquatiques correspondants aux sédiments étudiés. Plusieurs études avec le test algues ont été réalisées pour évaluer le potentiel d'eutrophisation de systèmes aquatiques lotiques et lenticques (Filip et Middlebrooks 1976 , Joubert 1980 , Gerhold et Otto 1976 , Djomoa *et al.* 1993). Dans le processus de remise en suspension des sédiments, les nutriments peuvent être relargués et ainsi stimuler la prolifération algale (Hansen *et al.* 1997, Schallenberg et Burns 2004). Bien que nous n'ayons pas identifié de corrélations significatives entre cette stimulation algale et les concentrations en phosphore et en azote, il faut tenir compte du fait que les teneurs mesurées de ces composants inorganiques ne reflètent pas nécessairement les concentrations biodisponibles pour les algues.

Par ailleurs, le carbone organique dissout (COD), en raison de son caractère amphiphile dans les substances humiques, pourrait s'adsorber sur la surface des algues et ainsi les «protéger» en empêchant les polluants de se fixer à la surface cellulaire (Campbell *et al.* 1997, Knauer et Buffle 2001, Koukal *et al.* 2003). De plus, la spéciation des polluants des sédiments d'étude dans les conditions de l'essai ne semble pas provoquer un effet sur l'activité estérase des algues.

Par ailleurs, la réponse obtenue avec les trois autres microbiotests (MSPA, Lum-LSA et ostracodes) pourrait être lié à la contamination mesurée dans les sédiments. En fait, l'analyse de coinertie réalisée entre les réponses de chaque microbiotest et les contaminants mesurés dans les sédiments ont présenté des relations significatives ($RV^{14}=0,38$, $p=0,023$). Malgré les limitations de ce type d'analyse multivariée, il semblerait que la chimie des sédiments joue un rôle important dans les réponses biologiques. La

¹⁴ RV= Coefficient de corrélation multivarié

figure 59 présente les résultats, sur le premier plan factoriel, de l'analyse de co-inertie effectuée entre les résultats des microbiotests et les mesures de polluants dans les sédiments. Sur la figure 59A, les points de départ des flèches représentent la position des sites d'après les données biologiques et l'extrémité des flèches correspond à la position des sites d'après les données chimiques. La différence entre les deux structures est donc matérialisée par la longueur des flèches (Tableau 19).

On peut ainsi déduire d'après ce graphique que, pour certains sédiments, la réponse des microbiotests pourrait s'expliquer par la contamination des sédiments alors que pour d'autres sédiments la réponse serait liée à d'autres facteurs, comme par exemple des contaminants non mesurés, les caractéristiques géochimiques des sédiments ou l'effet causé par les mélanges de polluants. Le dendrogramme créé à partir des distances de chaque vecteur nous a permis de séparer les sédiments en 3 groupes. Le groupe 1 correspond aux sédiments où la réponse des organismes d'essai serait en forte liaison avec la contamination mesurée, le groupe 2 est lui composé de sédiments ayant une relation «moyenne» entre les réponses biologiques et la contamination mesurée. Enfin, le groupe 3 est composé de sédiments pour lesquels la réponse des microbiotests ne correspond que faiblement à la contamination mesurée et pourrait être conditionnée par d'autres facteurs non considérés dans la caractérisation chimique réalisée sur les sédiments.

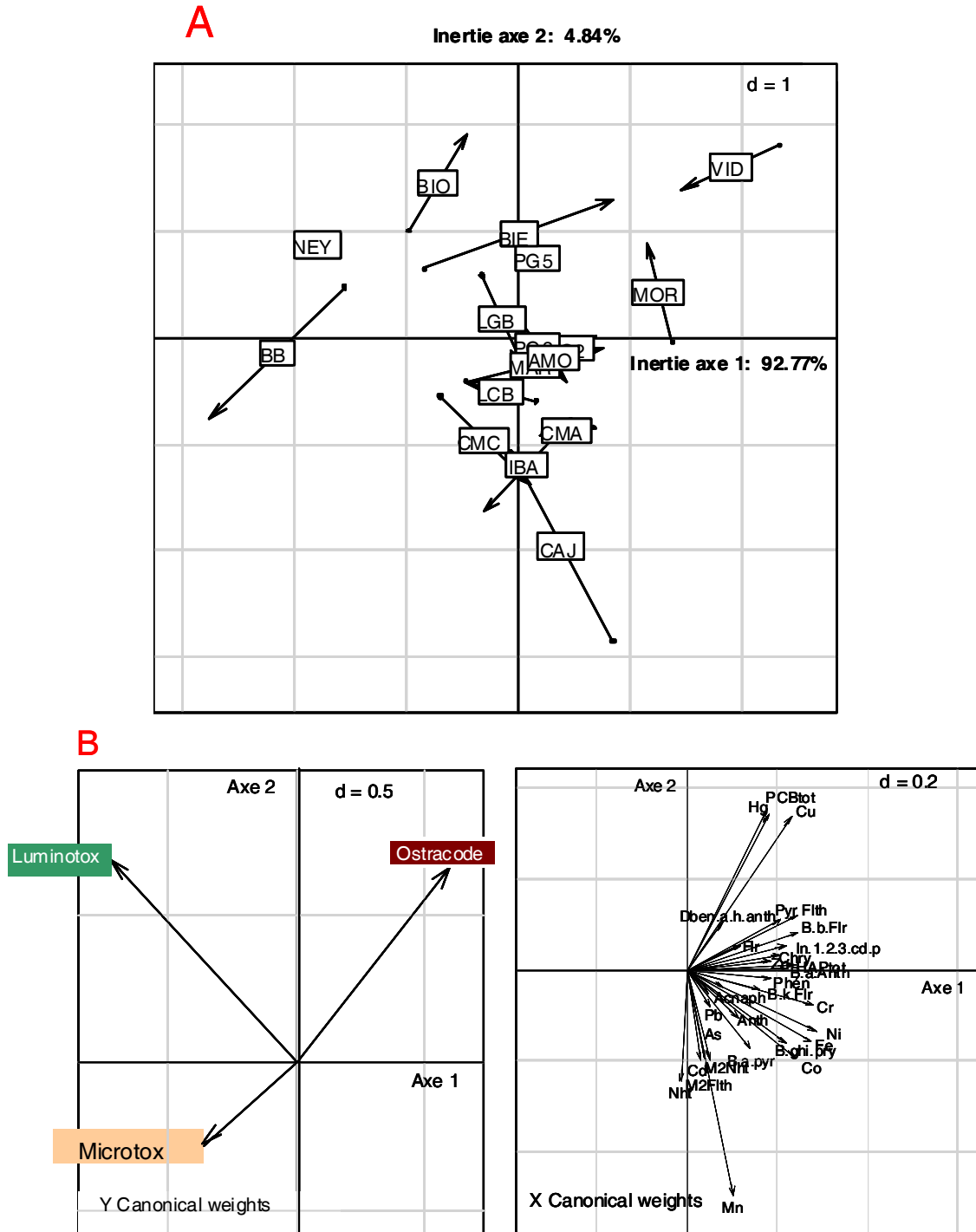


Figure 59 (A,B): Analyse de coinertie entre les réponses des trois microbiotests sélectionnés (Mic-SPA corrigé, Lum-SPA, Ostracodes)

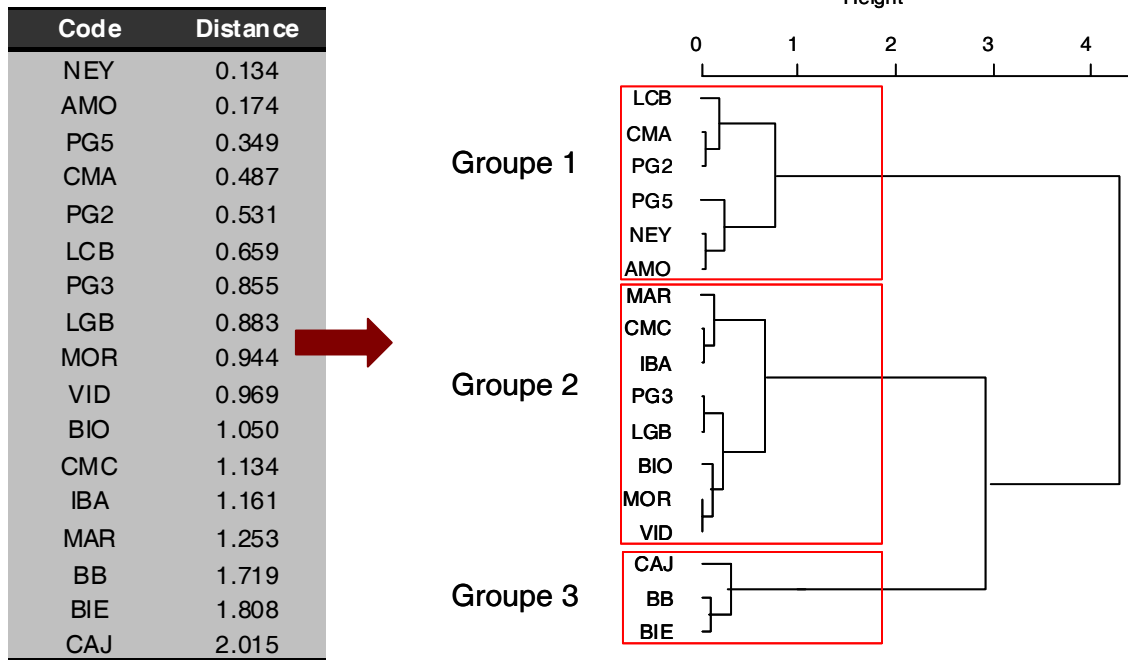


Tableau 19: Distances correspondant aux vecteurs de l’analyse de coinertie réalisée entre les résultats des trois microbiotests sélectionnés et la caractérisation chimique des sédiments.

Figure 60: Classification ascendante hiérarchisée (distance euclidienne et critère d’agrégation de Ward) réalisée à partir des valeurs de distances renseignées dans le tableau 19

Quand nous intégrons dans l’analyse de coinertie la caractérisation physique des sédiments (taille de particule, matière organique, rapport C/N, AVS), cela provoque une augmentation du coefficient $RV=0,44$, ce qui démontre que la réponse des microbiotests pourrait aussi être en partie liée aux caractéristiques physiques des sédiments.

Les deux premiers axes de cette analyse de coinertie expliquent respectivement 92,77% et 4,84% de la variance totale. D’après la figure 59B, le premier axe de l’analyse semble montrer un gradient de contamination globale des sédiments. L’analyse de coinertie nous permet donc d’avoir plus d’informations sur la réponse de chaque microbiotest par rapport aux contaminants mesurés. En comparant les trois microbiotests, il semblerait également que la variabilité des tests Luminotox et ostracodes serait plus liée au gradient de contamination des sédiments (premier axe) que pour le test Microtox, dont la variabilité des réponses ne semble pas expliquée par les polluants mesurés.

Les sédiments naturels contiennent des substances d'origine naturelle et anthropogénique. L'effet toxique associé à la contamination des sédiments dans l'environnement peut être causé par des mélanges complexes de polluants mesurés ou non. Comme il a déjà été signalé par différents auteurs l'analyse chimique des sédiments ne fournit qu'une partie des connaissances nécessaires pour évaluer le potentiel toxique des sédiments (Kwan et Dutka 1995, Davoren *et al.* 2005, Mamindy-Pajany *et al.* 2011). Ces analyses ne couvrent en effet pas tous les composants chimiques ou leurs métabolites qui peuvent également causer des effets, même à faible concentrations (Blasco et Picó 2009). Dans notre étude, nous ne disposons pas d'analyses additionnelles sur la spéciation des polluants ou des autres composants chimiques dans les conditions expérimentales de chaque microbiotests, ce qui nous permettrait d'approfondir la compréhension de la réponse des microbiotest aux sédiments contaminés.

Biais associés à certaines caractéristiques des sédiments

Il a été déjà signalé que certains facteurs confondants pourraient modifier la réponse des organismes d'essai (Postma *et al.* 2002). Parmi ces facteurs confondants cités dans la littérature on peut noter l'ammonium (Ankley *et al.* 1990, Wang et Chapman 1999), les sulfides ou le soufre élémentaire (Jacobs *et al.* 1992, Pardos *et al.* 1999) ainsi que la distribution de taille des particules des sédiments (Brouwer *et al.* 1990, Benton *et al.* 1995, Ringwood *et al.* 1997, Tay *et al.* 1998). Il a été déjà signalé que certains organismes utilisés dans les tests d'écotoxicité présentent une certaine sensibilité à l'ammonium (Ankley *et al.* 1990, Ankley *et al.* 1995). En fait, les tests Microtox et certains tests basés sur des amphipodes ont présenté des corrélations significatives entre les paramètres biologiques mesurés et les contenus en ammonium dans l'eau interstitielle des sédiments. Le soufre élémentaire ou le sulfure d'hydrogène (Pardos *et al.* 1999, Jacobs *et al.* 1992) ont également été signalés pour être toxiques pour *A. fischeri* dans des extractions organiques des sédiments. De même, Brouwer et Murphy (1995) ont observé des effets toxiques en exposant les bactéries à des sédiments dopés avec du H₂S. Dans notre étude, nous n'avons pas pu faire de dosages d'ammonium et de sulfures pour confirmer que l'effet écotoxique observé dans nos microbiotest, surtout pour le Mic-SPA, pourrait être lié à ces

composants, mais ce sont des composants qui ne sont pas négligeables au moment de l'interprétation des réponses toxiques.

Dans notre étude, nous avons pu démontrer et quantifier le biais lié à l'adsorption des bactéries dans la phase solide des sédiments lors de l'exécution du Mic-SPA. Ce biais peut être lié aux particules fines des sédiments mais également au contenu en matière organique. Les biais associés aux sédiments ont été déjà souligné par différents auteurs (Brouwer *et al.* 1990, Benton *et al.* 1995, Quintino *et al.* 1995, Ringwood *et al.* 1997, Tay *et al.* 1998). Par contre, la matière organique n'a pas vraiment été désignée comme un facteur confondant pour le test Microtox dans l'évaluation des sédiments. Nous avons formulé l'hypothèse que les substances humiques, de par leur capacité à se fixer aux surfaces biologiques Campbell *et al.* (1997), pourrait adsorber les bactéries et ainsi contribuer à ce qu'un plus faible nombre de bactéries soient disponibles après l'étape de filtration. Le modèle proposé par Burga Pérez *et al.* (2012) met en relation le pourcentage de perte des bactéries en fonction du contenu en limons et argiles pour chaque concentration de sédiments testée. Nous avons également testé la relation entre la perte en bactéries et les contenus en matière organique. Nous avons trouvé une corrélation significative ($r=0,69$, $p = 9,17 \times 10^{-6}$). Cependant, quand nous avons intégré dans un modèle de régression multiple à la fois l'effet de la fraction des particules fines et celui de la matière organique sur la perte en bactéries, la contribution de la matière organique au modèle n'a pas été significative. Bien que les pourcentages en limons et argiles soient censés représenter l'importance des différentes fractions minérales, du fait de la méthode analytique utilisée, il ne peut pas être totalement exclu (surtout pour les limons) que certains types de matière organique puissent être liés aux particules minérales. Nous en déduisons que dans le modèle «limon+argile vs % perte des bactéries», l'effet des particules fines inclut déjà, au moins en partie, les effets de la matière organique associée.

L'effet des particules fines a également été mis en évidence avec le test Luminotox. D'après nos résultats, il semblerait que les PEC soient très sensibles aux particules fines en général, ce que nous avons mis en évidence en appliquant le test Lum-LPA à des sédiments naturels et à des sédiments artificiels composés de différents mélanges d'argiles. Cependant, il reste encore à savoir pourquoi, dans le test Lum-SPA, l'effet des particules

finest est moins évident que dans le test Lum-LPA. Nous avons formulé l'hypothèse qu'il pourrait probablement exister, dans le test Lum-SPA, une compétition importante sur les sites de fixation des PEC entre les polluants, le carbone organique dissous et les plus grosses fractions granulométriques des sédiments. Quand l'échantillon est filtré, cette compétition diminue laissant ainsi la porte ouverte aux particules fines pour exercer une action sur les PEC. Contrairement au test Microtox, nous n'avons pas pu quantifier le biais associé aux particules fines.

Par ailleurs, en fonction de leur constitution ou du type de matière organique qu'ils contiennent, les sédiments pourraient exercer une influence directe dans la réponse des PEC. D'après les analyses de corrélation réalisées entre la réponse du test Lum-SPA et les paramètres physico-chimique des sédiments, il semblerait que le pourcentage en matière organique était significativement corrélée avec les valeurs de CI_{50} . Nous n'excluons donc pas la possibilité que cette matière organique puisse causer des interférences dans les réponses biologiques. Cette hypothèse semble d'autant plus probable qu'il a été déjà rapporté que les substances humiques peuvent intervenir dans les réactions de transport des électrons dans les thylakoides. Cette hypothèse a été validée pour certaines plantes et cyanobactéries exposées à différents types de substances humiques (Pflugmacher *et al.* 2006). Paul *et al.* (2003) dans Bahrs *et al.* (2012) a montré que la quinone trouvée dans les substances humiques testées pourrait être responsable de l'inhibition de transport d'électrons (> 80%) chez certaines espèces de macrophytes aquatiques. Les substances humiques peuvent se lier avec les quinones de PS II, et donc exercer un blocage du transfert des électrons (Pflugmacher *et al.* 2006)

Complémentarité des tests

Il est déjà reconnu dans de nombreuses études (Giesy et Hoke 1989, Matthiessen *et al.* 1998, Chapman *et al.* 2002, Davoren *et al.* 2005) qu'il est important d'utiliser plusieurs espèces d'organismes d'essai provenant de phylums différents et représentant différents niveaux trophiques, pour évaluer les effets potentiels des sédiments contaminés. Les espèces peuvent présenter des sensibilités différentes aux substances toxiques en fonction de leurs différents modes d'action dans les réactions physiologiques et biochimiques d'organismes. De même, nous pouvons penser que tous les organismes ne répondraient pas aux mêmes gammes de toxiques. Certains produits toxiques ont en effet des effets spécifiques sur des organismes ou des groupes particuliers d'organismes. Les bactéries, les algues et les organismes supérieurs peuvent ainsi présenter des sensibilités différentes aux polluants organiques et inorganiques (Giesy et Hoke 1989)

Selon Burton *et al.* (1996) la composition d'une batterie de biotests constituée de 2 à 3 organismes devrait être suffisant pour la plupart des applications destinées à détecter la toxicité des sédiments. Différentes batteries d'essais ont été décrites où le choix des espèces modèles a été basé sur des critères de décision tels que les objectifs d'étude, les caractéristiques des sites, les ressources financières, l'expertise de laboratoire, les organismes disponibles, la sensibilité ou encore le pouvoir de discrimination de l'essai.

Dans notre travail de recherche, les trois microbiotests représentent différents compartiments trophiques. Ils ont ainsi permis une évaluation des niveaux de toxicité et la réduction de l'incertitude de la qualité des sédiments étudiés. A partir de l'analyse en composantes principales (ACP) et des analyses de corrélation, nous avons montré que les trois microbiotests retenus ont présenté une complémentarité dans leurs réponses pour l'évaluation de l'écotoxicité des sédiments étudiés.

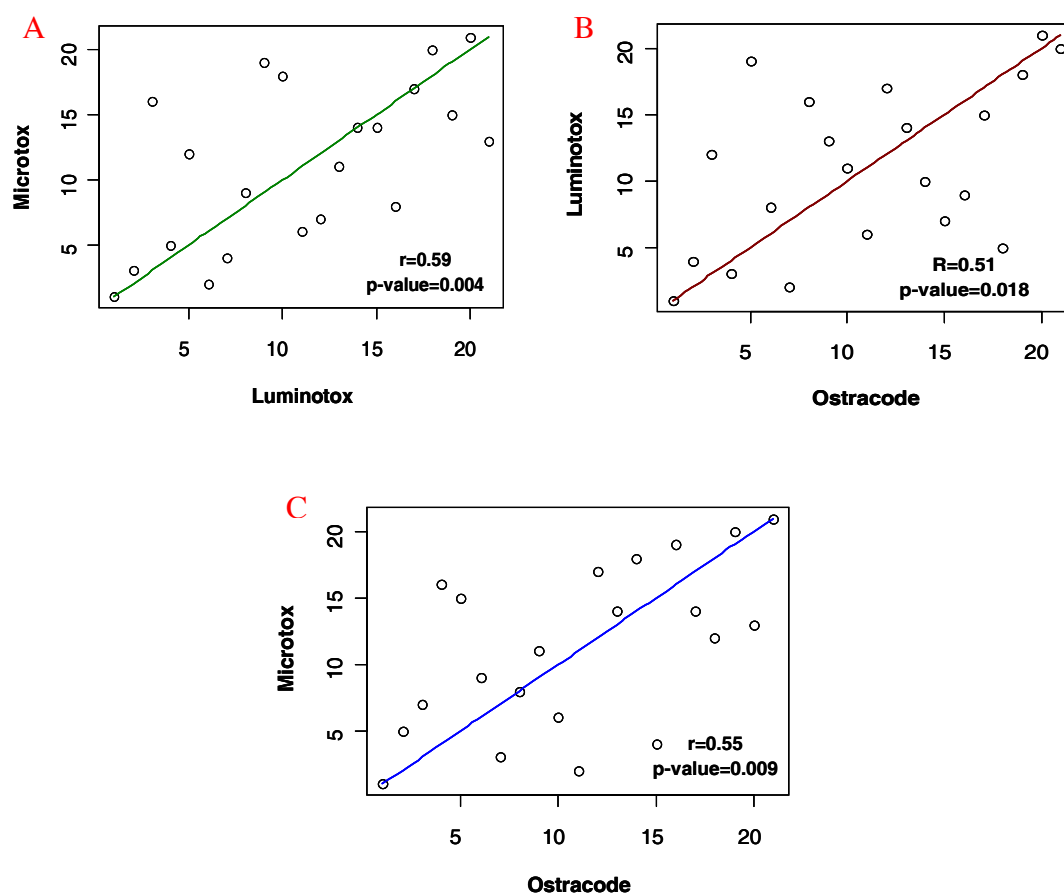


Figure 61 (A,B,C): Représentation de la corrélation du test Spearman entre les classements des 21 échantillons testé pour chaque microbiotest. Les droites représentant la relation linéale entre les deux classements.

La figure 61 montre que chaque test identifie les mêmes sédiments aux extrémités du gradient écotoxicité, mais on observe une différence des classements pour les sédiments moyennement écotoxiques. Ces différences entre les microbiotests pourraient être attribuées à plusieurs facteurs parmi lesquels la biodisponibilité des polluants qui n'est pas la même d'un organisme à l'autre. Les caractéristiques géochimiques des sédiments, comme nous l'avons déjà mentionné, peuvent aussi influencer de manière différente la réponse des organismes. Certains biais peuvent être attribués aux appareils de mesure correspondant à chaque microbiotest, par exemple le quenching potentiel que l'on peut observer au moment des mesures quand nous avons utilisé des appareils pour mesurer la

bioluminescence. Malgré le fait que nous ayons pris en compte ce facteur, surtout pour le test algue et Luminotox, l'influence potentielle de ce facteur, aussi minime soit-elle, mérite d'être mentionnée.

L'ACP présentée dans la figure 62 nous montre également la complémentarité et la non-redondance des trois microbiotests sélectionnés. Le premier axe de l'ACP, qui explique 71,76% de la variabilité totale, suggère que les trois microbiotests décrivent un gradient d'écotoxicité des sédiments.

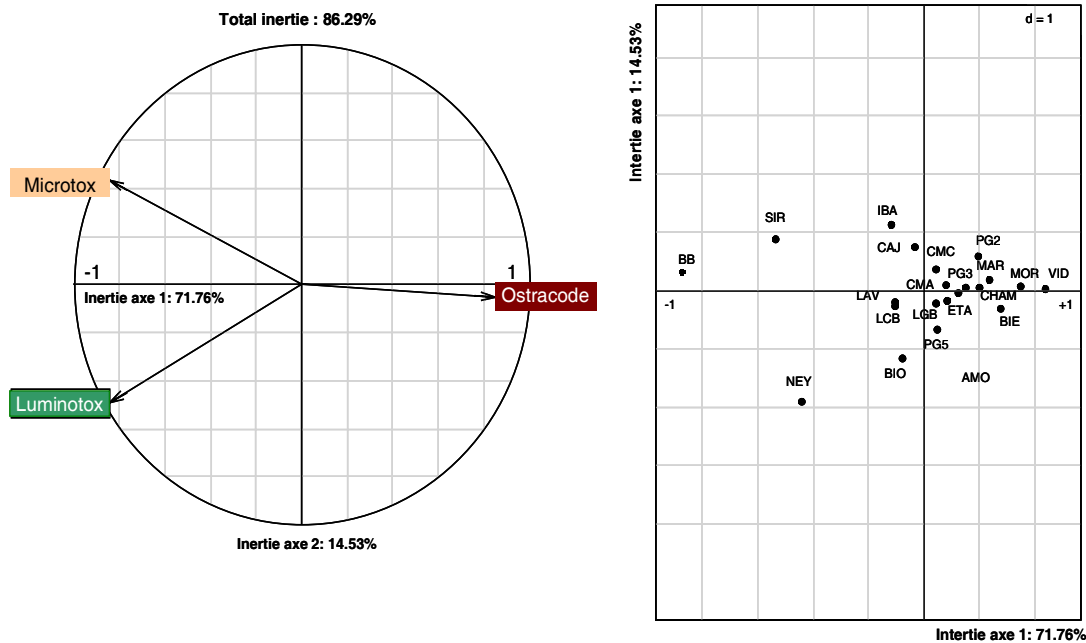


Figure 62: Analyse en composantes principales avec les trois microbiotests sélectionnés (Mic-SPA, Lum-SPA et ostracodes) réalisés sur 21 sédiments testés (1^{er}, 2^{ème}, 3^{ème} campagnes et les sédiments du JURA)

De même, cette analyse montre aussi que les trois microbiotests ont présenté des patrons d'écotoxicité différents. L'importance de la non-redondance réside dans le fait que chaque test apporte une information complémentaire car ayant potentiellement des mécanismes d'action d'écotoxicité différents d'un organisme à l'autre, permettant ainsi d'optimiser la détection de l'effet toxique. Comme il a été déjà mentionné par plusieurs auteurs (Giesy et Hoke 1989, Bombardier et Bermingham 1999, Chapman *et al.* 2002), une batterie d'essais

qui incorpore un certain nombre d'espèces différentes, est préconisé pour réduire l'incertitude dans l'évaluation de la qualité des sédiments.

Magnusson *et al.* (1996) ont montré que les différents organismes (*Nitocra spinipes*, *Daphnia magna*, *Mytilus edulis*, *Oncorhynchus mykiss*) d'une batterie de bioessais peuvent répondre différemment à divers groupes de polluants en fonction de leurs habitudes alimentaires ou en raison de leurs sensibilités différentes à divers polluants. De même, Matthiesen *et al.* (1998) ont aussi montré que les différents taxons et critères d'évaluation des organismes choisis dans leur étude ont présenté des sensibilités différentes aux sédiments multi-contaminés. Ils ont également précisé l'importance d'inclure dans une batterie de bioessai des organismes appartenant à différents niveaux trophiques et de sensibilités. Lahr *et al.* (2003) ont mis en application une batterie de bioessai pour tester différents extraits de sédiments afin d'identifier la cause de leur toxicité, batterie constituée par *A. fischeri*, *Brachionus calyciflorus*, *Thamnocephalus anostracan*, *Daphnia magna* et *Chironomus riparius*. Les résultats obtenus ont montré que la réalisation simultanée de plusieurs bioessais augmente la chance de démontrer les effets toxiques de sédiments pollués ou de leur l'eau interstitielle. De même, aucun des résultats de tests ne semblait être corrélé avec les classes de pollution déduites des analyses chimiques de routine des substances prioritaires dans les sédiments de la présente étude. La complémentarité de certains microbiotests a été déjà montrée par Blaise *et al.* (2004) avec des tests en phase solide MSPT, Flash-Microtox, ASPA, ostracode et *Hyalella Azteca*. Les résultats de leur analyse multivariée ont montré que les réponses des essais MSPT, ASPA et ostracode n'ont pas été similaires entre eux, suggérant la non redondance des réponses de ces microbiotests.

Finalement, il faut signaler que les microbiotests sélectionnés constituent des outils faciles à mettre en place, de bas coût, qui permettent détecter de manière précoce la fraction disponible des polluants dans les sédiments. Ces tests peuvent être complétés par des macrobiotests pour avoir ainsi un regard plus complet sur l'évaluation de l'écotoxicité des sédiments.

Intégration des réponses des microbiotests

Pour identifier les priorités d'action après d'une évaluation de l'écotoxicité potentielle des sédiments avec différents bioessais, il y a un vrai besoin de synthétiser et d'intégrer les différentes réponses de la batterie de bioessais. Ces priorités ne peuvent pas être basées sur la base des paramètres individuels dont les réponses pourraient être contradictoires et ainsi amener à des confusions pour les décideurs sans connaissances techniques (Canna-Michaelidou *et al.* 2000). Plusieurs auteurs signalent que, pour avoir une évaluation complète du potentiel de danger, il est nécessaire d'utiliser une approche intégrée des effets biologiques des contaminants (Ahlf *et al.* 2002, Nendza 2002, Lahr *et al.* 2003). L'intégration des réponses peut être réalisée à partir des indices individuels en utilisant différentes approches mathématiques pour synthétiser l'information (Shin et Lam, 2001). Plusieurs indices ont récemment été proposés pour la qualité des sédiments (Wildhaber et Schmitt 1996, Bombardier et Bermingham 1999, Shin et Lam 2001, Grapentine *et al.* 2002, Losso *et al.* 2010, Persoone *et al.* 2003, Piva *et al.* 2011, Benedetti *et al.* 2012) ces indices intègrent des organismes de différents niveaux trophiques, avec des phases d'exposition différentes, différents critères d'évaluation d'écotoxicité et différents temps d'exposition.

Dans la dernière partie de notre travail de recherche, nous avons synthétisé les réponses de trois microbiotests (chapitre 6) à l'aide d'un indice d'intégration (IMR). Les résultats de cet indice ont permis d'identifier les sédiments les plus écotoxiques. De même, l'indice a présenté des corrélations avec certains paramètres physico chimique des sédiments comme la taille des particules, la matière organique et certains polluants métalliques et organiques, réponses qui n'apparaissent pas forcément avec les trois microbiotests considérés individuellement. Le fait d'intégrer les réponses permet de renforcer la pertinence de la batterie utilisée.

Par ailleurs, la corrélation non significative trouvée entre les classements des sédiments de l'écotoxicité théorique, obtenue à partir de la classification de McDonald *et al.* (2000), et le classement de l'écotoxicité observée, estimée par les valeurs des indices IMR et PEEP, nous a permis de souligner que l'approche chimique ne reflète pas nécessairement les

effets écotoxicologiques. Comme nous l'avons déjà signalé dans ce chapitre, l'approche chimique est insuffisante pour évaluer l'écotoxicité potentielle des sédiments, En effet, les analyses chimiques mesurent la concentration totale de certains polluants et n'évaluent pas les effets combinés (antagonistes ou synergiques) et la biodisponibilité de ces toxiques pour les organismes. De même, ce type d'approche ne prend pas en compte les caractéristiques géochimiques des sédiments, lesquelles peuvent influencer la réponse des organismes d'essai. Différents auteurs ont signalé l'importance d'intégrer l'information chimique et les analyses écotoxicologiques avec des batteries des bioessais (Pedersen *et al.* 1998, Ghirardini *et al.* 1999, Lee 1999, Davoren *et al.* 2005, Mamindy-Pajany *et al.* 2010) pour évaluer les risques environnementaux liés aux sédiments

Les indices proposé dans ce travail de recherche (IMR et PEEP) doivent être considérés comme une manière simple de synthétiser des informations sur l'écotoxicité des sédiments, ils sont ouverts à l'intégration de réponses d'autres bioessai afin de renfoncer et de donner plus de sensibilité à notre batterie de microbiotests. Toutefois, il faut aussi tenir compte des limites de cette approche au moment de leur application, à savoir i) l'ordre des microbiotests dans le diagramme en radar pourrait modifier la valeur finale de l'indice IMR (Devin, comm. pers.), ii) la méthode de normalisation des réponses ne permet pas de comparer les valeurs d'indices d'un cas d'étude à l'autre et iii) les indices proposés n'intègrent pas les paramètres physico chimiques des sédiments avec les réponses biologiques.

7.2 Conclusions générales

Le présent travail de recherche a porté sur la validation et le développement de microbiotests en phase solide pour évaluer l'effet toxique potentiel de sédiments naturels. Sur les six microbiotests proposés au début de la thèse, nous avons focalisé nos efforts sur 4 biotests: Microtox en phase solide (Mic-SPA), luminotox en phase solide (Lum-SPA), algues en phase solide (ASPA) et ostracodes.

Du fait de leur complexité et de leur hétérogénéité, l'étude de sédiments naturels, pollués ou non, implique que les organismes d'essai ne se trouvent pas seulement confrontés à la fraction biodisponible des polluants mais aussi aux caractéristiques géochimiques naturelles des sédiments, rendant ainsi plus difficile la tâche de l'interprétation des résultats. Comme nous l'avons montré au cours de notre travail de recherche, la réponse des organismes d'essai sélectionnés serait influencée par les polluants mais aussi par certaines caractéristiques géochimiques des sédiments.

Pour avoir une mesure plus précise de l'effet toxique des sédiments associé aux polluants, il faudrait identifier, quantifier et corriger tous les biais associés aux caractéristiques géochimiques des sédiments. Au cours de ces trois ans de travail nous n'avons pas pu tous les corriger, mais nous avons proposé des améliorations surtout relatives aux effets de la granulométrie et du contenu des sédiments en matière organique.

Nous avons, en particulier, mis en évidence des biais associés aux particules fines et à la matière organique des sédiments pour les tests Mic-SPA et Lum-SPA. Dans le premier cas, la technique de cytométrie en flux a permis de montrer qu'il existait une perte de bioluminescence potentielle attribuable à la fixation ou à l'adsorption des bactéries principalement aux particules des sédiments et éventuellement à la matière organique. Ces bactéries ne sont ainsi pas récupérées après la filtration. Nous avons pu estimer cette perte de bioluminescence ce qui nous a permis de corriger les valeurs de bioluminescence. Ainsi, les techniques de cytométrie en flux nous ouvrent des perspectives intéressantes dans le cadre de l'étude de la viabilité des bactéries après exposition à des sédiments




pollués. Dans le cas du test Lum-SPA, nous avons montré que les PEC sont très sensibles aux particules fines qu'il s'agisse d'un sédiment naturel pollué ou non.

Les quatre tests sélectionnés ont présenté des réponses différentes pour chaque sédiment d'étude. Le test avec les algues a été le moins sensible. Par contre, le fait d'avoir des stimulations des croissances dans la réponse du test ASPAIC pourrait nous fournir des indications sur le risque potentiel d'eutrophisation des cours d'eaux après exposition aux sédiments.

Les tests Mic-SPA, Lum-SPA et ostracodes ont présenté un bon pouvoir de discrimination de l'écotoxicité des sédiments étudiés. Les trois tests ont identifié de manière similaire les sédiments présentant des niveaux extrêmes d'écotoxicité (très peu ou très fortement écotoxiques), la différence des réponses entre ces tests a surtout été observée pour les sédiments moyennement écotoxiques. Leur réponses n'ont pas été redondantes mais plutôt complémentaires. Cette complémentarité pourrait s'expliquer par leur appartenance à différents niveaux trophiques et par le fait que les cibles des polluants peuvent être différentes entre les organismes testés.

De plus, les microbiotests présentés constituent des outils faciles à mettre en œuvre, à bas coût, rapides et ils peuvent être appliqués à n'importe quel type de sédiment (tableau 20). Il faut aussi souligner que les microbiotests proposés dans notre travail ne peuvent pas remplacer les bioessais chroniques avec des organismes plus complexes comme ceux testés avec les macrobiotests (e.g. *C. riparius*, *H. azteca*, etc). Cette batterie de microbiotests doit donc être perçue comme un système de détection rapide pour une première évaluation de l'écotoxicité potentielle des sédiments. La réponse de notre batterie est complémentaire de celle des macrobiotests et permet ainsi d'avoir un regard plus complet sur l'état des sédiments.

Tableau 20: Résumé des trois microbiotests sélectionnés comme outil de screening pour évaluer l'écotoxicité potentielle des sédiments

Microbiotest	Paramètres retenus	Mesures accessoires	Intérêts	Inconvénients
Mic-SPA 	CI_{50} corrigés (méthode Burga-Pérez et al 2012)	% limons % argiles Test sur lixiviat phase solide	Rapidité Très discriminant Très sensible	Mesures accessoires Biais particules fines et MO
Lum-SPA 	CI_{50} (ou CI_x)	% limons % argiles	Rapidité Discriminant Sensible	Biais particules fines et MO
Ostracodes 	% maximal inhibition croissance	Non	Peu sensible aux $[O_2]$ faibles Plus voies d'absorption des polluants	Témoins non appariés

Il existe un vrai besoin de synthétiser et d'intégrer les différentes réponses de la batterie de bioessais à partir d'outils pratiques et efficaces de façon à identifier les priorités d'action entre les sites. Dans ce cadre, nous avons adapté un système simple d'intégration des réponses (IBR) à notre batterie de biotests pour calculer un IMR. Dans notre étude, l'indice IMR a présenté un bon pouvoir de discrimination entre les sédiments testés et il a également permis de mettre en évidence une différence dans la classification des sédiments par rapport à l'approche chimique (Mc Donald *et al.* 2000). Cette différence souligne l'importance d'utiliser des bioessais car ils évaluent tous les formes biodisponibles des polluants ainsi que leurs effets combinés (antagonistes ou synergiques). La méthodologie de l'indice proposé est ouverte à l'intégration de réponses d'autres bioessais, ce qui permettrait de donner plus de pertinence à l'analyse globale de l'écotoxicité potentielle des sédiments.

Références Bibliographiques

A

- Abalde, J., Cid, A., Reiriz, S., Torres, E. & Herrero, C. 1995. Response of the marine microalga *Dunaliella tertiolecta* (Chlorophyceae) to copper toxicity in short time experiments. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, **54**, 317-324.
- Adams, M. S. & Stauber, J.L. 2004. Development of a whole-sediment toxicity test using a benthic marine microalga. *Environmental Toxicology and Chemistry*, **23**, 1957-1968.
- Adler, N. E., Schmitt-Jansen, M. & Altenburger, R. 2007. Flow cytometry as a tool to study phytotoxic modes of action. *Environmental Toxicology and Chemistry*, **26**, 297-306.
- AFNOR NF T 90-375, 1998, Qualité de l'eau : Détermination de la toxicité chronique des eaux par inhibition de la croissance de l'algue d'eau douce *Pseudokirchneriella subcapitata* (*Selenastrum capricornutum*), AFNOR (Ed.), Paris.
- AFNOR. 2000. Caractérisation des boues Dosage des hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP) et des polychlorobiphényles (PCB). In: Norme expérimentale XP X 33-012
- Ahlf, W., Calmano, W., Erhard, J. & Förstner, U. 1989. Comparison of five bioassay techniques for assessing sediment-bound contaminants. *Hydrobiologia*, **188-189**, 285-289.
- Ahlf, W., Hollert, H., Neumann-Hensel, H. & Ricking, M. 2002. A guidance for the assessment and evaluation of sediment quality a German Approach based on ecotoxicological and chemical measurements. *Journal of Soils and Sediments*, **2**, 37-42.
- Allen H. E., FU G. et Deng B. (1993). Analysis of acid-volatile sulfide (AVS) and simultaneously extracted metals (SEM) for the estimation of potential toxicity in aquatic sediments. *Environmental Toxicology and Chemistry*, **12**, 1441-1453.
- Amiard, J. C. 1992. *Bioavailability of sediment-bound metals for benthic aquatic organisms*. In J. P. Vernet (Ed.), *Impact of heavy metals on the environment*, pp. 183-202. Elsevier, Amsterdam.
- Annapurna, C. & Rama Sarma, D. (1982) Sediment-ostracode relationship in the Bimili backwater and the Balacheruvu tidal stream. *Proceedings: Animal Sciences*, **91**, 297-303.

- Angell, R. W. & Hancock, J.W. 1989. Response of eggs of *Heterocypris incongruens* (Ostracoda) to experimental stress. *Journal of Crustacean Biology*, **9**, 381-386.
- Angerville, R. 2009. *Evaluation des risques écotoxicologiques liés au déversement de Rejets Urbains par Temps de Pluie (RUTP) dans les cours d'eau : Application à une ville française et à une ville haïtienne*. PhD thesis, Institut National des Sciences Appliquées de Lyon, France.
- Angerville, R., Emmanuel, E. & Perrodin, Y. 2008. Toxicity of binary mixtures of heavy metals against the freshwater algae *Pseudokirchneriella subcapitata*. *Toxicology Letters*, **180**, S178.
- Ankley, G. T., Katko, A. & Arthur, J.W. 1990. Identification of ammonia as an important sediment-associated toxicant in the lower Fox River and Green Bay, Wisconsin. *Environmental Toxicology and Chemistry*, **9**, 313-322.
- Ankley, G. T., Schubauer-Berigan, M. K. & Dierkes, J.R. 1991. Predicting the toxicity of bulk sediments to aquatic organisms with aqueous test fractions: Pore water vs. elutriate. *Environmental Toxicology and Chemistry*, **10**, 1359-1366.
- Ankley, G. T., Schubauer-Berigan, M. K. & Monson, P.D. 1995. Influence of pH and hardness on toxicity of ammonia to the amphipod *Hyaella azteca*. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, **52**, 2078-2083.
- Annapurna, C. & Rama Sarma, D. 1982. Sediment-ostracode relationship in the Bimili backwater and the Balacheruvu tidal stream. *Proceedings: Animal Sciences*, **91**, 297-303.
- Appleby, J.P. and Scarratt, D.J. 1989. Physical effects of suspended solids on marine and estuarine fish and shellfish with special reference to ocean dumping: A literature review. Canadian Technical Report of Fisheries and Aquatic Sciences No. 1681.
- Aruoja, V., Kurvet, I., Dubourguier, H. & Kahru, A. 2004. Toxicity testing of heavy-metal-polluted soils with algae *Selenastrum capricornutum*: A soil suspension assay. *Environmental Toxicology*, **19**, 396-402.

B

- Babut, M., Martel, L., Ciffroy, P. & Férard, J.F. 2011. Stratégies graduées d'évaluation des risques environnementaux induits par les sédiments fluviaux : Revue bibliographique sur la caractérisation des risques et des incertitudes associées. *Déchets Sciences & Techniques : Revue Francophone d'Ecologie Industrielle*, **60**, 7-17.
- Babut, M., Perrodin, Y., Bray, M., Clément, B., Delolme, C., Devaux, A., Durrieu, C., Garric, J., Vollat, B., Bescart, D. & Charrier, C. 2002. Évaluation des risques écologiques causés par des matériaux de dragage: Proposition d'une approche adaptée aux dépôts en gravière en eau. *Revue des Sciences de l'Eau*, **15**, 615-639.
- Baishnab, C., Tripathy, B. C. & Prasanna, M. 1980. Zinc-inhibited electron transport of photosynthesis in isolated barley chloroplasts. *Plant Physiology*, **66**, 1174-1178.
- Barata, C. & Baird, D.J. 2000. Determining the ecotoxicological mode of action of chemicals from measurements made on individuals: Results from short-duration chronic tests with *Daphnia magna* Straus. *Aquatic Toxicology*, **48**, 195-209.
- Bat, L. 2005. A review of sediment toxicity bioassays using the amphipods and polychaetes. *Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, **5**, 119-139.
- Bellemare, F., Rouette, M.E., Lorrain, L., Perron, E., Boucher, N., 2006. Combined use of photosynthetic enzyme complexes and microalgal photosynthetic systems for rapid screening of wastewater toxicity. *Environmental Toxicology*. 21, 445-449
- Beg, M. U., Al-Muzaini, S., Saeed, T., Jacob, P. G., Beg, K. R., Al-Bahloul, M., Al-Matrouk, K., Al-Obaid, T. & Kurian, A. 2001. Chemical contamination and toxicity of sediment from a coastal area receiving industrial effluents in Kuwait. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, **41**, 289-297.
- Belgis, C., Persoone, G. & Blaise, C. 2003. Cyst-based toxicity tests XV - Sensitivity comparison of the solid phase *Heterocypris incongruens* microbiotest with the *Hyalella azteca* and *Chironomus riparius* contact assays on freshwater sediments from Peninsula Harbour (Ontario, Canada). *Chemosphere*, **52**, 95-101.

- Beliaeff, B. & Burgeot, T. 2002. Integrated biomarker response: A useful tool for ecological risk assessment. *Environmental Toxicology and Chemistry*, **21**, 1316-1322.
- Benedetti, M., Ciaprini, F., Piva, F., Onorati, F., Fattorini, D., Notti, A., Ausili, A. & Regoli, F. 2012. A multidisciplinary weight of evidence approach for classifying polluted sediments: Integrating sediment chemistry, bioavailability, biomarkers responses and bioassays. *Environment International*, **38**, 17-28.
- Benton, M. J., Malott, M. L., Knight, S. S., Cooper, C. M. & Benson, W.H. 1995. Influence of sediment composition on apparent toxicity in a solid-phase test using bioluminescent bacteria. *Environmental Toxicology and Chemistry*, **14**, 411-414.
- Bergin, F., Kucuksezgin, F., Uluturhan, E., Barut, I. F., Meric, E., Avsar, N. & Nazik, A. 2006. The response of benthic foraminifera and ostracoda to heavy metal pollution in Gulf of Izmir (Eastern Aegean Sea). *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, **66**, 368-386.
- Bettazzi, F., Laschi, S. & Mascini, M. 2007. One-shot screen-printed thylakoid membrane-based biosensor for the detection of photosynthetic inhibitors in discrete samples. *Analytica Chimica Acta*, **589**, 14-21.
- Blachowiak-Samolyk, K. & Angel, M. 2007. A year round comparative study on the population structures of pelagic Ostracoda in Admiralty Bay (Southern Ocean). *Hydrobiologia*, **585**, 67-77.
- Blaise, C. 1991. Microbiotests in aquatic ecotoxicology: Characteristics, utility, and prospects. *Environmental Toxicology and Water Quality*, **6**, 145-155.
- Blaise, C. & Couture, P. 1984. Detection à l'aide d'un bio-essai (*Selenastrum capricornutum*) des repercussions d'un rejet minier sur l'environnement aquatique: Toxicité ou enrichissement en substance essentielle? *Hydrobiologia*, **114**, 39-50.
- Blaise, C. & Ménard, L. 1998. A micro-algal solid-phase test to assess the toxic potential of freshwater sediments. *Water Quality Research of Canada*, **33**, 133-155.
- Blaise, C. & Vasseur, P. 2005. *Algal microplate toxicity test*. In C. Blaise & J. F. Férard (Eds.), *Small-scale freshwater toxicity investigations*, pp. 137-179. Springer, Dordrecht.
- Blaise C. et Férard J.F., 2005, *Small-scale Freshwater Toxicity Investigations*, vol. 1 et 2, Springer, Dordrecht, Pays-Bas.

- Blaise, C., Forghani, R., Legault, R., Guzzo, J. & Dubow, M.S. 1994. A bacterial toxicity assay performed with microplates, microluminometry and Microtox reagent. *Biotechniques*, **16**, 932-937.
- Blaise, C., Gagné, F. & Bombardier, M. 2000. Recent developments in microbiotesting and early millennium prospects. *Water, Air, & Soil Pollution*, **123**, 11-23.
- Blaise, C., Gagné, F., Chèvre, N., Harwood, M., Lee, K., Lappalainen, J., Chial, B., Persoone, G. & Doe, K. 2004. Toxicity assessment of oil-contaminated freshwater sediments. *Environmental Toxicology*, **19**, 267-273.
- Blaise, C., Van Coillie, R., Bermingham, N. & Coulombe, G. 1986. A simple microplate algal assay technique for aquatic toxicity assessment. *Toxicity Assessment*, **1**, 261-281.
- Blasco, C. & Picó, Y. 2009. Prospects for combining chemical and biological methods for integrated environmental assessment. *Trends in Analytical Chemistry*, **28**, 745-757.
- Bodergat, A. M., Ikeya, N. & Irzi, Z. 1998. Domestic and industrial pollution: use of ostracods (Crustacea) as sentinels in the marine coastal environment. *Journal de Recherche Oceanographique*, **23**, 139-144.
- Bombardier, M. 2005. *The SED-TOX Index for toxicity assessment of contaminated solid matrices*. In C. Blaise & J. F. Férard (Eds.), *Small-scale freshwater Toxicity Investigations*, pp. 257-280. Springer, Netherlands.
- Bombardier, M. 2007. *Développement d'outils écotoxicologiques pour l'évaluation de sé*France*s*. PhD thesis, Université de Metz, France.
- Bombardier, M. & Bermingham, N. 1999. The SED-TOX index: Toxicity-directed management tool to assess and rank sediments based on their hazard - concept and application. *Environmental Toxicology and Chemistry*, **18**, 685-698.
- Boucher, N. & Carpentier, R. 1999. Hg²⁺, Cu²⁺, and Pb²⁺-induced changes in photosystem II photochemical yield and energy storage in isolated thylakoid membranes: A study using simultaneous fluorescence and photoacoustic measurements. *Photosynthesis Research*, **59**, 167-174.
- Boucher, N., Lorrain, L., Rouette, M. E., Perron, E., Déziel, N., Tessier, L. & Bellemare, F. 2005. Rapid testing of toxic chemicals. *American Laboratory*, **37**, 34-37.

- Boyd, E. M., Killham, K., Wright, J., Rumford, S., Hetheridge, M., Cumming, R. & Meharg, A.A. 1997. Toxicity assessment of xenobiotic contaminated groundwater using lux modified *Pseudomonas fluorescens*. *Chemosphere*, **35**, 1967-1985.
- Brouwer, H. & Murphy, T. 1995. Volatile sulfides and their toxicity in freshwater sediments. *Environmental Toxicology and Chemistry*, **14**, 203-208.
- Brouwer, H., Murphy, T. & McArdle, L. 1990. A sediment-contact bioassay with *Photobacterium phosphoreum*. *Environmental Toxicology and Chemistry*, **9**, 1353-1358.
- Bulich, A. A. 1979. *Use of luminescent bacteria for determining toxicity in aquatic environments*. In L. L. Marking & R. A. Kimerle (Eds.), *Aquatic Toxicology*, pp. 98-106. American Society for Testing Materials, Philadelphia, PA.
- Buonasera, K., Lambrea, M., Rea, G., Touloupakis, E. & Giardi, M. 2011. Technological applications of chlorophyll a fluorescence for the assessment of environmental pollutants. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, **401**, 1139-1151.
- Burga Pérez, K. F. B., Charlatchka, R., Sahli, L. & Férard, J.F. 2012. New methodological improvements in the Microtox® solid phase assay. *Chemosphere*, **86**, 105-110.
- Burgess, R. M., Schweitzer, K. A., McKinney, R. A. & Phelps, D.K. 1993. Contaminated marine sediment : Water column and interstitial toxic effect. *Environmental Toxicology and Chemistry*, **12**, 127-138.
- Burton Jr, G. A., Baudo, R., Beltrami, M. & Rowland, C. 2001. Assessing sediment contamination using six toxicity assays . *Journal of Limnology*, **60**, 263-267.
- Burton Jr, G. A., Ingersoll, C. G., Burnett, L. C., Henry, M., Hinman, M. L., Klaine, S. J., Landrum, P. F., Ross, P. & Tuchman, M. 1996. A comparison of sediment toxicity test methods at three Great Lake areas of concern. *Journal of Great Lakes Research*, **22**, 495-511.
- Burton, G. A. 1991. Assessing the toxicity of freshwater sediments. *Environmental Toxicology and Chemistry*, **10**, 1585-1627.
- Burton, G.A., Jr. 1992. Sediment toxicity assessment. Lewis Publishers, Chelsea, MI.

C

- Calabrese, E. J. & Baldwin, L.A. 1998. Hormesis as a biological hypothesis. *Environmental Health Perspectives*, **106**, 357-362.
- Calabrese, E. J. & Baldwin, L.A. 2002. Application of hormesis in toxicology, risk assessment and chemotherapeutics. *Trends in Pharmacological Sciences*, **23**, 331-337.
- Campbell, P. G. C., Twiss, M. R. & Wilkinson, K.J. 1997. Accumulation of natural organic matter on the surfaces of living cells: Implications for the interaction of toxic solutes with aquatic biota. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, **54**, 2543-2554.
- Campisi, T., Abbondanzi, F., Casado-Martinez, C., Del Valls, T.A., Guerra, R., Iacondini, A., 2005. Effects of sediment turbidity and color on light output measurements for Microtox Basic Solid-Phase Test. *Chemosphere*, **60**, 9-15
- Canna-Michaelidou, S., Nicolaou, A. S., Neopfytoy, E. & Christodoulidou, M. 2000. *The use of a battery of micobiotests as a tool for integrated pollution control: Evaluation and perspectives in Cyprus*. In G. Persoone, C. Janssen & W. De Coen (Eds.), *New micobiotests for routine toxicity screening and biomonitoring*, pp. 39-49. Kluwer Academic, New York.
- Castillo, G. C., Vila, I. C. & Neild, E. 2000. Ecotoxicity assessment of metals and wastewater using multitrophic assays. *Environmental Toxicology*, **15**, 370-375.
- Castro, O. G. & Vale, C. 1995. Total PCB-organic matter correlation in sediments from three estuarine areas of Portugal. *Aquatic Ecology*, **29**, 297-302.
- Cedeno-Maldonado, A., Swader, J. A. & Heath, R.L. 1972. The copper ion as an inhibitor of photosynthetic electron transport in isolated chloroplasts. *Plant Physiology*, **50**, 698-701.
- Chapman, P., Wang, F., Janssen, C., Persoone, G. & Allen, H. 1998. Ecotoxicology of metals in aquatic sediments: binding and release, bioavailability, risk assessment, and remediation. Journal canadien des sciences halieutiques et aquatiques, 55(10), 2221-2243.**
- Chapman, P. M. & Anderson, J. 2005. A decision-making framework for sediment contamination. *Integrated Environmental Assessment and Management*, **1**, 163-173.

- Chapman, P. M. & Hollert, H. 2006. Should the sediment quality triad become a tetrad, a pentad, or possibly even a hexad? *Journal of Soils and Sediments*, **6**, 4-8.
- Chapman, P. M. & Long, E.R. 1983. The use of bioassays as a part of a comprehensive approach to marine pollution assessment. *Marine Pollution Bulletin*, **14**, 81-84.
- Chapman, P. M., Ho, K. T., Jr, W. R. M., Solomon, K. & Weinstein, M.P. 2002. Issues in sediment toxicity and ecological risk assessment. *Marine Pollution Bulletin*, **44**, 271 - 278.
- Chapman, P. M., MacDonald, B. G. & Lawrence, G.S. 2002. Weight-of-evidence issues and frameworks for sediment quality (and other) assessments. *Human and Ecological Risk Assessment*, **8**, 1489-1515.
- Chapman, P. M., Swartz, R. C., Roddie, B., Phelps, H. L., van den Hurk, P. & Butler, R. 1992. An international comparison of sediment toxicity tests in the North Sea. *Marine Ecology Progress Series*, **91**, 253-264.
- Chen, C. Y. 1989. The effects of limiting nutrient to algal toxicity assessment: A theoretical approach. *Toxicity Assessment*, **4**, 35-42.
- Chial, B. & Persoone, G. 2002. Cyst-based toxicity tests XIV - Application of the ostracod solid-phase microbiotest for toxicity monitoring of river sediments in Flanders (Belgium). *Environmental Toxicology*, **17**, 533-537.
- Chial, B. & Persoone, G. 2002. Cyst-based toxicity tests XIII - Development of a short chronic sediment toxicity test with the ostracod crustacean *Heterocypris incongruens*: Methodology and precision. *Environmental Toxicology*, **17**, 528-532.
- Chial, B. & Persoone, G. 2002. Cyst-based toxicity tests XIII - Development of a short chronic sediment toxicity test with the ostracod crustacean *Heterocypris incongruens*: Methodology and precision. *Environmental Toxicology*, **17**, 528-532.
- Chiaudani, G. & Vichi, M. 1978. The use of *Selenastrum capricornutum* batch cultures in toxicity studies. *Mitteilung Internationale Vereinigung fuer Theoretische unde Angewandte Limnologie*, **21**, 316-329.
- Cid, A., Herrero, C., Torres, E. & Abalde, J. 1995. Copper toxicity on the marine microalga *Phaeodactylum tricorutum*: Effects on photosynthesis and related parameters. *Aquatic Toxicology*, **31**, 165-174.

- Cleveland, L., Little, E. E., Petty, J. D., Johnson, B. T., Lebo, J. A., Orazio, C. E., Dionne, J. & Crockett, A. 1997. Toxicological and chemical screening of Antarctica sediments: Use of whole sediment toxicity tests, Microtox, Mutatox and semipermeable membrane devices (SPMDs). *Marine Pollution Bulletin*, **34**, 194-202.
- Coccia, A. M., Gucci, P. M. B., Lacchetti, I., Beccaloni, E., Paradiso, R., Beccaloni, M. & Musmeci, L. 2009. Hydrocarbon contaminated soil treated by bioremediation technology: Microbiological and toxicological preliminary findings. *Environmental Biotechnology*, **5**, 61-72.
- Colas, F. 2012. *Outils de diagnose structurelle et fonctionnelle pour la bioévaluation de la qualité des sédiments associés à la présence de barrages. Approche intégrée de la population au processus Francetémique*. PhD thesis, Université Lorraine, France.
- Cook, N. H. & Wells, P.G. 1996. Toxicity of Halifax Harbour sediments: An evaluation of the Microtox® solid-phase test. *Water Quality Research Journal of Canada*, **31**, 673-708.
- Costan, G., Bermingham, N., Blaise, C. & Ferard, J.F. 1993. Potential ecotoxic effects probe (PEEP): A novel index to assess and compare the toxic potential of industrial effluents. *Environmental Toxicology and Water Quality*, **8**, 115-140.
- Costerton J W, Marrie T J , Cheng K J 1985 Phenomena of bacterial adhesion. In: Savage D C, Fletcher M (eds) Bacterial adhesion: mechanisms and physiological significance. Plenum Press, New York, p 3-43.
- Cotou, E., Papathanassiou, E. & Tsangaris, C. 2002. Assessing the quality of marine coastal environments: Comparison of scope for growth and microtox bioassay results of pollution gradient areas in eastern Mediterranean (Greece). *Environmental Pollution*, **9**, 119-141.
- Cullen, J. J. & Davis, R.F. 2003. The blank can make a big difference in oceanographic measurements . *Limnology and Oceanography Bulletin*, **12**, 29-35.

D

- Dahlin, C. 2003. Surface charge densities and membrane fluidities in thylakoids with different degrees of thylakoid appression after norflurazon treatment. *Photosynthetica*, **41**, 635-639.

- Damiens, G., Gnassia-Barelli, M., Loquès, F., Roméo, M. & Salbert, V. 2007. Integrated biomarker response index as a useful tool for environmental assessment evaluated using transplanted mussels. *Chemosphere*, **66**, 574-583.
- Davoren, M., Ní-Shúilleabháinn, S., Halloran, J. O., Hartl, M. G. J., Sheehan, D., O'Brien, N. M., Van Pelt, F. N. A. M. & Mothersill, C. 2005. A test battery approach for the ecotoxicological evaluation of estuarine sediments. *Ecotoxicology*, **14**, 741-755.
- Day, K. E., Dutka, B. J., Kwan, K. K., Batista, N., Reynoldson, T. B. & Metcalfe-Smith, J.L. 1995. Correlations between solid-phase microbial screening assays, whole-sediment toxicity tests with macroinvertebrates and in situ benthic community structure. *Journal of Great Lakes Research*, **21**, 192-206.
- Debenest, T., Gagné, F., Petit, A. N., André, C., Kohli, M. & Blaise, C. 2010. Ecotoxicity of a brominated flame retardant (tetrabromobisphenol A) and its derivatives to aquatic organisms. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, **152**, 407-412.
- Del Valls, T. Á., Lubián, L. M., Forja, J. M. & Gómez-Parra, A. 1997. Comparative ecotoxicity of interstitial waters in littoral ecosystems using Microtox® and the rotifer *Brachionus plicatilis*. *Environmental Toxicology and Chemistry*, **16**, 2323-2332.
- Dellamatrice, P. M., Monteiro, R. T., Blaise, C., Slabbert, J. L., Gagné, F. & Alleau, S. 2006. Toxicity assessment of reference and natural freshwater sediments with the LuminoTox assay. *Environmental Toxicology*, **4**, 395-402.
- Dewez, D., Boucher, N., Bellemare, F. & Popovic, R. 2007. Use of different fluorometric systems in the determination of fluorescence parameters from spinach thylakoid membranes being exposed to atrazine and copper. *Toxicological and Environmental Chemistry*, **89**, 655-664.
- Di Toro, D. M., Zarba, C. S., Hansen, D. J., Berry, W. J., Swartz, R. C., Cowan, C. E., Pavlou, S. P., Allen, H. E., Thomas, N. A. & Paquin, P.R. 1991. Technical basis for establishing sediment quality criteria for nonionic organic chemicals using equilibrium partitioning. *Environmental Toxicology and Chemistry*, **10**, 1541-1583.
- Djomoa, J. E., Dautaa, A. & Moreaua, F. 1993. Bioévaluation du potentiel d'eutrophisation du phosphore des lixiviats de boues, de forage pétrolier. *Annales de Limnologie - International Journal of Limnology*, **29**, 103-109.

- Doe, K., Scroggins, R., Mcleay, D. & Wohlgeschaffen, G. 2005. *Solid-phase test for sediment toxicity using the luminescent bacterium *Vibrio fischeri**. In C. Blaise & J. F. Férard (Eds.), *Small-scale freshwater toxicity investigations*, pp. 107-136. Springer, Dordrecht.
- Doherty, F. G. 2001. A review of the Microtox® toxicity test system for assessing the toxicity of sediments and soils. *Water Quality Research Journal of Canada*, **36**, 475-518.
- Dole-Olivier, M. J., Galassi, D. M. P., Marmonier, P. & Creuzé Des Châtelliers, M. 2000. The biology and ecology of lotic microcrustaceans. *Freshwater Biology*, **44**, 63-91.
- Domene, X., Alcañiz, J. M. & Andrés, P. 2008. Comparison of solid-phase and eluate assays to gauge the ecotoxicological risk of organic wastes on soil organisms. *Environmental Pollution*, **151**, 549 - 558.
- Dorsey, J., Yentsch, C. M., Mayo, S. & McKenna, C. 1989. Rapid analytical technique for the assessment of cell metabolic activity in marine microalgae. *Cytometry*, **10**, 622-628.
- Duperray, C., Costes, V., Baldet, P. & Parpaleix, T. 1993. Cytométrie en flux et en image: Principes et applications. *Acta Endoscopica*, **23**, 285-294.
- Dutka, B. J., Kwan, K. K., Rao, S. S., Jurkovic, A., McInnis, R., Palmateer, G. A. & Hawkins, B. 1991. Use of bioassays to evaluate river water and sediment quality. *Environmental Toxicology and Water Quality*, **6**, 309-327.
- Dutka, B. J., Nyholm, N. & Petersen, J. 1983. Comparison of several microbiological toxicity screening tests. *Water Research*, **17**, 1363-1368.

E

- European Council. 2000. *Directive 2000/60/EC of the European Parliament and of the Council of 23 October 2000 establishing a framework for Community action in the field of water policy*. Office for official publications of the European Communities, Brussels. 72p.
- Evans, K. M., Gill, R. A. & Robotham, P.W.J. 1990. The PAH and organic content of sediment particle size fractions. *Water, Air, & Soil Pollution*, **51**, 13-31.

F

- Fargašová, A. 1998. Comparison of Effects of Tributyl-, Triphenyl-, and Tribenzyltin Compounds on Freshwater Benthos and Alga *Scenedesmus quadricauda*. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, **60**, 9-15.
- Farre, M. & Barcelo, D. 2003. Toxicity testing of wastewater and sewage sludge by biosensors, bioassays and chemical analysis. *Trends in Analytical Chemistry*, **22**, 299-310.
- Feiler, U., Ahlf, W., Höss, S., Hollert, H., Neumann-Hensel, H., Meller, M., Weber, J. & Heininger, P. 2005. The SeKT Joint Research Project: Definition of reference conditions, control sediments and toxicity thresholds for limnic sediment contact tests. *Environmental Science and Pollution Research*, **12**, 257-258.
- Fein, J.B., Boily, J.F., Guçlu, K., Kaulbach, E., 1999. Experimental study of humic acid adsorption onto bacteria and Al-oxide mineral surfaces. *Chemistry Geology*, **162**, 33-457
- Férard, J. F., Vasseur, P., Danoux, L. & Larbaigt, G. 1983. Application d'un test d'inhibition de luminescence bactérienne à l'étude toxicologique d'effluents complexes et de substances chimiques. *Revue Française des Sciences de l'Eau*, **2**, 221-237.
- Férard, J.F. & Ferrari, B. 2005. Wastoxhas : A bioanalytical strategy for solid wastes assessment, in *Small-scale Freshwater Toxicity Investigations*, vol.2, chap.12, Blaise C. & Férard J.F.(Eds), Springer, Dordrecht, Pays-Bas.
- Filip, D. S. & Middlebrooks, E.J. 1976. Eutrophication potential of dairy cattle waste runoff. *Water Research*, **10**, 89-93.
- Förstner, U. 1983. *Metal pollution assessment from sediment analysis*. In U. Förstner & G. T. W. Wittman (Eds.), *Metal pollution in the aquatic environment*, pp. 110-196. Springer, Verlag.
- Franklin, N. M., Adams, M. S., Stauber, J. L. & Lim, R.P. 2001. Development of an improved rapid enzyme inhibition bioassay with marine and freshwater microalgae using flow cytometry. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, **40**, 469-480.
- Franqueira, D., Orosa, M., Torres, E., Herrero, C. & Cid, A. 2000. Potential use of flow cytometry in toxicity studies with microalgae. *Science of the Total Environment*, **247**, 19-126.

Fulladosa, E., Murat, J. C., Martínez, M. & Villaescusa, I. 2005. Patterns of metals and arsenic poisoning in *Vibrio fischeri* bacteria. *Chemosphere*, **60**, 43-48.

G

Gala, W. R. & Giesy, J.P. 1990. *Flow cytometric techniques to assess toxicity to algae*. In W. G. Landis & W. H. van der Schalie (Eds.), *Aquatic toxicology and risk assessment: Thirteenth volume*, pp. 237-246. American Society for Testing and Materials, Philadelphia.

Ganning, B. 1971. On the ecology of *Heterocypris salinus*, *H. incongruens* and *Cypridopsis aculeata* (Crustacea: Ostracoda) from Baltic brackish-water rockpools. *Marine Biology*, **8**, 271-279.

Gao, J. P., Maguhn, J., Spitzauer, P. & Kettrup, A. 1998. Sorption of pesticides in the sediment of the Teufelsweiher pond (Southern Germany). I: Equilibrium assessments, effect of organic carbon content and pH. *Water Research*, **32**, 1662-1672.

García-Lorenzo, M., Martínez-Sánchez, M., Pérez-Sirvent, C. & Molina, J. 2009. Ecotoxicological evaluation for the screening of areas polluted by mining activities. *Ecotoxicology*, **18**, 1077-1086.

Gasol, J.M., Del Giorgio P.A., 2000. Using flow cytometry for counting natural planktonic bacteria and understanding the structure of planktonic bacterial communities. *Scientia Marina*, **64**, 197-224

Geffard, O. 2001. *Toxicité potentielle des sédiments marins et estuariens contaminés: Evaluation chimique et biologique, biodisponibilité des contaminants sédimentaires*. thèse, Université Bordeaux I, France.

Geffard, O., Geffard, A., His, E. & Budzinski, H. 2003. Assessment of the bioavailability and toxicity of sediment-associated polycyclic aromatic hydrocarbons and heavy metals applied to *Crassostrea gigas* embryos and larvae. *Marine Pollution Bulletin*, **46**, 481-490.

Gerhold, R. M. & Otto, R.G. 1976. Algal bioassays to evaluate a proposed cooling lake. *Water Pollution Control Federation*, **48**, 2351-2366.

- Ghirardini, A. V., Birkemeyer, T., Novelli, A. A., Delaney, E., Pavoni, B. & Ghetti, P.F. 1999. An integrated approach to sediment quality assessment: The Venetian lagoon as a case study. *Aquatic Ecosystem Health and Management*, **2**, 435-447.
- Giardi, M. T., Koblížek, M. & Masojídek, J. 2001. Photosystem II-based biosensors for the detection of pollutants. *Biosensors and Bioelectronics*, **16**, 1027-1033.
- Giesy, J. P. & Hoke, R.A. 1989. Freshwater sediment toxicity bioassessment: Rationale for species selection and test design. *Journal of Great Lakes Research*, **15**, 539-569.
- Giesy, J. P., Graney, R. L., Newsted, J. L., Rosiuan, C. J., Benda, A., Kreis, R. G. & Horvath, F.J. 1988. Comparison of three sediment bioassay methods using detroit river sediments. *Environmental Toxicology and Chemistry*, **7**, 483-498.
- Giesy, J. P., Rosiu, C. J., Graney, R. L. & Henry, M.G. 1990. Benthic invertebrate bioassays with toxic sediment and pore water. *Environmental Toxicology and Chemistry*, **9**, 233-248.
- Gorski, P. R., Armstrong, D. E., Hurley, J. P. & Krabbenhoft, D.P. 2008. Influence of natural dissolved organic carbon on the bioavailability of mercury to a freshwater alga. *Environmental Pollution*, **154**, 116-123.
- Grapentine, L., Anderson, J., Boyd, D., Burton, A., DeBarros, C., Johnson, G., Marvin, C., Milani, D., Painter, S., Pascoe, T., Reynoldson, T., Richman, L., Solomon, K. & Chapman, P.M. 2002. A decision making framework for sediment assessment developed for the great lakes. *Human and Ecological Risk Assessment*, **8**, 1641-1655.
- Green, J. 1959. Pigmentation of an ostracod, *Heterocypris incongruens*. *Journal of Experimental Biology*, **36**, 575-582.
- Greene, M. W., Bulich, A. A. & Underwood, S.R. 1992. Measurement of soil and sediment toxicity to bioluminescent bacteria when in direct contact for a fixed time period. In: *Proceedings, 65th Annual Conference and Exposition, Water Environment Federation, New Orleans, USA. September 20-24.*
- Gulshan, A. L. 1987. Effect of Temperature on the Development of Embryonic and Postembryonic Stages of *Heterocypris incongruens* (Ramdohr, 1808) (Ostracoda). *Crustaceana*, **52**, 95-100.

- Guskov, A., Kern, J., Gabdulkhakov, A., Broser, M., Zouni, A. & Saenger, W. 2009. Cyanobacterial photosystem II at 2.9-Å resolution and the role of quinones, lipids, channels and chloride. *Nature Structural & Molecular Biology*, **16**, 334-342.
- Guéguen, C., Koukal, B., Dominik, J. & Pardos, M. 2003. Competition between alga (*Pseudokirchneriella subcapitata*), humic substances and EDTA for Cd and Zn control in the algal assay procedure (AAP) medium. *Chemosphere*, **53**, 927-934.
- Guerra, R., Pasteris, A., Ponti, M., Fabbri, D., Bruzzi, L., 2007. Impact of dredging in a shallow coastal lagoon: Microtox Basic Solid-Phase Test, trace metals and Corophium bioassays. *Environment International*, **33**, 469-473

H

- Hagopian-Schlekat, T., Chandler, G. T. & Shaw, T.J. 2001. Acute toxicity of five sediment-associated metals, individually and in a mixture, to the estuarine meiobenthic harpacticoid copepod *Amphiascus tenuiremis*. *Marine Environmental Research*, **51**, 247-264.
- Hamdi, H., Benzarti, S., Manusadzianas, L., Aoyama, I. & Jedidi, N. 2007. Solid-phase bioassays and soil microbial activities to evaluate PAH-spiked soil ecotoxicity after a long-term bioremediation process simulating landfarming. *Chemosphere*, **70**, 135-143.
- Hampel, M., Moreno-Garrido, I., Sobrino, C., Lubián, L. M. & Blasco, J. 2001. Acute toxicity of LAS homologues in marine microalgae: Esterase activity and inhibition growth as endpoints of toxicity. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, **48**, 287-292.
- Hansen P.S., Philips E.J. & Aldridge F.J. 1997. The effects of sediment resuspension on phosphorus available for algal growth in a shallow subtropical lake, Lake Okeechobee. *Journal of Lake and Reservoir Management*, **13**, 154-159.
- Harkey, G. A., Landrum, P. F. & Klaine, S.J. 1994. Comparison of whole-sediment, elutriate and pore-water exposures for use in assessing sediment-associated organic contaminants in bioassays. *Environmental Toxicology and Chemistry*, **13**, 1315-1329.
- Hartl, M. G., van Pelt, F. N. A. M., O'Halloran, J., Hall, K., Harding, L., McLeay, D., Nassichuk, M. & Knapp, W. 2005. *Development and application of sediment toxicity tests for regulatory purposes*. In J. H. Lehr (Ed.), *Encyclopedia of Water*, pp. 383-387. John Wiley & Sons, New-York.

- Hickey, C., Blaise, C. & Costan, G. 1991. Microtesting appraisal of ATP and cell recovery endpoints after acute exposure of *Selesnstrum capricornotum* to selected chemicals. *Toxicity Assessment*, **6**, 383-403.
- Hindák, F. 1990. *Studies on the Chlorococcal Algae (Chlorophyceae)*. V. Veda, Bratislava.
- Hiruta, S. F., Hiruta, S. & Mawatari, S.F. 2007. *A new, interstitial species of Terrestrialitythere (Crustacea: Ostracoda) and its microdistribution at Orito Beach, northeastern Sea of Japan*. In Matzke-Karasz, Renate and Martens, Koen and Schudack, Michael and Dumont, H. J. (Ed.), *Ostracodology: Linking Bio- and Geosciences*, pp. 43-56. Springer, Netherlands.
- Horne, D. 2005. Homology and homoeomorphy in ostracod limbs. *Hydrobiologia*, **538**, 55-80.
- Horng, C. Y. & Taghon, G.L. 1999. Effects of contaminated sediments on particle size selection by the polychaete *Capitella* sp. I. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, **242**, 41-57.
- Horsfall, M. & Spiff, A. 2002. Distribution and partitioning of trace metals in sediments of the lower reaches of the New Calabar river, Port Harcourt, Nigeria. *Environmental Monitoring and Assessment*, **78**, 309-326.
- Horvatic, J., Persic, V. & Mihaljevic, M. 2006. Bioassay method in evaluation of trophic conditions and nutrient limitation in the Danube wetland waters. *Hydrobiologia*, **563**, 453-463.
- Hsu, B. D. & Lee, J.Y. 1988. Toxic effects of copper on photosystem II of spinach chloroplasts. *Plant Physiology*, **87**, 116-119.
- Hund, K. 1997. Algal growth inhibition test - Feasibility and limitations for soil assessment. *Chemosphere*, **35**, 1069-1082.
- Hyne, R. V., Pablo, F., Julli, M. & Markich, S.J. 2005. Influence of water chemistry on the acute toxicity of copper and zinc to the cladoceran *Ceriodaphnia cf dubia*. *Environmental Toxicology and Chemistry*, **24**, 1667-1675.
- Höss, S., Haitzer, M., Traunspurger, W., Gratzner, H., Ahlf, W. & Steinberg, C. 1997. Influence of particle size distribution and content of organic matter on the toxicity of copper in sediment bioassays using *Caenorhabditis elegans* (Nematoda). *Water, Air, & Soil Pollution*, **99**, 689-695.

I

ISO 8692. 2004, Qualité de l'eau -- Essai d'inhibition de la croissance des algues d'eau douce avec des algues vertes unicellulaires, ISO (Ed.), Paris

Ivanova, E.P; Dineva, N. M; Mocanasu, R. C; Murphy, S; Wang, J; Riessen, G; Crawford, R. 2008. *Vibrio fischeri* and *Escherichia coli* adhesion tendencies towards photolithographically modified nanosmooth poly (tert-butyl methacrylate) polymer surfaces. *Nanotechnology, Science and Applications*, **1**, 33-44.

J

Jacobs, M. W., Delfino, J. J. & Bitton, G. 1992. The toxicity of sulfur to microtox® from acetonitrile extracts of contaminated sediments. *Environmental Toxicology and Chemistry*, **11**, 1137-1143.

Janssen, C. R., Vangheluwe, M. & Van Sprang, P. 2000. *A brief review and critical evaluation of the status of microbiotests*. In G. Persoone, C. Janssen & W. De Coen (Eds.), *New microbiotests for routine toxicity screening and biomonitoring*, pp. 27-37. Plenum Publishers, New York.

Jeffrey, S. W. & Humphrey, G.F. 1975. New spectrophotometric equations for determining chlorophyll a, b, C1 and C2 in higher plants, algae and natural phytoplankton. *Biochemie und Physiologie der Pflanzen*, **167**, 191-194.

Jennings, V. L., Rayner-Brandes, M. H. & Bird, D.J. 2001. Assessing chemical toxicity with the bioluminescent photobacterium (*vibrio fischeri*): a comparison of three commercial systems. *Water Research*, **35**, 3448-3456.

Jo, Q., Choy, E. J., Kang, C. K., Moon, H. B., Lee, S. J., Kim, D. H. & Lee, J.H. 2008. Effects of the coastal sediment elutriates containing persistent organic pollutants (POPs) on early reproductive outputs of the Pacific oyster, *Crassostrea gigas*. *Journal of Environmental Biology*, **29**, 507-512.

Johnson, T. B. 2005. *Microtox acute toxicity test*. In C. Blaise & J. F. Férard (Eds.), *Small-scale freshwater toxicity investigations*, pp. 69-105. Springer, Netherlands.

Joner, E. J., Hirmann, D., Szolar, O. H. J., Todorovic, D., Leyval, C. & Loibner, A.P. 2004. Priming effects on PAH degradation and ecotoxicity during a phytoremediation experiment. *Environmental Pollution*, **128**, 429-435.

- Joubert, G. 1980. A bioassay application for quantitative toxicity measurements, using the green algae *Selenastrum capricornutum*. *Water Research*, **14**, 1759-1763.
- Juneau, P. & Popovic, R. 1999. Evidence for the rapid phytotoxicity and environmental stress evaluation using the PAM fluorometric method: Importance and future application. *Ecotoxicology*, **8**, 449-455.

K

- Kaiser, K. L. 1998. Correlations of *Vibrio fischeri* bacteria test data with bioassay data for other organisms. *Environmental Health Perspectives*, **106**, 583-591.
- Kammann U., Biselli S., Reineke N., Wosniok W., Danischewski D., Hühnerfuss H., Kinder A., Sierts-Herrmann A., Theobald N., Vahl HH et al., 2005, Bioassay-directed Fractionation of Organic Extracts of Marine Surface Sediments from the North and Baltic Sea - Part II: Results of the biotest battery and development of a biotest index, *Journal Soils & Sediments*, **5**, 225-232.
- Kamaya, Y., Tsuboi, S., Takada, T. & Suzuki, K. 2006. Growth stimulation and inhibition effects of 4-hydroxybenzoic acid and some related compounds on the freshwater green alga *Pseudokirchneriella subcapitata*. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, **51**, 537-541.
- Kaplan, D., Heimer, Y. M., Abeliovich, A. & Goldsbrough, P.B. 1995. Cadmium toxicity and resistance in *Chlorella* sp. *Plant Science*, **109**, 129-137.
- Karanovic, I. & Marmonier, P. 2002. On the genus *Candonopsis* (Crustacea : ostracoda : Candoninae) in Australia, with a key to the world recent species. *Annales de Limnologie*, **38**, 1992-240.
- Kemble, N. E., Hardesty, D. G., Ingersoll, C. G., Johnson, B. T., Dwyer, F. J. & MacDonald, D.D. 2000. An Evaluation of the Toxicity of Contaminated Sediments from Waukegan Harbor, Illinois, Following Remediation. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, **39**, 452-461.

- Khengarot, B. S. & Das, S. 2009. Acute toxicity of metals and reference toxicants to a freshwater ostracod, *Cypris subglobosa* Sowerby, 1840 and correlation to EC50 values of other test models. *Journal of Hazardous Materials*, **172**, 641-649.
- Kiefer, D. A. & Reynolds, R.A. 1992. *Advances in understanding phytoplankton fluorescence and photosynthesis*. In P. G. Falkowski & A. D. Woodhead (Eds.), *Primary productivity and biogeochemical cycles in the sea*, . Plenum Press, New York.
- Knauer, K. & Buffle, J. 2001. Adsorption of fluvic acid on algal surfaces and its effect on carbon uptake. *Journal of Phycology*, **37**, 47-51.
- Koukal, B., Guéguen, C., Pardos, M. & Dominik, J. 2003. Influence of humic substances on the toxic effects of cadmium and zinc to the green alga *Pseudokirchneriella subcapitata*. *Chemosphere*, **53**, 953-961.
- Krause, G. & Weis, E. 1984. Chlorophyll fluorescence as a tool in plant physiology. *Photosynthesis Research*, **5**, 139-157.
- Krause, G. H. & Jahns, P. 2003. *Pulse amplitude modulated fluorometry and its application in plant science*. In . In B. R. Green & W. Parson (Eds.), *Light Harvesting Antennas in Photosynthesis*, pp. 373-399. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht.
- Kudlak, B., Wolska, L. & Namiesnk, J. 2011. Determination of EC50 toxicity data of selected heavy metals toward *Heterocypris incongruens* and their comparison to a "direct-contact" and microbiotests. *Environmental Monitoring and Assessment*, **174**, 509-516.
- Kukkonen, J. & Landrum, P.F. 1996. Distribution of organic carbon and organic xenobiotics among different particle-size fractions in sediments. *Chemosphere*, **32**, 1063-1076.
- Kwan, K. K. & Dutka, B.J. 1990. Simple two-step sediment extraction procedure for use in genotoxicity and toxicity bioassays. *Toxicity Assessment*, **5**, 395-404.
- Kwan, K. K. & Dutka, B.J. 1995. Comparative assessment of two solid-phase toxicity bioassays: The direct sediment toxicity testing procedure (DSTTP) and the microtox® solid-phase test (SPT). *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, **55**, 338-346.
- Källqvist, T., Milacic, R., Smital, T., Thomas, K., Vranes, S. & Tollefsen, K.E. 2008. Chronic toxicity of the Sava River (SE Europe) sediments and river water to the algae *Pseudokirchneriella subcapitata*. *Water Research*, **42**, 2146-2156.

Kühn, R. & Pattard, M. 1990. Results of the harmful effects of water pollutants to green algae (*Scenedesmus subspicatus*) in the cell multiplication inhibition test. *Water Research*, **24**, 31-38.

L

Laberge, D., Chartrand, J., Rouillon, R. & Carpentier, R. 1999. In vitro phytotoxicity screening test using immobilized spinach thylakoids. *Environmental Toxicology and Chemistry*, **18**, 2851-2858.

Lahr, J., Maas-Diepeveen, J. L., Stuijzand, S. C., Leonards, P. E., Drüke, J. M., Lücker, S., Espeldoorn, A., Kerkum, L. C., Van Stee, L. L. & Hendriks, A.J. 2003. Responses in sediment bioassays used in the Netherlands: Can observed toxicity be explained by routinely monitored priority pollutants? *Water Res*, **37**, 1691-1670.

Lamelas, C., Wilkinson, K. J. & Slaveykova, V.I. 2005. Influence of the composition of natural organic matter on Pb bioavailability to microalgae. *Environmental Science & Technology*, **39**, 6109-6116.

Lannalainen, J., Juvonen, R., Vaajasaari, K. & Karp, M. 1999. A new flash method for measuring the toxicity of solid and colored samples. *Chemosphere*, **38**, 1069-1083.

Law, R. J. & Biscaya, J.L. 1994. Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH): Problems and progress in sampling, analysis and interpretation. *Marine Pollution Bulletin*, **29**, 235-241.

Lazar, D. 1999. Chlorophyll a fluorescence induction. *Biochimica et Biophysica Acta*, **1412**, 1-28.

Lee, K., Nagler, J. J., Fournier, M., Lebeuf, M. & Cyr, D.G. 1999. Toxicological characterisation of sediments from Baie des Anglais on the St. Lawrence estuary. *Chemosphere*, **39**, 1019-1035.

Lee, P. Y. & Chen, C.Y. 2009. Toxicity and quantitative structure-activity relationships of benzoic acids to *Pseudokirchneriella subcapitata*. *Journal of Hazardous Materials*, **165**, 156-161.

Leitgib, L., Kálmán, J. & Gruiz, K. 2007. Comparison of bioassays by testing whole soil and their water extract from contaminated sites. *Chemosphere*, **66**, 428-434.

- Li, X., Shen, Z., Wai, O. & Li, Y. 2001. Chemical forms of Pb, Zn and Cu in the sediment profiles of the Pearl river estuary. *Marine Pollution Bulletin*, **42**, 215-223.
- Lib, W. & Ahlf, W. 1997. Evidence from whole-sediment, porewater, and elutriate testing in toxicity assessment of contaminated sediments. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, **36**, 140-147.
- Lin, J. G. & Chen, S.Y. 1998. The relationship between adsorption of heavy metal and organic matter in river sediments. *Environment International*, **24**, 345-352.
- Lin, J. G., Chen, S. Y. & Su, C.R. 2003. Assessment of sediment toxicity by metal speciation in different particle size fractions of river sediments. *Water Science and Technology*, **47**, 233-241.
- Loizeau, J. L., Arbouille, D., Santiago, S. & Vernet, J.P. 1994. Evaluation of a wide range laser diffraction grain size analyser for use with sediments. *Sedimentology*, **41**, 353-361.
- Long, E. R. & Chapman, P.M. 1985. A sediment quality triad: measures of sediment contamination, toxicity and infaunal community composition in Puget Sound. *Marine Pollution Bulletin*, **16**, 405-415.
- Long, E. R., Field, L. J. & MacDonald, D.D. 1998. Predicting toxicity in marine sediments with numerical sediment quality guidelines. *Environmental Toxicology and Chemistry*, **17**, 714-727.
- Lopez, L. C. S., Filizola, B., Deiss, I. & Rios, R.I. 2005. Phoretic behaviour of bromeliad annelids (Dero) and Ostracods (Elpidium) using frogs and lizards as dispersal vectors. *Hydrobiologia*, **549**, 15-22.
- Lors, C., Ponge, J. F., Martinez Aldaya, M. & Damidot, D. 2011. Comparison of solid and liquid-phase bioassays using ecoscores to assess contaminated soils. *Environmental Pollution*, **159**, 2974-2981.
- Losso, C., Novelli, A. A., de Salvador, D., Ghetti, P. F. & Ghirardini, A.V. 2010. Integration of biological responses from a suite of bioassays for the Venice Lagoon (Italy) through sediment toxicity index - Part A: Development and comparison of two methodological approaches. *Environmental Pollution*, **158**, 3655-3662.
- L'Her, J., Rochette, P. & Leroy, J. 2007. Gestion des sédiments dragués dans les ports et les voies navigables. In: *Les sédiments dans les écosystèmes coFrancetaux : biologie, écotoxicité et gestion*, Tours, France. 19-20 Novembre.

M

- MacDonald, D. D., Ingersoll, C. G. & Berger, T.A. 2000. Development and evaluation of consensus-based sediment quality guidelines for freshwater ecosystems. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, **39**, 20-31.
- Magnusson, K., Ekelund, R., Dave, G., Granmo, Å., Fjellin, L., Wennberg, L., Samuelsson, M., Berggren, M. & Brorström-Lundén, E. (1996) Contamination and correlation with toxicity of sediment samples from the Skagerrak and Kattegat. *Journal of Sea Research*, **35**, 223 - 234.
- Mallick, N. & Mohn, F.H. 2003. Use of chlorophyll fluorescence in metal-stress research: a case study with the green microalga *Scenedesmus*. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, **55**, 64-69.
- Mamindy-Pajany, Y., Hamer, B., Roméo, M., G ret, F., Galgani, F., Durmisi, E., Hurel, C. & Marmier, N. 2011. The toxicity of composted sediments from Mediterranean ports evaluated by several bioassays. *Chemosphere*, **82**, 362-369.
- Mankiewicz-Boczek, J., Nał cz-Jawecki, G., Drobniwska, A., Kaza, M., Sumorok, B., Izydorczyk, K., Zalewski, M. & Sawicki, J. 2008. Application of a microbiotests battery for complete toxicity assessment of rivers. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, **71**, 830-836.
- Margalef, R. 1953. Los Crust ceos de las Aguas Continentales Ib ricas. *Biología de las Aguas Continentales*, **10**, 1-253.
- Marie, D., Partensky, F., Jacquet, S., Vaultot, D., 1997. Enumeration and cell cycle analysis of natural populations of marine picoplankton by flow cytometry using the nucleic acid stain SYBR Green I. *Applied Environmental Microbiology*, **63**, 186-193
- Matthiessen, P., Bifield, S., Jarrett, F., Kirby, M. F., Law, R. J., McWinn, W. R., Sheahan, D. A., Thain, J. E. & Whale, G.R. 1998. An assessment of sediment toxicity in the River Tyne Estuary, U.K. by means of bioassays. *Marine Environmental Research*, **45**, 1-15.

- Mauffret, A., Moreno-Garrido, I. & Blasco, J. 2010. The use of marine benthic diatoms in a growth inhibition test with spiked whole-sediment. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, **73**, 262-269.
- Maurice PA, Manecki M, Fein JB, Schaefer J. 2004. Fractionation of an aquatic fulvic acid upon adsorption to the bacterium, *Bacillus subtilis*. *Geomicrobiol Journal* 21:1–10.
- McDonald, B. G. & Haynes, P.A. 2001. Silica sand as an artificial control sediment in a 20 day *Neanthes arenaceodentata* toxicity test. *Environmental Toxicology*, **16**, 172-176.
- Meisch, C. 2000. *Freshwater ostracoda of Western and Central Europe*. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin.
- Mezquita, F., Griffiths, H. I., Sanz, S., Soria, J. M. & Piñón, A. 1999. Ecology and distribution of Ostracods associated with flowing waters in the Eastern Iberian peninsula. *Journal of Crustacean Biology*, **19**, 344-354.
- Milani D, Reynoldson TB, Borgmann U, Kolasa J. 2003. The relative sensitivity of four benthic invertebrates to metals in spiked-sediment exposures and application to contaminated field sediment. *Environmental Toxicology and Chemistry*, **22**, 845-854
- Miller, W. E., Greene, J. C. & Shiroyama, T. 1976. *Application of algal assays to define the effects of wastewater effluent upon algal growth in multiple use river systems*. In E. J. Middelbrooks, D. H. Falkenberg & T. E. Maloney (Eds.), *Biostimulation an nutrient assessment*, pp. 77-92. Ann Arbor Science, Michigan.
- Mitra, S., Dickhut, R. M., Kuehl, S. A. & Kimbrough, K.L. 1999. Polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) source, sediment deposition patterns, and particle geochemistry as factors influencing PAH distribution coefficients in sediments of the Elizabeth River, VA, USA. *Marine Chemistry*, **66**, 113-127.

N

- Nam, S. H. & An, Y.J. 2010. Assessing the ecotoxicity of vinyl chloride using green alga *P. subcapitata*, nematode *C. elegans*, and the SOS chromotest in a closed system without headspace. *Science of The Total Environment*, **408**, 3148-3152.
- Narracci, M., Cavallo, R., Acquaviva, M., Prato, E. & Biandolino, F. 2009. A test battery approach for ecotoxicological characterization of Mar Piccolo sediments in Taranto (Ionian Sea, Southern Italy). *Environmental Monitoring and Assessment*, **148**, 307-314.
- Nendza, M. 2002. Inventory of marine biotest methods for the evaluation of dredged material and sediments. *Chemosphere*, **48**, 865-883.
- Nesterova, N. P., Den 'Ga, Y. M. & Vorob' Yev, V.A. 1982. Aromatic hydrocarbons in surface waters of the north Atlantic Ocean and Mediterranean Sea. *Oceanology*, **22**, 709-711.

O

- Okamura, H., Luo, R., Aoyama, I. & Liu, D. 1996. Ecotoxicity assessment of the aquatic environment around Lake Kojima, Japan. *Environmental Toxicology and Water Quality*, **11**, 213-221.
- Okamura, H., Piao, M., Aoyama, I., Sudo, M., Okubo, T. & Nakamura, M. 2002. Algal growth inhibition by river water pollutants in the agricultural area around Lake Biwa, Japan. *Environmental Pollution*, **117**, 411-419.
- Oleszczuk, P. 2008. Forms of polycyclic aromatic hydrocarbon in the formation of sewage sludge toxicity to *Heterocypris incongruens*. *Science of The Total Environment*, **404**, 94-102.
- Oleszczuk, P. 2008. *Heterocypris incongruens* as a tool to estimate sewage sludge toxicity. *Environmental Toxicology and Chemistry*, **27**, 864-872.
- Oliveira, M., Maria, V. L., Ahmad, I., Serafim, A., Bebianno, M. J., Pacheco, M. & Santos, M.A. 2009. Contamination assessment of a coastal lagoon (Ria de Aveiro, Portugal) using defence and damage biochemical indicators in gill of *Liza aurata* - An integrated biomarker approach. *Environmental Pollution*, **157**, 959-967.

P

- Padua, M., Cavaco, A.M., Aubert, S., Bligny R., Casimiro, A., 2010. Effects of copper on the photosynthesis of intact chloroplasts: interaction with manganese. *Physiologia Plantarum*, **138**, 301-311.
- Pandard, P., Devillers, J., Charissou, A., Poulsen, V., Jourdain, M., Féraud, J., Grand, C. & Bispo, A. 2006. Selecting a battery of bioassays for ecotoxicological characterization of wastes. *Science of The Total Environment*, **363**, 114-125.
- Pardos, M., Benninghoff, C., Thomas, R. L. & Khim-Heang, S. 1999. Confirmation of elemental sulfur toxicity in the Microtox® assay during organic extracts assessment of freshwater sediments. *Environmental Toxicology and Chemistry*, **18**, 188-193.
- Pardos, M., Benninghoff, C., Thomas, R. L. & Khim-Heang, S. 1999. Confirmation of elemental sulfur toxicity in the Microtox® assay during organic extracts assessment of freshwater sediments. *Environmental Toxicology and Chemistry*, **18**, 188-193.
- Parvez, S., Venkataraman, C. & Mukherji, S. 2006. A review on advantages of implementing luminescence inhibition test (*Vibrio fischeri*) for acute toxicity prediction of chemicals. *Environment International*, **32**, 265-268.
- Paul, A., Pflugmacher, S. & Steinberg, C.E.W. 2003. Correlation of spin concentration in humic substances with inhibitory effects on photosynthesis of aquatic macrophytes. *Akademie gemeinnütziger Wissenschaften zu Erfurt, Sitzungsberichte der Mathematischen-Naturwissenschaftlichen Klasse*, **12**, 209-221.
- Pedersen, F., Bjørnstad, E., Andersen, H. V., Kjølholt, J. & Poll, C. 1998. Characterization of sediments from Copenhagen Harbour by use of biotests. *Water Science and Technology*, **37**, 233-240.
- Pelegri, S. P. & Blackburn, T.H. 1994. Bioturbation effects of the amphipod *Corophium volutator* on microbial nitrogen transformations in marine sediments. *Marine Biology*, **121**, 253-258.

- Perego, P., Fanara, L., Zilli, M. & Del Borghi, M. 2002. Applications of luminous bacteria on environmental monitoring. *Chemical and biochemical engineering quarterly*, **16**, 87-92.
- Persoone, G., Marsalek, B., Blinova, I., Törökne, A., Zarina, D., Manusadzianas, L., Nalecz-Jawecki, G., Tofan, L., Stepanova, N., Tothova, L. & Kolar, B. 2003. A practical and user-friendly toxicity classification system with microbiotests for natural waters and wastewaters. *Environmental Toxicology*, **18**, 395-402.
- Persoone G., Janssen C., De Coen W., 2000, New Microbiotests for Routine Toxicity Screening and Biomonitoring, Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York.
- Pflugmacher, S., Pietsch, C., Rieger, W. & Steinberg, C.W.E. 2006. Dissolved natural organic matter (NOM) impacts photosynthetic oxygen production and electron transport in coontail *Ceratophyllum demersum*. *Science of the Total Environment*, **357**, 169-175.
- Piccolo, A. 2001. The supramolecular structure of humic substances. *Soil Science*, **166**, 810-832.
- Piletskaya, E. V., Piletsky, S. A., Sergeyeva, T. A., El'skaya, A. V., Sozinov, A. A., Marty, J. L. & Rouillon, R. 1999. Thylakoid membranes-based test-system for detecting of trace quantities of the photosynthesis-inhibiting herbicides in drinking water. *Analytica Chimica Acta*, **39**, 1-7.
- Piva, F., Ciaprini, F., Onorati, F., Benedetti, M., Fattorini, D., Ausili, A. & Regoli, F. 2011. Assessing sediment hazard through a weight of evidence approach with bioindicator organisms: A practical model to elaborate data from sediment chemistry, bioavailability, biomarkers and ecotoxicological bioassays. *Chemosphere*, **83**, 475-485.
- Postma, J. F., de Valk, S., Dubbeldam, M., Maas, J. L., Tonkes, M., Schipper, C. A. & Kater, B.J. 2002. Confounding factors in bioassays with freshwater and marine organisms. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, **53**, 226-237.
- Power, E. A. & Chapman, P.M. 1992. *Assessing sediment quality*. In G. A. J. Burton (Ed.), *Sediment Toxicity Assessment*, pp. 1-18. Lewis, Chelsea, MI, USA.
- Pádua, M., Cavaco, A. M., Aubert, S., Bligny, R. & Casimiro, A. 2010. Effects of copper on the photosynthesis of intact chloroplasts: interaction with manganese. *Physiologia Plantarum*, **138**, 301-311.

Pérez, L., Lorenschat, J., Brenner, M., Scharf, B. & Schwalb, A. 2010. Extant freshwater ostracodes (Crustacea: Ostracoda) from Lago Petén Itzá, Guatemala. *Revista de Biología Tropical*, **58**, 871-895.

Q

Quentel, M, Filella, M (2011). A simple method for quantifying the humic content of commercial products. *Analytical and Bioanalytical chemistry* , **401**: 10, 3235-3238

Quintino, V., Picado, A. M., Rodrigues, A. M., Mendonça, E., Costa, M. H., Costa, M. B., Lindgaard-Jorgensen, P. & Pearson, T.H. 1995. Sediment chemistry - Infaunal community structure in a southern European estuary related to solid-phase Microtox toxicity testing. *Aquatic Ecology*, **29**, 427-436.

R

Rand, G.M. and S.R. Petrocelli. (1985). Fundamentals of aquatic toxicology. Hemisphere Publishing Corporation, Washington, 666 p

Ragnarsdottir, K. V. 2000. Environmental fate and toxicology of organophosphate pesticides. *Journal of the Geological Society*, **157**, 859-876.

Ralph, P., Wilhelm, C., Lavaud, J., Jakob, T., Petrou, K. & Kranz, S. 2010. *Fluorescence as a tool to understand changes in photosynthetic electron flow regulation, Chlorophyll a Fluorescence* . In D. J. Suggett, O. Prá il & M. A. Borowitzka (Eds.), *Aquatic sciences: Methods and applications* , pp. 75-89. Dordrecht : Springer Science+ Business Media B.V, .

Regel, R. H., Ferris, J. M., Ganf, G. G. & Brookes, J.D. 2002. Algal esterase activity as a biomeasure of environmental degradation in a freshwater creek. *Aquatic Toxicology*, **59**, 209-223.

Renganathan, M. & Bose, S. 1990. Inhibition of photosystem II activity by Cu⁺⁺ ion. Choice of buffer and reagent is critical. *Photosynthesis Research*, **23**, 95-99.

- Ribecco, C., Baker, M. E., Šášík, R., Zuo, Y., Hardiman, G. & Carnevali, O. 2011. Biological effects of marine contaminated sediments on *Sparus aurata* juveniles. *Aquatic Toxicology*, **104**, 308-316.
- Rigaud, S. 2011. *Dynamique et biodisponibilité des éléments traces métalliques dans les sédiments de l'étang de berr France*. Phd thesis, Université Paul Cezanne, Aix Marseille III, France.
- Rigol, A., Latorre, A., Lacorte, S. & Barceló, D. 2004. Bioluminescence inhibition assays for toxicity screening of wood extractives and biocides in paper mill process waters. *Environmental Toxicology and Chemistry*, **23**, 339-347.
- Ringwood, A. H., DeLorenzo, M. E., Ross, P. E. & Holland, A.F. 1997. Interpretation of Microtox® solid-phase toxicity tests: The effects of sediment composition. *Environmental Toxicology and Chemistry*, **16**, 1135-1140.
- Rioboo, C., O'Connor, J. E., Prado, R., Herrero, C. & Cid, Á. 2009. Cell proliferation alterations in *Chlorella* cells under stress conditions. *Aquatic Toxicology*, **94**, 229-237.
- Rochaix, J. D. 2011. Reprint of: Regulation of photosynthetic electron transport. *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics*, **1807**, 878-886.
- Roghair, C., Struijs, J. & De Zwart, D. 1997. *Measurement of toxic potency in fresh waters in the Netherlands; Part A: Methods*. National Institute of Public Health & the Environment, The Netherlands. RIVM-Report nr. 607504 004. p.
- Roman YE, De Schampelaere KAC, Nguyen LTH, Janssen CR (2007) Chronic toxicity of copper to five benthic invertebrates in laboratory-formulated sediment: Sensitivity comparison and preliminary risk assessment. *Science Total of Environment*, **387**, 128-140.
- Rojíčková-Padrťová, R., Blahoslav, M. & Holoubek, I. 1998. Evaluation of alternative and standard toxicity assays for screening of environmental samples: Selection of an optimal test battery. *Chemosphere*, **37**, 495-507.
- Rossi, V., Benassi, G., Belletti, F. & Menozzi, P. 2011. Colonization, population dynamics, predatory behaviour and cannibalism in *Heterocypris incongruens* (Crustacea: Ostracoda). *Journal of Limnology*, **70**, 102-108.
- Rouillon, R., Sole, M., Carpentier, R. & Marty, J. 1995. Immobilization of thylakoids in polyvinylalcohol for the detection of herbicides. *Sensors and Actuators B: Chemical*, **27**, 477-479.

Ruiz, F., Abad, M., Bodergat, A. M., Carbonel, P., Rodriguez-Lázaro, J. & Yasuhara, M. 2005. Marine and brackish-water ostracods as sentinels of anthropogenic impacts. *Earth-Science Reviews*, **72**, 89-111.

Ruiz, F., Borrego, J., González-Regalado, M. L., González, N. L., Carro, B. & Abad, M. 2008. Impact of millennial mining activities on sediments and microfauna of the Tinto River estuary (SW Spain). *Marine Pollution Bulletin*, **56**, 1258-1264.

S

Salizzato, M., Pavoni, B., Ghirardini, A. V. & Ghetti, P. 1998. Sediment toxicity measured using *Vibrio fischeri* as related to the concentrations of organic (PCBs, PAHs) and inorganic (metals, sulphur) pollutants. *Chemosphere*, **36**, 2949-2968.

Santiago, S., Thomas, R., Larbaigt, G., Rossel, D., Echeverria, M., Tarradellas, J., Loizeau, J., McCarthy, L., Mayfield, C. & Corvi, C. 1993. Comparative ecotoxicity of suspended sediment in the lower Rhone River using algal fractionation, Microtox® and *Daphnia magna* bioassays. *Hydrobiologia*, **252**, 231-244.

Sbrilli, G. & Batistini, F. 2011. Use of solid-phase algal growth inhibition test with turbidity correction procedure for the toxicological characterization of a contaminated area. *Italian Journal of Occupational and Environmental Hygiene*, **2**, 85-91.

Schecher, W. D. & Driscoll, C.T. 1985. Interactions of copper and lead with *Nostoc muscorum*. *Water, Air, & Soil Pollution*, **24**, 85-101.

Schallenberg, M. & Burns, C.W. 2004. Effects of sediment resuspension on phytoplankton production: teasing apart the influences of light, nutrients and algal entrainment. *Freshwater Biology*, **49, 143-159.**

Schiewe, M. H., Hawk, E. G., Actor, D. I. & Krahn, M.M. 1985. The use Of bacterial bioluminescence assay to assess toxicity of contaminated marine sediments,. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, **42**, 1244-1248.

- Schnabl, H., Helfrich, P. & Trapman, S. 1998. *Plant thylakoid membranes and protoplast as biological units for detection of phytotoxic compounds in water, air, soil and compost*. In G. Persoone, C. Janssen & W. De Coen (Eds.), *New microbiotest for routine toxicity screening and biomonitoring*, pp. 177-190. Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York.
- Schneider, G. 2001. Le curage des sédiments des cours d'eau. *Le courrier de l'environnement de l'INRA*, **43**, 146-147.
- Schorer, M. 1997. Pollutant and organic matter content in sediment particle size fractions. *Freshwater Contamination*, **243**, 59-67.
- Serafim, A., Company, R., Lopes, B., Fonseca, V. F., FranÃ§a, S., Vasconcelos, R. P., Bebianno, M. J. & Cabral, H.N. 2012. Application of an integrated biomarker response index (IBR) to assess temporal variation of environmental quality in two Portuguese aquatic systems. *Ecological Indicators*, **19**, 215-225.
- Shanmukhappa, H. & Neelakantan, K. 1990. Influence of humic acid on the toxicity of copper, cadmium and lead to the unicellular alga *Synechosystis Aquatilis*. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, **44**, 840-843.
- Shin, P. K. S. & Lam, W.K.C. 2001. Development of a marine sediment pollution index. *Environmental Pollution*, **113**, 281-291.
- Shuhaimi-Othman, M., Yakub, N., Ramle, N. & Abas, A. 2011. Toxicity of metals to a freshwater Ostracod: *Stenocypris major*. *Journal of Toxicology*, **2011**, 4-8.
- Simpson, S. L., Micevska, T., Adams, M. S., Stone, A. & Maher, W.A. 2007. Establishing cause-effect relationships in hydrocarbon-contaminated sediments using a sublethal response of the benthic marine alga, *Entomoneis CF Punctulata*. *Environmental Toxicology and Chemistry*, **26**, 163-170.
- Stauber, J., Franklin, N. & Adams, M. 2005. *Microalgal Toxicity Test Using Flow Cytometry*. In C. Blaise & J. F. Férard (Eds.), *Small-scale freshwater toxicity investigations*, pp. 203-240. Springer, Dordrecht.
- Swartz, R. C., Schults, D. W., Ditsworth, G. R. & DeBen, W.A. 1984. Toxicity of sewage sludge to *Rhepoxynius abronius*, a marine benthic amphipod. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, **13**, 207-216.

Sánchez-Bayo, F. & Goka, K. 2006. Influence of light in acute toxicity bioassays of imidacloprid and zinc pyriithione to zooplankton crustaceans. *Aquatic Toxicology*, **78**, 262-271.

Sönmez-Gökçen, N. 1964. Notice sur le nouvel âge déterminé par les Ostracodes de la série à Congeria du Néogène des environs de Çatalca (Thrace). *Bulletin of the Mineral Research and Exploration*, **63**, 47-59.

T

Tay, K. L., Doe, K. G., MacDonald, A. J. & Lee, K. 1998. *The influence of particle size, ammonia, and sulfide on toxicity of dredged materials for ocean disposal*. In P. G. Wells, K. Lee & C. Blaise (Eds.), *Microscale testing in aquatic toxicology - Advances, techniques, and practice*, pp. 559-574. CRC Press, New York.

Tay, K. L., Doe, K. G., Wade, S. J., Vaughan, D. A., Berrigan, R. E. & Moore, M.J. 1992. Sediment bioassessment in Halifax Harbour. *Environmental Toxicology and Chemistry*, **11**, 1567-1581.

Thompson, P. A. & Couture, P. 1991. Short- and long-term changes in growth and biochemical composition of *Selenastrum capricornutum* populations exposed to cadmium. *Aquatic Toxicology*, **21**, 135-144.

Trapmann, S., Etxebarria, N., Schnabl, H. & Grobecker, K. 1998. Progress in herbicide determination with the thylakoid bioassay. *Environmental Science and Pollution Research*, **5**, 17-20.

Traunspurger, W. & Drews, C. 1996. Toxicity analysis of freshwater and marine sediments with meio- and macrobenthic organisms: A review. *Hydrobiologia*, **328**, 215-261.

Troussellier, M., Courties, C., Vaquer, A., 1993. Recent applications of flow cytometry in aquatic microbial ecology. *Biology Cellular*, **78**, 111-121.

Tuikka, A. I., Schmitt, C., Hoess, S., Bandow, N., von der Ohe, P. C., de Zwart, D., de Deckere, E., Streck, G., Mothes, S., van Hattum, B., Kocan, A., Brix, R., Brack, W., Barcelo, D., Sormunen, A. J., Kukkonen, J. V. K. 2011. Toxicity assessment of sediments from three European river basins using a sediment contact test battery. *Ecotoxicology Environmental and Safety*, **74**, 123-131.

U

- Urbanczyk, H., Ast, J. C., Higgins, M. J., Carson, J. & Dunlap, P.V. 2007. Reclassification of *Vibrio fischeri*, *Vibrio logei*, *Vibrio salmonicida* and *Vibrio wodanis* as *Aliivibrio fischeri* gen. nov., comb. nov., *Aliivibrio logei* comb. nov., *Aliivibrio salmonicida* comb. nov. and *Aliivibrio wodanis* comb. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, **57**, 2823-2829.
- Usero, J., Morillo, J. & Bakouri, H.E. 2008. A general integrated ecotoxicological method for marine sediment quality assessment: Application to sediments from littoral ecosystems on Southern Spain's Atlantic coast. *Marine Pollution Bulletin*, **56**, 2027-2036.
- van Beelen, P. 2003. A review on the application of microbial toxicity tests for deriving sediment quality guidelines. *Chemosphere*, **53**, 795-808.
- Van Rensen, J. J. S. 1982. Molecular mechanisms of herbicide action near photosystem II. *Physiologia Plantarum*, **54**, 515-521.
- Vasseur, P. & Féraud, J.F. 1993. Evaluation de la toxicité des effluents industriels. In: *Carrefour scientifique et technique "H2O 1991"*
- Vasseur, P., Féraud, J. F., Rast, C. & Larbaigt, G. 1984. *Luminescent marine bacteria in acute toxicity testing*. In G. Persoone, E. Jaspers & C. Claus (Eds.), *Ecotoxicological testing for the marine environment*, pp. 381-386. Institute for Marine Scientific Research
- Veli, S., Alyüz, B., 2007. Adsorption of copper and zinc from aqueous solutions by using natural clay. *Journal of Hazardous Materials*, **149**, 226-233.
- Viguri, J. R., Irabien, M. J., Yusta, I., Soto, J., Gómez, J., Rodríguez, P., Martínez-Madrid, M., Irabien, J. & Coz, A. 2007. Physico-chemical and toxicological characterization of the historic estuarine sediments: A multidisciplinary approach. *Environment International*, **33**, 436-444.

W

- Wadhia, K. & Thompson, C.K. 2007. Low-cost ecotoxicity testing of environmental samples using microbiotests for potential implementation of the water framework directive. *Trends in Analytical Chemistry*, **26**, 300-307.
- Walsh, G. E., Bahner, L. H. & Horning, W.B. 1980. Toxicity of textile mill effluents to freshwater and estuarine algae, crustaceans and fishes. *Environmental Pollution Series A, Ecological and Biological*, **21**, 169-179.
- Wang, F. & Chapman, P.M. 1999. Biological implications of sulfide in sediment - A review focusing on sediment toxicity. *Environmental Toxicology and Chemistry*, **18**, 2526-2532.
- Watanabe, H., Nakajima, F., Kasuga, I. & Furumai, H. 2011. Toxicity evaluation of road dust in the runoff process using a benthic ostracod *Heterocypris incongruens*. *Science of The Total Environment*, **409**, 2366-2372.
- White, A. J. & Critchley, C. 1999. Rapid light curves: a new fluorescence method to assess the state of the photosynthetic apparatus. *Photosynthesis Research*, **59**, 63-72.
- Wildhaber, M. L. & Schmitt, C.J. 1996. Estimating aquatic toxicity as determined through laboratory tests of great lakes sediments containing complex mixtures of environmental contaminants. *Environmental Monitoring and Assessment*, **41**, 255-289.

Y

- Yavuz, Ö., Altunkaynak, Y. & Güzel, F. 2003. Removal of copper, nickel, cobalt and manganese from aqueous solution by kaolinite. *Water Research*, **37**, 948-952.

Yin, Y., Li, W., Yang, X., Wang, S., Li, S. & Xia, W. 2001. Morphological responses of *Limnocythere inopinata* (Ostracoda) to hydrochemical environment factors. *Science in China Series D: Earth Sciences*, **44**, 316-323.

Yi, Y., Wang, Z., Zhang, K., YU, G, Duan, X. 2008. Sediment pollution and its effect on fish through food chain in the Yangtze river. *Int. J. Sediment Research*, **23**, 338-347.

Z

Zabetoglou, K., Voutsas, D. & Samara, C. 2002. Toxicity and heavy metal contamination of surficial sediments from the Bay of Thessaloniki (Northwestern Aegean Sea) Greece. *Chemosphere*, **49**, 17-26.

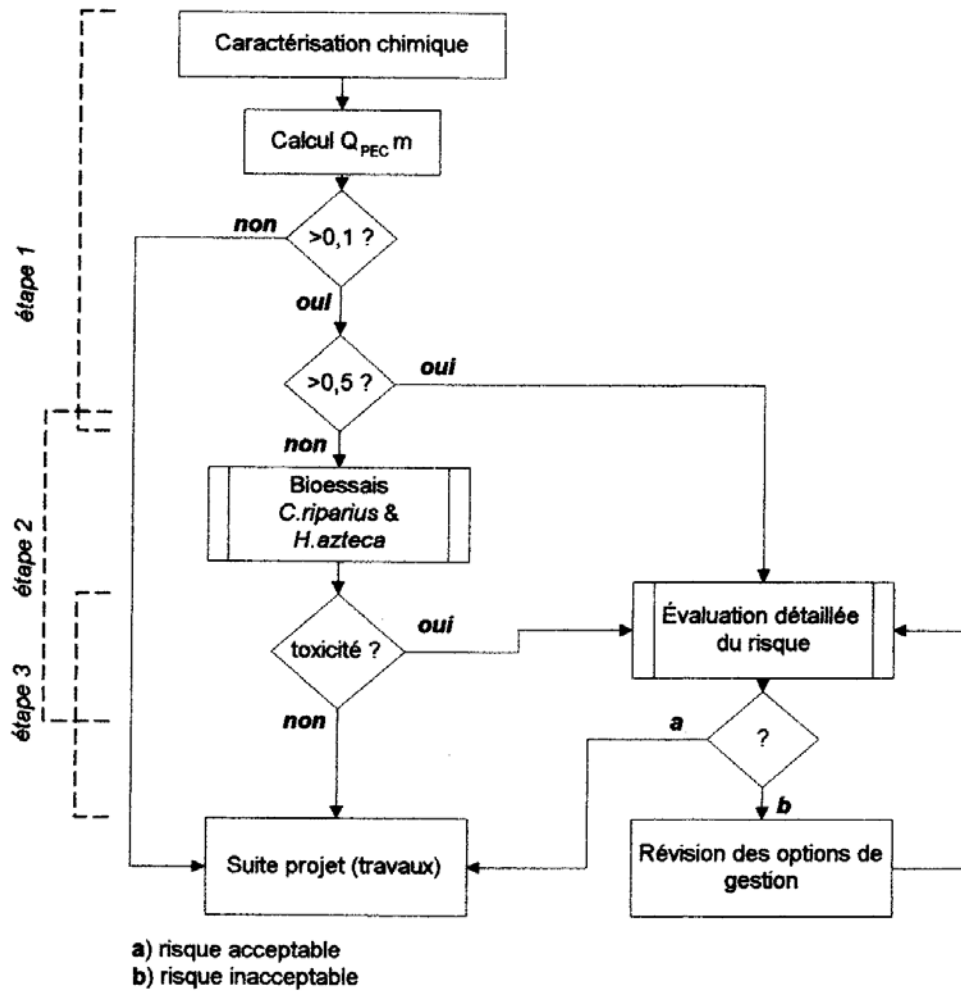
Zenina, M. 2009. Influence of anthropogenic pollution on ostracod assemblages of Amurskii Bay, Sea of Japan. *Russian Journal of Marine Biology*, **35**, 305-312.

Annexes

Liste des annexes

Annexe 1: Schéma de démarche d'évaluation des risques.....	256
Annexe 2: Seuils de qualité proposés par MacDonald et al. (2000).....	257
Annexe 3: Paramètres physico-chimiques des sédiments de la 1ère campagne.....	258
Annexe 4: Paramètres physico-chimiques des sédiments de la 2ème campagne.....	259
Annexe 5: Paramètres physico-chimiques pour les sédiments de la 3ème campagne	260
Annexe 6: Paramètres physico-chimiques mesurés pour les sédiments du JURA	261
Annexe 7: Caractéristiques physico-chimiques relatives au site de référence situé à La Maxe (Moselle), (Cossu-Leguille, communication personnelle).....	262
Annexe 8: Certification du sédiment SUD-1	263
Annexe 9: Corrélations entre les pentes des courbes inhibitions de croissance et les paramètres physico-chimiques.	265
Annexe 10: Résultats de tous les paramètres mesurés	266
Annexe 11 : Précisions sur les tests comportementaux des ostracodes.....	267

**Annexe 1: Schéma de démarche d'évaluation des risques.
D'après Babut et al. (2002)**



Annexe 2: Seuils de qualité proposés par MacDonald et al. (2000)

Substance	Consensus PEC (MacDonald et al. (2000))
Métaux (mg/kg)	
Arsenique	33
Cadmium	4.98
Chrome	111
Cuivre	149
Plomb	128
Mercure	1.06
Nickel	48.6
Zinc	459
Hydrocarbures aromatiques polycycliques (µg/kg)	
Anthracène	845
Fluorène	536
Naphthalène	561
Phenanthrène	1,170
Benz[a]anthracène	1,050
Benzo(a)pyrène	1,450
Chrysène	1,290
Fluoranthène	2,230
Pyrène	1,520
HAP totaux	22,800
Polychlorobiphényles (µg/kg)	
PCB totaux	676

Annexe 3: Paramètres physico-chimiques des sédiments de la 1ère campagne

Paramètres	Sédiments 1 ^{ère} campagne					
	BB	LCB	PG2	CMA	CMC	
Matière organique (%)	2.1	14.9	12.9	7.6	5.9	
C/N	34.42	68.16	79.92	44.02	26.54	
Humidité (%)	27.9	67.6	67.8	63.0	52.3	
Texture	Argiles (%)	0.21	0.14	0.11	0.15	1.27
	Limons (%)	8.92	46.32	70.27	51.04	73.90
	Sables (%)	90.87	53.54	29.62	48.81	24.82
CaCO ₃ %	21.5	41.2	49.0	29.3	27.0	
pH	7.72	8.19	7.79	7.56	7.55	
AVS (µmol/g dw)	0.15	8.5	4.3	33.0	14.1	
P (mg/g)	0.29	1.06	0.79	1.18	0.84	
N (%)	0.04	0.34	0.30	0.26	0.16	
Métaux totaux						
Cr (mg/kg)	12.3	41.7	29.9	48.8	52.2	
Fe (mg/kg)	4755	14367	12889	17177	20567	
Co (mg/kg)	1.76	5.50	3.87	6.57	7.47	
Ni (mg/kg)	5.6	23.0	17.9	30.9	34.8	
Cu (mg/kg)	2.6	15.8	15.7	38.8	21.5	
Zn (mg/kg)	15.8	93.5	69.5	141.4	87.8	
As (mg/kg)	2	8.6	5.4	5.5	7.6	
Cd (mg/kg)	0.07	0.70	0.31	0.39	0.33	
Pb (mg/kg)	5.7	16.1	16.7	21.5	20.9	
Mn(mg/kg)	244	244	270	330	488	
Hg (mg/kg)	< LQ	0.05	0.07	0.09	0.07	
Polluants organiques						
PCB totaux (µg/kg)	< 5	< 5	< 5	< 5	< 5	
Anthracène (µg/kg)	< 20	66	53	71	< 20	
Acénaphthène (µg/kg)	< 20	< 20	< 20	< 20	< 20	
Acénaphthylène (µg/kg)	< 20	< 20	< 20	< 20	< 20	
Benzo (a) pyrène (µg/kg)	23	474	638	446	40	
Benzo (a) anthracène (µg/kg)	24	280	333	363	42	
Benzo (b) fluoranthène (µg/kg)	22	254	300	339	54	
Benzo (k) fluoranthène (µg/kg)	12	188	136	206	22	
Benzo (ghi) perylène (µg/kg)	16	203	211	234	38	
Chrysène (µg/kg)	< 50	293	291	318	< 50	
Dibenzo (a,h) anthracène (µg/kg)	< 20	< 20	< 20	< 20	< 20	
Fluoranthène (µg/kg)	66	639	754	844	106	
Fluorène (µg/kg)	< 40	< 40	43	< 40	< 40	
Indéno (1,2,3-cd) pyrène (µg/kg)	14	113	164	172	24	
Methyl 2 fluoranthène (µg/kg)	<50	79	90	127	< 50	
Methyl 2 naphthalène (µg/kg)	< 50	65	< 50	130	< 50	
Naphthalène (µg/kg)	< 25	31	< 25	< 25	< 25	
Phénanthrène (µg/kg)	< LQ	176	220	176	55	
Pyrène (µg/kg)	42	441	528	615	76	
HAP totaux (16 HAP prioritaires définies par l'US EPA)	219	3158	3671	3784	457	

Annexe 4: Paramètres physico-chimiques des sédiments de la 2ème campagne

Paramètres	Sédiments 2ème campagne						
	PG3	IBA	MOR	MAR	VID	CAJ	
Matière organique (%)	9.05	8.0	8.7	8.0	15.7	8.8	
C/N	37.11	23.36	23.51	30.60	15.57	29.41	
Humidité (%)	67	58	59	61	77	60	
Texture	Argiles (%)	19.20	2.95	0.97	3.44	0.75	0.61
	Limons (%)	62.79	55.93	67.28	87.03	71.20	58.11
	Sables (%)	18.01	41.12	31.75	9.53	28.05	41.27
CaCO ₃ %	53.7	18.3	<1	32.0	15.9	<1	
pH	7.53	7.13	7.03	7.22	7.21	7.11	
AVS (µmol/g dw)	7.6	3.5	12.2	4.3	116.0	6.1	
P (mg/g)	0.75	1.29	1.44	0.96	5.93	0.70	
N (%)	0.34	0.31	0.33	0.25	0.81	0.23	
Métaux totaux							
Cr (mg/kg)	31.4	49.9	54.7	54.8	93.4	42.9	
Fe (mg/kg)	13140	24346	31171	23380	34849	28146	
Co (mg/kg)	4.34	8.85	11.8	8.24	9.45	11.2	
Ni (mg/kg)	16.8	24.0	23.9	32.9	50.3	23.4	
Cu (mg/kg)	13.6	36.9	97.0	30.9	217	25.6	
Zn (mg/kg)	61.4	160	429	109	477	572	
As (mg/kg)	6.36	16.6	37.2	8.4	11.8	41.9	
Cd (mg/kg)	0.330	0.53	2.16	0.21	1.38	11.23	
Pb (mg/kg)	17.5	37.4	86.9	24.6	91.2	78.0	
Mn(mg/kg)	198	689	461	460	387	721	
Hg (mg/kg)	0.05	0.17	0.19	0.19	1.02	0.44	
Polluants organiques							
PCB totaux (µg/kg)	< 5	< 5	68	< 5	222	7	
Anthracène (µg/kg)	21	37	66	<20	75	187	
Acénaphthène (µg/kg)	<20	<20	24	<20	45	97	
Acénaphthylène (µg/kg)	<20	<20	<20	<20	<20	<20	
Benzo (a) pyrène (µg/kg)	251	234	384	74	125	316	
Benzo (a) anthracène (µg/kg)	291	237	338	53	347	54	
Benzo (b) fluoranthène (µg/kg)	207	239	344	90	377	92	
Benzo (k) fluoranthène (µg/kg)	582	109	161	37	284	139	
Benzo (ghi) perylène (µg/kg)	203	231	293	82	253	214	
Chrysène (µg/kg)	294	231	338	<50	393	379	
Dibenzo (a,h) anthracène (µg/kg)	29	<20	40	<20	<20	<20	
Fluoranthène (µg/kg)	686	719	974	186	1315	189	
Fluorène (µg/kg)	<40	<40	<40	<40	119	121	
Indéno (1,2,3-cd) pyrène (µg/kg)	78	241	340	93	212	187	
Methyl 2 fluoranthène (µg/kg)	<50	<50	<50	<50	<50	<50	
Methyl 2 naphthalène (µg/kg)	<50	<50	<50	<50	97	199	
Naphtalène (µg/kg)	<25	<25	<25	<25	<25	294	
Phénanthrène (µg/kg)	<50	295	343	72	326	450	
Pyrène (µg/kg)	343	412	547	98	720	100	
HAP totaux (16 HAP prioritaires définies par l'US EPA)	2985	2985	4192	785	4591	2819	

Annexe 5: Paramètres physico-chimiques pour les sédiments de la 3ème campagne

Paramètres	Sédiments 3ème campagne						
	PG5	AMO	BIO	BIE	NEY	LGB	
Matiere organique (%)	8.3	3.9	5	9.8	<3	10.6	
C/N	41.80	58.53	41.86	50.52	35	33.73	
Humidité (%)	68	33	53	65	30	71	
Texture	Argiles (%)	3.33	2.26	0.49	4.18	0.04	3.01
	Limons (%)	88.55	32.59	18.02	77.74	6.18	71.92
	Sables (%)	8.12	65.15	81.49	18.07	93.78	25.07
CaCO ₃ %	54.7	11.4	29.9	59.1	80.3	43.9	
pH		7.86	7.24	7.58			
AVS (µmol/g dw)	5.7	1.1	10.2	1.48	1.48	5	
Métaux totaux							
Cr (mg/kg)	30.6	30.5	19.6	25.5	5.0	45.4	
Fe (mg/kg)	12217	21135	6080	10382	2489	15733	
Co (mg/kg)	4.30	8.84	4.59	3.50	0.92	5.21	
Ni (mg/kg)	16.5	20.6	8.6	17.8	1.7	20.4	
Cu (mg/kg)	14.7	33.0	27.0	34.2	1.2	14.3	
Zn (mg/kg)	63.5	483	105	93.4	7.6	112	
As (mg/kg)	5.7	314	2.3	6.8	2.0	9.8	
Cd (mg/kg)	0.33	2.24	0.27	0.43	0.15	0.78	
Pb (mg/kg)	17.9	1597	23.0	24.9	3.5	53.1	
Mn(mg/kg)	184	374	143	170	95	117	
Hg (mg/kg)	0.09	0.44	0.47	0.15	<LQ	0.09	
Polluants organiques							
PCB totaux (µg/kg)	< 5	< 5	< 5	< 5	< 5	< 5	
Anthracène (µg/kg)	73	42	24	21	<20	33	
Acénaphthène (µg/kg)	<20	<20	<20	<20	<20	<20	
Acénaphthylène (µg/kg)	<20	<20	<20	<20	<20	<20	
Benzo (a) pyrène (µg/kg)	330	204	67	95	<10	156	
Benzo (a) anthracène (µg/kg)	219	165	67	74	<10	133	
Benzo (b) fluoranthène (µg/kg)	350	247	87	104	<10	192	
Benzo (k) fluoranthène (µg/kg)	204	137	39	49	<10	102	
Benzo (ghi) perylène (µg/kg)	115	81	28	37	<10	65	
Chrysène (µg/kg)	313	134	114	125	<50	85	
Dibenzo (a,h) anthracène (µg/kg)	68	54	<20	<20	<20	46	
Fluoranthène (µg/kg)	834	519	190	235	<40	377	
Fluorène (µg/kg)	<40	<40	<40	<40	<40	<40	
Indéno (1,2,3-cd) pyrène (µg/kg)	321	218	70	96	<10	206	
Methyl 2 fluoranthène (µg/kg)	<50	<50	<50	<50	<50	<50	
Methyl 2 naphtalène (µg/kg)	<50	<50	<50	<50	<50	<50	
Naphtalène (µg/kg)	<25	<25	<25	<25	<25	<25	
Phénanthrène (µg/kg)	315	274	102	107	<50	109	
Pyrène (µg/kg)	771	211	92	191	<40	418	
HAP totaux (16 HAP prioritaires définies par l'US EPA)	3913	2286	880	1134	0	1922	

Annexe 6: Paramètres physico-chimiques mesurés pour les sédiments du JURA

Paramètres	ETA	LAV	SIR	CHAM	
Humidité (%)	31.5	27.9	30.35	24.8	
COT	26.9	8.6	12.9	20.2	
CaCO3 (%)	60	77	62	75	
Texture	Argiles (%)	2.2	1.9	1.7	0.3
	Limons (%)	19.7	13.9	16.2	1.9
	Sables (%)	77.9	84.2	82.2	97.9
P (mg/g)	0.43	0.34	0.42	0.30	
N (%)	0.12	0.02	0.05	0.06	
Métaux Totaux					
Al (g/Kg)	4.39	2.08	3.72	2.5	
Cd (mg/Kg)	0.3	0.2	0.2	0.2	
Cr (mg/Kg)	32.8	14.9	21.3	12.8	
Co (mg/Kg)	3.4	2.3	3.4	2.5	
Cu (mg/Kg)	32.2	24	4.1	45.3	
Fe (g/Kg)	7	3.87	9.86	4.85	
Mn (mg/Kg)	180.8	133.3	284.1	150.2	
Hg (mg/Kg)	0.03	0.02	0.02	0.02	
Hg sec (mg/Kg)	0.04	0.03	0.02	0.02	
Ni (mg/Kg)	16.9	10.8	9.4	6.5	
Pb (mg/Kg)	23.9	32	9.1	11.5	
Zn (mg/Kg)	78.2	52.4	26.9	85.7	
As (mg/Kg)	5.9	4.9	10.6	4.6	
Polluants organiques					
PCB28 (ug/Kg)	5	5	5	5	
PCB52 (ug/Kg)	5	5	5	5	
PCB101 (ug/Kg)	5	5	5	5	
PCB118 (ug/Kg)	5	5	5	5	
PCB180 (ug/Kg)	5	5	5	5	
Anthracène (µg/kg)	31	20	20	20	
Benzo (a) pyrène (µg/kg)	286	535	23	62	
Benzo (a) anthracène (µg/kg)	233	649	20	46	
Benzo (k) fluoranthène (µg/kg)	121	206	12	28	
Benzo (ghi) perylène (µg/kg)	133	43	10	47	
Chrysène (µg/kg)	166	483	50	50	
Fluoranthène (µg/kg)	545	1919	46	127	
Indéno(1,2,3-cd)pyrène	118	395	21	29	
Naphtalène (µg/kg)	25	25	25	25	
Phénanthrène (µg/kg)	180	50	50	50	

**Annexe 7: Caractéristiques physico-chimiques relatives au site de référence
situé à La Maxe (Moselle), (Cossu-Leguille, communication personnelle)**

<i>Contaminants</i>	<i>concentration</i> <i>n</i>
Métaux (mg/kg d. w.)	
Cadmium	<0,01
Chrome	12
Cuivre	5
Nickel	7
Plomb	6
Zinc	19
Etain	<0,1
Hydrocarbures Aromatiques Polycycliques (µg/kg d. w.)	
Fluoranthène	10
Benzo(b)fluoranthène	4
Benzo(k)fluoranthène	<3
Benzo(a)pyrène	3
Benzo(ghi)pérylène	<10
Indéno(1,2,3-cd)pyrène	13
Polychlorobiphényles (µg/kg d. w.)	
PCB 28	<5
PCB 52	9
PCB 101	<5
PCB 118	<5
PCB 138	<5
PCB 153	<5
PCB 180	<5
Composés organochlorés (µg/kg d. w.)	
Hexachlorobutadiène	<5
Hexachlorobenzène	<5
Aldrine	<5
Dieldrine	<5
<i>o,p</i> -DDD	<5
<i>p,p'</i> -DDD	<5
<i>o,p</i> -DDE	<5
<i>o,p</i> -DDT	<5
<i>p,p</i> -DDT	<5
Chlorobenzènes (µg/kg d. w.)	
1,2-dichlorobenzène	<5
1,3-dichlorobenzène	<5
1,4-dichlorobenzène	<5
1,2,3-trichlorobenzène	<5
1,2,4-trichlorobenzène	<5
1,2,5-trichlorobenzène	<5

Annexe 8: Certification du sédiment SUD-1



Certificate of Analysis

SUD-1

A Sudbury Sediment for Trace Elements

SUD-1 was collected in 1980 from Lake Ramsey in Sudbury, Ontario. This area is well-known for its mining industry which is reflected in the elevated cobalt, copper and nickel levels in this reference sediment. In addition, *SUD-1* has the lowest mercury and lead levels among the NWRI reference sediments for trace metals. The certified reference values below were generated using a multi-laboratory, multi-methodology approach: several independent methodologies including atomic absorption spectrometry, neutron activation analysis and inductively coupled plasma (both optical emission spectroscopy and mass spectrometry) produced data with better than 95% agreement between method means. While the reference values for the uncertified elements below are also considered to be quite reliable, they have either not met our certification criteria of at least two independent methodologies or there are, as yet, insufficient data for certification. In addition to providing certified reference values for total elemental concentrations, this Certificate provides information values for recoverable and leachable metal concentrations that have been generated following the less rigorous extraction procedures described on page 3.

Total Concentrations of Major, Minor and Trace Elements (ug/g)

<i>Certified Elements</i>					
Aluminum	58049	±	24136	Lead	56.3 ± 24.1
Chromium	81.2	±	47.7	Manganese	578 ± 93
Cobalt	44.2	±	11.1	Nickel	936 ± 207
Copper	561	±	136	Vanadium	67.8 ± 31.9
Iron	32688	±	7816	Zinc	768 ± 158

The uncertainties for the certified elements represent the 95% tolerance limits. Thus, the analysis of any one sub-sample should yield results within the certified range, 95% of the time.

<i>Non-Certified Elements</i>					
Antimony	0.727	±	0.104	Molybdenum	1.92 ± 2.00
Arsenic	31.1	±	5.0	Niobium	6.68 ± 0.33
Barium	488	±	96	Phosphorus	686 ± 41
Beryllium	1.30	±	0.12	Potassium	19718 ± 437
Bismuth	1.840	±	0.160	Rubidium	77.1 ± 4.3
Boron	42.3	±	3.3	Scandium	11.0 ± 1.3
Cadmium	1.88	±	0.74	Selenium	2.75 ± 0.74
Calcium	11636	±	672	Sodium	15798 ± 674
Cerium	51.8	±	1.6	Strontium	202 ± 13
Cesium	2.03	±	0.07	Thallium	0.513 ± 0.020
Gallium	14.3	±	1.1	Tin	1.63 ± 0.41
Lanthanum	24.4	±	1.8	Titanium	2203 ± 268
Lithium	19.1	±	2.5	Tungsten	0.996 ± 0.104
Magnesium	10501	±	958	Uranium	1.72 ± 0.12
Mercury	0.098	±	0.029	Yttrium	12.5 ± 0.5

The reference values for the uncertified elements are subject to change as more data become available. The uncertainties listed for these elements are the standard deviation of a single measurement.

NOTE: Total metals are extracted using a strong acid sediment digestion with hydrofluoric acid (HF).

Original certification date 1990
Revision of certificate August 2001



Recoverable and Leachable Elements in SUD-1

Recoverable (or 'environmentally available') metals are extracted from the sediment using a strong acid digestion without hydrofluoric acid. These data are comparable to those produced by aqua regia methods quoted in the literature and to those produced by EPA Method 3051.

Leachable (or 'bioavailable') metals are extracted from the sediment using a cold acid leach procedure.

Recoverable and Leachable Concentrations of Major, Minor and Trace Elements in SUD-1 (ug/g)

	Recoverable	Leachable		Recoverable	Leachable
Aluminum	26129	3510	Manganese	568	299
Antimony	0.46	0.05	Molybdenum	0.52	0.07
Arsenic	32.7	20.0	Nickel	998	472
Barium	186	51.2	Niobium	0.22	0.05
Beryllium	0.731	0.261	Phosphorus	654	408
Bismuth	1.59	1.31	Potassium	6039	373
Boron	12.4	2.69	Rubidium	35.0	2.9
Cadmium	1.75	1.50	Scandium	7.7	1.3
Calcium	6600	2512	Selenium	2.52	0.47
Cerium	54.2	27.3	Silver	0.68	0.0005
Cesium	1.49	0.07	Sodium	730	191
Chromium	69.3	9.6	Strontium	61.2	8.32
Cobalt	43.3	22.3	Thallium	0.321	0.117
Copper	587	417	Tin	2.22	0.40
Gallium	8.38	1.22	Titanium	1012	58.2
Iron	30942	8250	Tungsten	0.13	0.01
Lanthanum	25.4	12.3	Uranium	1.50	0.71
Lead	50.5	38.6	Vanadium	53.2	10.9
Lithium	17.2	2.93	Yttrium	11.2	5.5
Magnesium	7995	1731	Zinc	802	701

These values above are listed for information only. They were generated using the methods described on page 3. Because reproducibility is strongly dependent on the digestion procedure, proportion of acids and extraction conditions, uncertainty intervals are not provided.

For more information, contact:

National Water Research Institute
National Laboratory for Environmental Testing
867 Lakeshore Road, PO Box 5050
Burlington, Ontario L7R 4A6
CANADA

Telephone: 1-905-336-4653
Fax: 1-905-336-8914
E-mail: crmsales@ec.gc.ca
Website: www.nwri.ca

Annexe 9: Corrélations entre les pentes des courbes inhibitions de croissance et les paramètres physico-chimiques.

Parametre	r	p
LOI	0.5717	0.0165
CN	0.1995	0.4427
argile	-0.0844	0.7475
limon	0.324	0.2046
sable	-0.2923	0.255
CaCO3	-0.084	0.7485
AVS	0.5767	0.0154
Cr	0.4681	0.0581
Fe	0.3886	0.1232
Co	0.2752	0.2851
Ni	0.3376	0.1851
Cu	0.6907	0.0021
Zn	0.3644	0.1504
As	-0.0928	0.7231
Cd	0.0225	0.9318
Pb	-0.0854	0.7445
Mn	-0.0461	0.8606
Hg	0.5881	0.013
PCBtot	0.6897	0.0022
HAPtot	0.5302	0.0286
Anthracène	0.2662	0.3017
Acénaphthène	0.2554	0.3225
Benzo..a..pyrène	0.1271	0.6269
Benzo..a..anthracène	0.4217	0.0918
Benzo..b..fluoranthène	0.5251	0.0304
Benzo..k..fluoranthène	0.2154	0.4065
Benzo..ghi..perylène	0.3595	0.1564
Chrysène	0.5052	0.0386
Dibenzo..a.h..anthracène	0.2033	0.4338
Fluoranthène	0.6004	0.0108
Fluorène	0.4028	0.1089
Indéno..1.2.3.cd..pyrène	0.5137	0.0349
Naphtalène	-0.0874	0.7386
Phénanthrène	0.487	0.0474
Pyrène	0.5578	0.02
Methyl.2.fluoranthène	-0.1943	0.455
Methyl.2.naphtalène	0.0103	0.9688

Annexe 10: Résultats de tous les paramètres mesurés

Sédiment	Croissance			Mortalité	
	CI 10	Pente	Inh. Sup. Max.	CL 10	Mort. Sup. Max
BB	212,3	2,16	13,6	0.0	0.0
LCB	17,02	7,7	26,4	0.0	0.0
PG2	11,03	9,2	51,8	0.0	0.0
CMA	13,72	3,99	29,3	0.0	0.0
CMC	11,03	7,29	25,6	6,1	13,3
PG3	20,37	6,57	37,2	74,8	20.0
IBA	41,3	8,58	28,1	0.0	0.0
MOR	40.0	12,12	60,8	0.0	0.0
MAR	39,19	2,7	45,7	32,4	46,7
VID	24,78	16,3	70.0	67,9	26,7
CAJ	41,24	6,87	33.0	0.0	0.0
PG5	22,51	10,48	40,6	15,4	53,3
AMO	3,48	6,27	37,45	20,3	23,3
BIO	24,37	10,48	47,7	40,3	13,3
BIE	23,17	9,55	59,7	25,4	60.0
NEY	94,35	6,45	14,51	10.0	33,3
LGB	10,8	9,49	33,5	18.0	16,7
LAV	30,966	7,1	34,4	351,5	3,3
ETA	38,09	6,05	40.0	216,82	37,68
CHA	13,3	9,2	47.0	146,74	37.0
SIR	7,047	5,28	15,5	190,59	16,7

Annexe 11 : Précisions sur les tests comportementaux des ostracodes

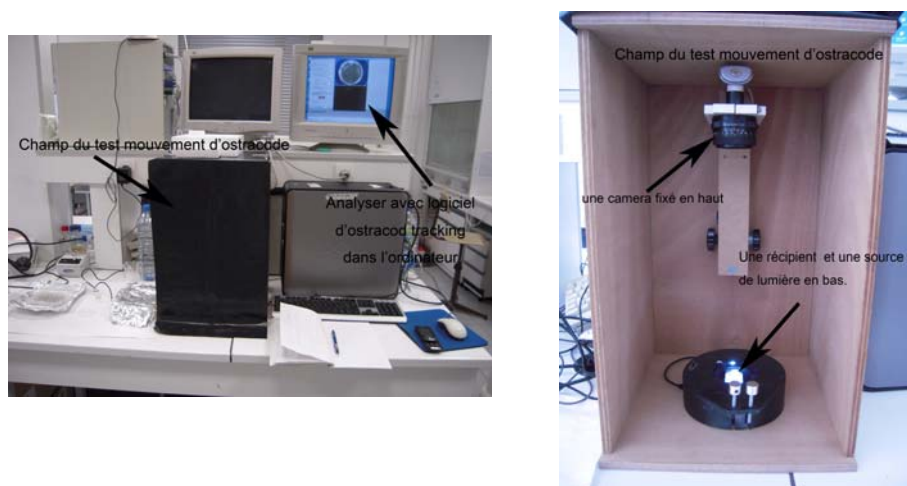
Méthodologie développée

Protocole développé pour tester les mouvements d'ostracode

Nous avons préparé des microplaques en suivant la méthodologie du test modifié (chapitre 5) en utilisant deux concentrations de cuivre (1 et 1,8mg L⁻¹) entourant la CI50 historique de laboratoire (5.8 mg/L). Nous avons préparé deux microplaques identiques pour chaque concentration de cuivre testé et leur témoin pour faire deux lectures après 4 jours et 6 jours d'exposition. Après les deux temps d'exposition, une première mesure du mouvement de 10 individus (pris au hasard) pour chaque condition est conduite.

Critères d'effet mesurés

Les critères d'effet mesurés ont été : la durée de déplacement, la durée d'immobilisation et la vitesse de déplacement. Ces paramètres ont été calculés à partir des analyses de mouvements des ostracodes par un système d'« Ostracod tracking » développé par Philippe Rousselle, la figure ci-dessous (Figure A1) présente les dispositifs adoptés pour les analyses.



**Figure A1 : Diapositive pour l'analyse de mouvement des ostracodes
« Ostracod tracking »**

Résumé.

Les sédiments sont des compartiments du milieu aquatique qui accumulent des polluants *via* les dépôts de matières en suspension. La contamination des sédiments peut présenter potentiellement des effets négatifs sur les organismes aquatiques, et pour cette raison ils convient de les surveiller, évaluer et protéger afin de garantir l'intégrité de la structure et du fonctionnement des écosystèmes aquatiques. Le projet ANR-PRECODD DIESE (Outils de Diagnostic de l'Ecotoxicité des Sédiments) a réuni différents partenaires pour le développement d'une **stratégie d'évaluation graduée du risque environnemental des sédiments** contaminés d'eau douce. C'est dans le cadre de ce projet que se situe notre travail de recherche qui concerne le **développement et l'optimisation de microbiotests en phase solide pour évaluer l'écotoxicité des sédiments**. Les microbiotests sélectionnés dans la cadre de cette étude ont été les tests Microtox® en phase solide (MSPA), le test algues en phase solide, le test Luminotox en phase solide (Lum-SPA) et l'Ostracodtoxkit®. Ces biotests se caractérisent par différentes conditions d'essai et divers critères d'évaluation. Ils ont généré différentes réponses pour chaque sédiment testé, le test algues a été le seul test qui n'a pas présenté de sensibilités avec tous les échantillons testés. En outre, nous avons montré que les réponses des tests MSPA et Lum-SPA étaient corrélées à certaines caractéristiques géochimiques des sédiments. Finalement, nous avons synthétisé les réponses de trois microbiotests à l'aide d'un indice d'intégration permettant ainsi de discriminer l'écotoxicité observée des sédiments.

Mots-clés : Sédiment, écotoxicité, microbiotests, indice, Microtox, Luminotox, ostracode, algues

Abstract.

The sediments are a compartment of the aquatic environment that tends to accumulate pollutants through the deposition of suspended solids. Sediment contamination can have potentially negative effects on aquatic organisms, so it is necessary to monitor, assess and protect the sediments to ensure the integrity of the structure and functioning of aquatic ecosystems. The ANR-PRECODD DIESE (diagnostic tools for assessing sediment ecotoxicity) has joined efforts of different partners to develop a strategy for tiered environmental risk assessment of contaminated freshwater sediments. In the framework of this project our research was focused on the development and optimization of solid phase microbiotests to assess the ecotoxicity of freshwater sediments. The microbiotests selected in this study were the tests Microtox® solid phase (MSPA), the algal solid phase test, the test LuminoTox solid phase (Lum-SPA) and Ostracodtoxkit®. These biotests are characterized by different test conditions and assessment criteria. We have obtained different responses for each tested sediment. The algal test was the only ones that have not reported sensitivities with all samples tested. Furthermore, we demonstrated that the response of the test Lum-SPA and MSPA were correlated with some geochemical characteristics of sediments. Finally, we synthesized the responses of three microbiotests using an index of integration allowing to discriminate between the observed sediment ecotoxicity.

Keywords: Sediment, ecotoxicity, microbiotests, index, Microtox, Luminotox, ostracod, algae

Development and validation of solid phase microbiotests for the ecotoxicological assessment of sediment

Extended abstract

Introduction

The sediments are a compartment of the aquatic environment that tends to accumulate pollutants through the deposition of suspended solids. Sediment contamination can have potentially negative effects on aquatic organisms, so there is need to monitor, assess and protect the sediments to ensure the integrity of the structure and functioning of aquatic ecosystems. The ANR-PRECODD DIESE (diagnostic tools for assessing sediment ecotoxicity) has joined efforts of different partnership to develop a strategy for tiered environmental risk assessment of contaminated freshwater sediments. In the framework of this project our research was focused on the development and optimization of solid phase microbiotests to assess the ecotoxicity of freshwater sediments. Among the various microbiotests called solid phase described in the literature, we chose to use in this study the Microtox solid phase test, the algae solid phase test, the LuminoTox solid phase test and Ostracodtoxkit®.

Twenty-one sediments covering the widest range possible concerning to size particles, amount of organic matter and degree of contamination were tested using the microbiotests selected. The main objective of this thesis was the methodological validation of the microbiotests for solid phase to be applied to any sediment. Moreover, we wanted i) to highlight and quantify if possible the potential biases previously reported in the literature caused by the natural characteristics of the sediments and ii) to optimize the existing tests developing variants of these tests.

Methodologies developed in the battery of microbiotests

The Microtox® Solid-Phase Assay (MSPA) initially developed by Brouwer et al., (1990) is one of the most popular tests for solid phase assessments (Beelen 2003). The Microtox® test was performed initially with liquid samples, as it is based on the inhibition of light production of the marine bacterium recently renamed *Aliivibrio fischeri* (Urbanczyk *et al.*, 2007). It has been reported that the response of this test can suffers various bias and interferences, mainly due to physico-chemical characteristics of the tested solid phase. To assess ecotoxicity of sediments, we have developed an alternative method, named Microtox® Leachate Phase Assay (MLPA), in order to measure the action of dissolved pollutants in the aqueous phase. Two hypotheses were formulated to explain the observed difference between MSPA and MLPA results: a real ecotoxicity of the solid phase or the fixation of bacteria to fine particles and/or organic matter. To estimate the latter, flow cytometry analyses were performed with two fluorochromes (known for their ability to stain bacterial DNA), allowing correction of MSPA measurements and generation of new (corrected) IC50. Comparison of results of MLPA with the new IC50 MSPA allows differentiating real ecotoxic and fixation effect in classic MSPA especially for samples with high amount of fines and/or organic matter.

The LuminoTox solid phase assay (Lum-SPA), developed to assess the potential ecotoxicity of natural polluted sediments, employs stabilized thylakoids isolated from spinach plant extracts. When thylakoids are exposed to polluted samples, the action of pollutants can interfere with transmission of chlorophyll fluorescence linked to Photosystems I and II, causing a decrease in fluorescence emission. To differentiate between bulk and leachate effects, we developed a complementary assay of the Lum-SPA named the LuminoTox leachate phase assay (Lum-LPA). Natural sediments were selected on the basis of their potential ecotoxicity and different quantities of fines. Results showed that in the Lum-LPA, the IC50s were always lower than those observed in the Lum-SPA. Significant inverse correlations were found between the IC50s obtained with the Lum-SPA and the percentage of fines (silt + clay fraction). In order to identify the cause of the higher ecotoxicity found in the Lum-LPA, we tested the supernatant of the liquid phase recovered after centrifugation (3,000 g), and it appeared far less toxic than the Lum-LPA filtrates. To confirm the hypothesis that sensitivity in the Lum-LPA could be due to the presence of very fine particles, Photosynthetic Enzyme Complexes (PECs) were exposed to two kinds of clay materials. Similar results were obtained in the Lum-LPA for both cases, revealing the sensitivity of this test to very fine particles.

The test of growth inhibition with algae was originally developed to test liquid matrices. The algae have also been used in battery of tests to evaluate the ecotoxicity of solid matrices such as soil, sediment, sludge and waste, testing different extracts as interstitial water, the organic extracts and elutriate (Ahlf et al. 1989, Giesy and Hoke 1989, Davoren et al. 2005). Considering the importance of testing as the solid phase of the sediments, Blaise and Menard (1998) developed a test of "direct contact" with the sediment named ASPA (Algal solid Phase Assay) based in the analysis of their esterase activity after 4 or 24 hours of exposure of the microalgae *Pseudokirchneriella subcapitata* to sediment. In this part of our research, we studied the feasibility and the discriminating power of the test ASPA from the analysis of 21 natural sediments samples. In the other hand we developed another method named ASPAIC (Algal solid phase assay growth inhibition) based on the analysis of the capacity of algae to growth up after their exposition to contaminated sediments. The responses obtained in our study with the both versions of the test algae solid phase could not allow to discriminate between medium and highly contaminated samples. The low power of ecotoxicity discrimination of ASPA and ASPAIC could be related to the natural characteristics of the sediment. The nutrients inside the sediments such as nitrogen or phosphorus may stimulate algal growth in the test ASPAIC. This beneficial effect is greater than the adverse effects of pollutants in the dissolved phase and the particulate phase of the sediments.

The test Ostracodtoxkit is a chronic ecotoxicity test which is based on the measurement of mortality and growth of juvenile ostracod species *Heterocypris incongruens*. The organisms are exposed for 6 days to contaminated sediments, and at the end of the test, the mortality rate is measured as the length of each individual, which is finally used to calculate a percentage of mortality and growth inhibition. The results obtained in our research showed that the growth inhibition was a more sensitive endpoint than mortality. The same tendency was observed in other studies (Chial & Persoone 2002, Joner et al. 2004, Oleszczuk 2008). These organisms, when are exposed to the contaminated matrix, probably canalize their energy to keep their maintenance and survival functions at the

expense of their development (Barata & Baird 2000). Due to the different pathways on which contaminants can affect this organism, ostracodes are interesting to include in a battery of microbiotests assessing the ecotoxicity of solid matrices.

Ecotoxicity assessment of the sediments with the battery of bioessai

The MSPA, Lum-SPA and ostracods showed a good discriminatory ecotoxicity power of the sediments studied. The three tests identified similarly sediments with extreme levels of ecotoxicity (very low or very strongly ecotoxic), the different responses between these tests was mainly observed in sediments moderately ecotoxic. The responses were not redundant but rather complementary. This complementarity could be explained by their fact that the organisms belong to different trophic levels and the pollutants targets may differ between the organisms tested.

In addition, the microbiotests presented are easy to implement, relative low cost, fast and can be applied to any kind of sediment. It should also be noted that microbiotests proposed in our work can not replace the chronic bioassays with more complex organisms. This battery of microbiotests must be seen as an early warning system for an initial assessment of the potential ecotoxicity of sediments.

Global responses of the battery of microbiotests

Furthermore, in our research we deduced that responses obtained with the three microbiotests (MSPA, Lum-LSA and ostracods) could be related to the contamination measured in the sediments. In fact, the analysis of coinertie made between the responses of each microbiotests and contaminants measured in sediments showed significant relationships ($RV = 0.38$, $p = 0.023$). Despite the limitations of this type of multivariate analysis, it appears that sediment chemistry plays an important role in biological responses. Moreover, this analyze revealed that the relationship between the response of microbiotests and contaminated measured is stronger for some sediments than others, this differences ca be related by others factors than influence the response of microbiotests for example the contaminants unmeasured in the sediments like pesticides, dioxins, medicaments, the effect of mixture pollutants y/or the sediment geochemistry.

Integration the responses of the microbiotest selected

In order to have a global view of the battery responses, the IBR (Integrated Biotest Responses) and modified PEEP (Potential Ecotoxic Effects Probe) indices were applied and compared. Results showed that both indices were significantly correlated, but no significant correlation was found with Q_{PEC} (Quotient of measured pollutant concentration to Probable Effect Concentration (PEC) defined by MacDonald *et al.* (2000) values. These not correlation with PEC could be related by different factors for example the incomplete chemical analyses of the sediments (other pollutants), the combined effects of pollutants (antagonists or synergistic), the geochemical characteristics of the sediments, the bioavailability of contaminants. Finally the indices proposed in this

work are open tools to integrate the responses of other bioassays, which could give more robustness for a complete ecotoxicity assessment of the sediments.