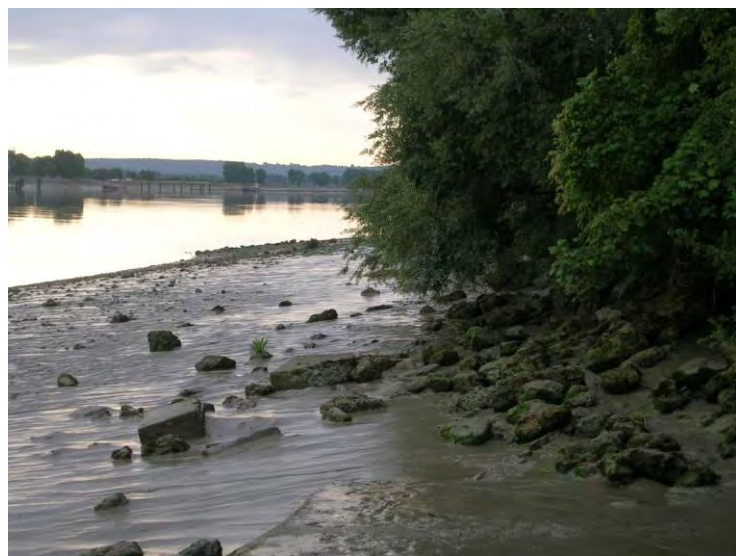


# Rapport Seine-Aval 4



## TOXSEINE

Analyse de la toxicité globale  
et identification des composés toxiques  
à risque dans l'estuaire de la Seine



Cachot J., Forget-Leray J., Ouddane B., Deloffre J.



Octobre 2012



GIP Seine-Aval  
Pôle Régional des Savoirs  
115 Bd de l'Europe  
76 100 - Rouen

tel : 02 35 08 37 64  
<http://www.seine-aval.fr>

Analyse de la toxicité globale et identification des composés toxiques  
à risque dans l'estuaire de Seine. Projet ToxSeine.

- Rapport final -

Jérôme Cachot, Ludovic Vicquelin, Laure Landi, Christelle Clérandeau, Anaïk Pichon, Iris Barjhoux, Floranne Lebihanic, Karyn Le Menach, Marie-Hélène Dévier, Jean-luc Giraudel, Caroline Gardia Parege, Hélène Budzinski  
Université Bordeaux 1, EPOC UMR 5805, groupe LPTC, 351 cours de la Libération 33405  
Talence

Joëlle Forget-Leray, Ludovic Vicquelin, Céline Boulangé-Lecomte, Nathalie Petrucciani, Sabria Barka, Teddy Lesueur, Christophe Minier, Sabine Marie  
Université du Havre, LEMA EA3222, FED SCALE 4116, ST2, 25 rue Philippe Lebon, 76058  
Le Havre Cédex

Baghdad Ouddane, Mariam Hamzeh  
Université Lille1, Laboratoire Géosystèmes UMR - CNRS 8217, Equipe chimie marine

Julien Deloffre  
Université de Rouen-Caen, Laboratoire M2C, UMR CNRS 6143, Université de Rouen

# Sommaire

<b>1. Introduction.....</b>	<b>4</b>
<b>2. Zone géographique concernée.....</b>	<b>5</b>
<b>3. Résultats scientifiques détaillés acquis au cours du projet.....</b>	<b>5</b>
3.1 Développement de nouveaux tests d'écotoxicité sur sédiment.....	5
3.1.1 Bioessai nauplien avec <i>Eurytemora affinis</i> .....	5
3.1.2 Bioessai sur embryons et larves de poisson.....	9
3.1.2.1 Test embryo-larvaire sur poisson médaka.....	9
3.1.2.2 Test embryo-larvaire sur truite arc-en-ciel.....	14
3.2 Définition de valeurs guides de toxicité pour les sédiments.....	17
3.3 Analyse rétrospective de la contamination dans l'estuaire de Seine.....	19
3.3.1 Prélèvement et découpe de la carotte sédimentaire.....	19
3.3.2 Caractérisation physico-chimique et profil sédimentaire.....	20
3.3.3 Distribution des micropolluants.....	22
3.3.3.1 Eléments traces métalliques.....	22
3.3.3.2 Composés organiques.....	24
3.3.4 Evaluation de la toxicité des sédiments.....	27
3.3.4.1 Modélisation de la mobilité des métaux.....	27
3.3.4.2 Potentiel cytotoxique des sédiments : test Microtox®.....	28
3.3.4.3 Potentiel génotoxique des sédiments : SOS Chromotest.....	29
3.3.4.4 Potentiel oestrogénique des sédiments : Test YES.....	30
3.3.4.5 Potentiel neurotoxique : test d'inhibition activité AchE.....	31
3.4 Analyse des sédiments superficiels.....	32
3.4.1 Prélèvement et conditionnement.....	32
3.4.2 Caractérisation physico-chimique et profil sédimentaire.....	33
3.4.3 Distribution des micropolluants.....	36
3.4.3.1 Eléments traces métalliques.....	36
3.4.3.2 Composés organiques.....	39
3.4.4 Evaluation de la toxicité des sédiments.....	42
3.4.4.1 Modélisation de la mobilité des métaux.....	42
3.4.4.2 Potentiel cytotoxique des sédiments : test Microtox®.....	43
3.4.4.3 Test de toxicité aiguë sur <i>Corophium sp.</i> .....	44
3.4.4.4 Toxicité sur nauplius d' <i>Eurytemora affinis</i> .....	45
3.4.4.5 Toxicité sur embryons et larves de poissons médaka.....	47
3.4.4.6 Potentiel génotoxique.....	50
3.4.4.7 Cartographie des niveaux de danger dans l'estuaire de Seine.....	52
3.5 Etude de la remise en suspension des sédiments superficiels.....	54
3.5.1 Cinétique de relargage des polluants organiques.....	54
3.5.2 Cinétique de relargage des polluants organiques.....	61
3.5.3 Cinétique d'appariation de la toxicité.....	63
3.6 Identification des substances toxiques.....	64

3.6.1 Pré-fractionnement et mesure de toxicité des fractions.....	64
3.6.2 Identification des substances.....	66
<b>4. Retombées opérationnelles directes et/ou indirectes du projet.....</b>	<b>69</b>
<b>5. Conclusions.....</b>	<b>69</b>
<b>6. Liste des communications et/ou publications par l'ensemble des équipes du projet.....</b>	<b>72</b>
6.1 Communications dans des congrès internationaux.....	72
6.2 Articles dans des revues de rang A.....	73
6.3 Articles soumis.....	73
6.4 Thèses.....	74
<b>7. Bibliographie des publications citées dans le rapport.....</b>	<b>74</b>

## 1. Introduction

Depuis sa création le programme Seine-Aval a suscité de très nombreuses études sur la contamination de l'estuaire de Seine et les effets toxiques induits chez plusieurs espèces emblématiques de l'estuaire. Ces études ont mis en évidence une contamination relativement importante des sédiments et des premiers maillons trophiques par des composés métalliques principalement le mercure, le cuivre, le plomb, le cadmium, le zinc et l'argent (Miramand et al., 2001 ; Chiffolleau et al., 2001 ; Cundy et al., 2005 ; Chiffolleau et al., 2005 ; Cachot et al., 2006 ; Rocher et al., 2006 ; Ouddane et al., 2008) et par des composés organiques tels que les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAPs) et dans une moindre mesure par les polychlorobiphényles (PCBs) (Minier et al., 2005 ; Cachot et al., 2006 ; Rocher et al., 2006 ; Cailleaud et al., 2007a). Plus récemment de nombreux médicaments et xénoestrogènes ont été mis en évidence (Cailleaud et al., 2007b ; Togola et Budzinski, 2007). Certains métaux et la plupart des polluants organiques persistants charriés par les eaux de la Seine ont tendance à s'accumuler dans les sédiments de l'estuaire. Il en résulte une toxicité importante de ces sédiments qui a été mise en évidence par des tests *in vitro* de génotoxicité (Cachot et al., 2006) et des tests embryon-larvaires sur mollusque bivalve (Cachot et al., 2006). Par ailleurs, des études *in situ* ont montré que les populations de poissons de Seine pouvaient être affectées par la pollution de leur habitat. Ainsi les juvéniles de flet vivant dans la partie amont de l'estuaire présentent de 2 à 10 fois plus de dommages à l'ADN que ceux vivant dans la partie basse de l'estuaire et 5% des flets adultes présentent des lésions hépatiques tumorales ou pré-tumorales (Cachot, 1998). Les flets de l'estuaire de Seine présentent de moindres performances biologiques par rapport aux populations de la côte atlantique (Marchand et al., 2004). Les juvéniles de sole de l'estuaire de Seine et de Gironde présentaient une croissance et des densités moindres par rapport à d'autres estuaires et pertuis de la côte atlantique (Gilliers et al., 2006). Il existe donc à présent un faisceau d'indices démontrant que la pollution de la Seine peut non seulement engendrer des effets délétères au niveau individuel mais également avoir des conséquences au niveau des populations de poissons.

De très nombreux polluants organiques mais également des métaux peuvent s'adsorber sur les particules. La sédimentation de ces particules au niveau des estuaires et des zones marines côtières conduit à une accumulation plus ou moins durable de ces polluants dans les sédiments estuariens. Ils constituent à ce titre de véritables réservoirs de polluants et représentent un danger pour toutes les espèces qui vivent ou se nourrissent dans les sédiments. Ils peuvent par ailleurs représenter une source secondaire de contamination pour l'ensemble de l'écosystème aquatique lors de leur remise en suspension et la désorption des polluants qui y sont fixés. De nombreux processus hydrodynamiques (marées, crues, tempêtes ...), physicochimiques (potentiel oxydo-rédox...) et biologiques (bioturbation) et enfin les activités humaines (dragage, construction d'ouvrages, trafic fluvial ...) peuvent conduire au déstockage rapide des polluants accumulés dans les sédiments et ainsi faire peser un risque pour les espèces vivant dans la colonne d'eau. Pour l'ensemble de ces raisons il apparaît essentiel d'une part de mesurer la contamination et la toxicité des sédiments mais également les conditions de désorption des polluants lors de la remise en suspension des sédiments.

L'objectif général du projet ToxSeine concernait l'évaluation et la cartographie de la toxicité des sédiments de l'estuaire de Seine et l'identification des substances toxiques à risque. Ce projet était organisé en cinq actions interdépendantes et complémentaires. La première action visait à développer deux tests embryon-larvaires pour l'évaluation de la toxicité des sédiments en utilisant deux espèces

emblématiques de l'estuaire, un micro-crustacé et un poisson. La seconde action visait à évaluer la toxicité globale des polluants associés aux sédiments de l'estuaire de Seine en mettant en œuvre une approche multi-essais. L'action 3 avait pour but de réaliser une analyse rétrospective de la contamination et de la toxicité résiduelle des sédiments de l'estuaire de Seine en utilisant comme archive sédimentaire une carotte de sédiment prélevée dans le bassin des docks à Rouen. L'action 4 avait pour but d'identifier les composés ou familles de composés responsables de la toxicité des sédiments de l'estuaire en adoptant une approche TIE (*Toxicity Identification Evaluation*). Enfin, l'action 5 avait pour objectif de simuler la remise en suspension de sédiments pour suivre la cinétique temporelle de relargage des polluants métalliques et organiques et la toxicité résultante.

## 2. Zone géographique concernée

La zone d'étude a couvert l'ensemble de l'estuaire de Seine du barrage de Poses jusqu'à l'embouchure. Une carotte de sédiment a été collectée dans la darse des docks du port de Rouen en avril 2008. Des sédiments superficiels ont été collectés sur les berges de la Seine au niveau de 7 sites de l'estuaire au cours des quatre saisons de 2009 (Figure 1).

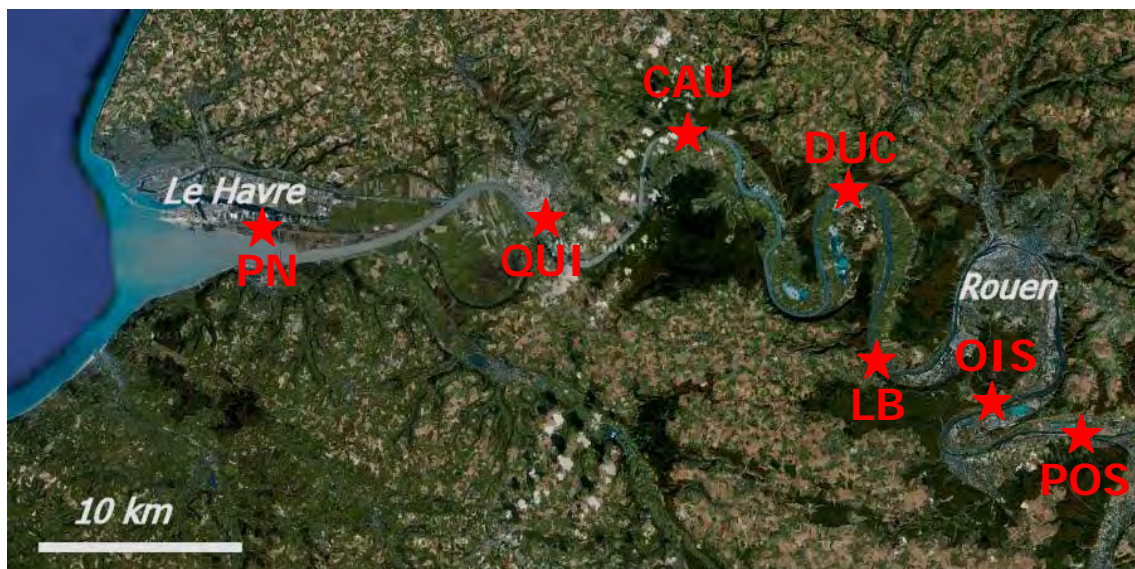


Figure 1 : répartition des échantillons de surface prélevés dans le projet TOXSEINE. Pos (Poses), Ois (Oissel), LB (La Bouille), Duc (Duclair), Cau (Caudebec), Qui (Quillebeuf), PN (Pont de Normandie).

## 3. Résultats scientifiques détaillés acquis au cours du projet

### 3.1 Développement de nouveaux tests d'écotoxicité sur sédiment

#### 3.1.1 Bioessai nauplien avec *Eurytemora affinis*

Nous avons déterminé la sensibilité de notre test embryo-larvaire sur *Eurytemora affinis* à l'aide de composés modèles (3 HAPs :BaP, Phe, DMBA, 2 PCBs 126 et 153, un alkylphenol, 4-NP). Les tests embryo-larvaires sur *Eurytemora affinis* s'appuient sur les travaux de Forget-Leray et al (2005) et Devreker et al (2007) réalisés dans le cadre du programme Seine Aval 3. Les tests sont pratiqués en

conditions contrôlées directement sur les premiers stades de développement du copépode, la phase nauplienne. Les effets toxiques sont suivis tout au long du développement nauplien.

Les copépodes *E. affinis* ont été collectés à l'aide d'un filet WP2 (maillage 200 µm) dans la zone oligo-haline de l'estuaire de Seine près du pont de Tancarville. Les échantillonnages ont été effectués contre le courant de jusant à marée descendante. Les organismes ont été maintenus dans des glacières afin d'être ramenés au laboratoire. Arrivés au laboratoire, ils ont été transférés dans des béciers de 3,5 L et acclimatés aux conditions d'expositions (*i.e.* eau Volvic à 5 PSU, 15°C). Les copépodes ont ensuite été maintenus dans une chambre thermostatée à 15 °C et à une photopériode de 12 heures jour/12 heures nuit (Figure 2).

Les éluutriats à 5g/L ont été réalisés en dissolvant 0,25g de sédiments enrobés pour chaque condition dans 50 mL d'eau Volvic à une salinité de 5 PSU. Les éluutriats sont ensuite recouverts de papier aluminium, puis laissés sous agitation toute une nuit avant d'être testés.

Trois réplicats d'homogénat (éluutriats) à 5 g/l de sédiments (sédiment + eau à 5PSU) sont déposés dans des cristallisoirs de 2,5 cm de diamètre. Les nauplii âgées de 24h au stade N1 (environ 30 à 50) sont alors placées dans chaque cristallisoir contenant 10ml d'homogénat. Les cristallisoirs contenant les nauplii sont ensuite placés dans une enceinte thermostatée à 18°C, au rythme circadien (12 heures de luminosité et 12 heures d'obscurité). Chaque jour, la viabilité des nauplii est vérifiée. Les animaux sont nourris avec une suspension d'algues vertes (*Isochrysis sp*) le premier et le troisième jour. Au 6<sup>ème</sup> jour, la taille des individus au stade N6 (longueur L) est évaluée (3 mesures de 10 individus par réplicat) (Figure 3).

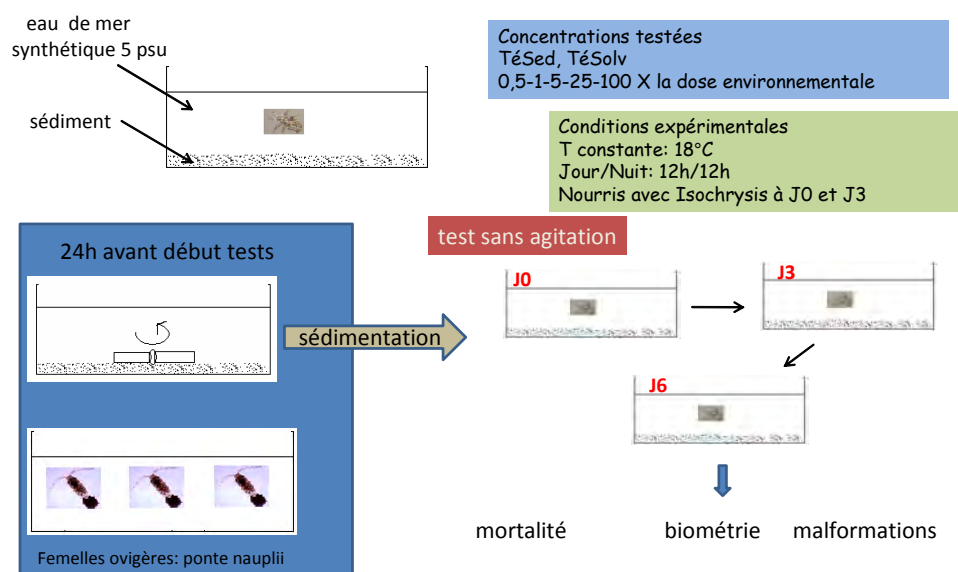
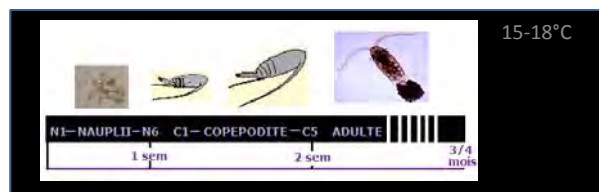


Figure 2 : bio essai nauplien avec *Eurytemora affinis* pour évaluer la toxicité des sédiments



Figure 3 : Nauplii d'*Eurytemora affinis* (mesure de la longueur totale)

Les résultats présentés sont la survie pour les six expositions en fonction des concentrations réelles des contaminants dans les sédiments dopés (Figures 4, 5 et 6). La survie des nauplii au bout des 6 jours d'exposition a été au moins de 85% dans tous les témoins solvants. Les effets du 4-NP sur la mortalité des nauplii sont significatifs quel que soit la concentration testée (Figure 4). En ce qui concerne les PCBs, deux cas de figure se présentent une mortalité significative à la plus forte concentration dans le cas du PCB 126, alors que le PCB 153 se révèle plus toxique avec des effets significatifs sur la survie à des concentrations plus faibles dès 12 ng/g de sédiment dopé (Figure 5).

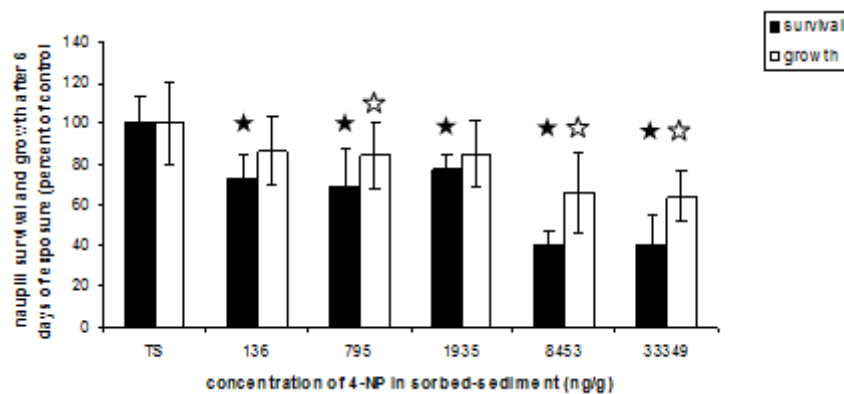


Figure 4. Survie et croissance des nauplii au cours des 6 jours d'exposition au 4-Nonylphénol, en ordonnée figure le pourcentage de mortalité et en abscisse la concentration des sédiments dopés (\*) représente une différence significative par rapport au contrôle (Unilateral Mann-Whitney rank sum test ;  $p < 0,05$ ).

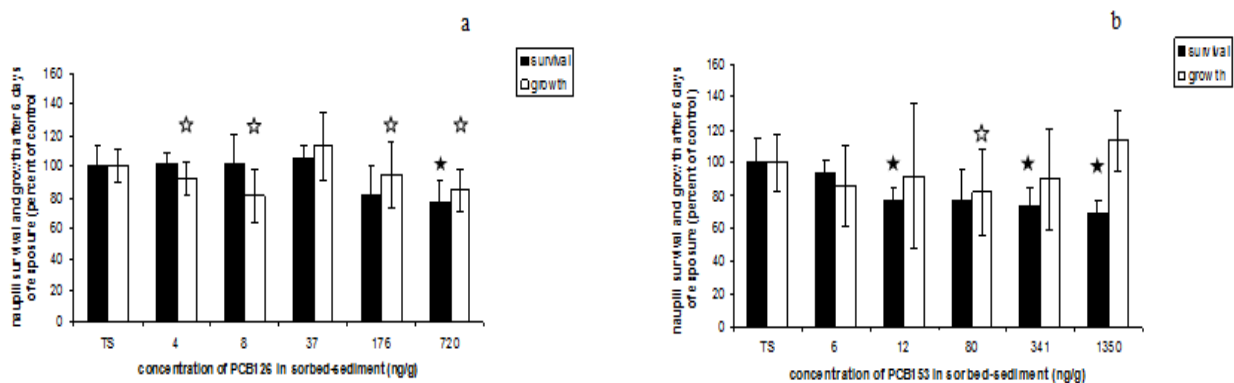




Figure 5. Survie et croissance des nauplii au cours des 6 jours d'exposition aux PCB126 (a) et PCB153 (b), en ordonnée figure le pourcentage de mortalité et en abscisse la concentration des sédiments dopés. (\*) représente une différence significative par rapport au contrôle (Unilateral Mann-Whitney rank sum test ;  $p < 0,05$ ).

Les effets des HAPs sur la mortalité des nauplii sont significatifs à partir de concentrations les plus élevés 5,3 µg/g pour le BaP, 6,5 µg/g pour le phénanthrene et 6 µg/g pour Le DMBA (Figure 6).

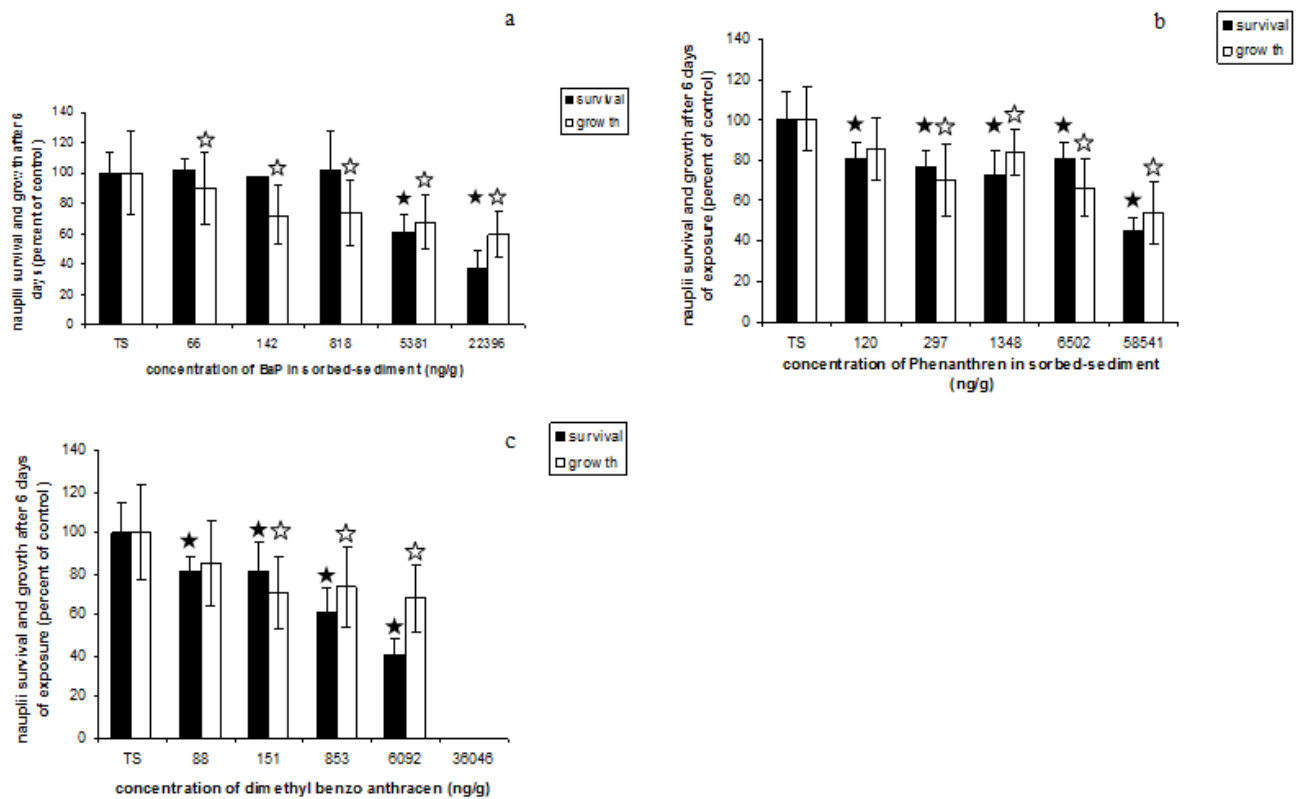


Figure 6. Survie et croissance des nauplii au cours des 6 jours d'exposition aux HAPs :BaP(a), Phe (b) et DMBA (c), en ordonnée figure le pourcentage de mortalité et en abscisse la concentration des sédiments dopés. (\*) représente une différence significative par rapport au contrôle (Unilateral Mann-Whitney rank sum test ;  $p < 0,05$ ).

Quel que soit l'elutriat, on observe une tendance à l'augmentation de la mortalité en fonction de la concentration en contaminant du sédiment dopé.

La taille est mesurée le jour de l'éclosion et après 6 jours de développement, il s'agit donc de la croissance du premier stade de développement : la phase nauplienne (Figures 4, 5 et 6). Le 4-nonylphénol affecte la croissance des nauplii avec une réduction de la taille des animaux d'environ 35% à des concentrations environnementales dès 795 ng/g de sédiment. Pour les PCBs, les effets sur la croissance des nauplii sont différents suivant le composé. Pour le PCB126 quel que soit la concentration, la croissance des nauplii est affectée, alors que pour le PCB 153 seule la plus forte concentration semble avoir des répercussions sur la croissance. Les trois composés de type HAPs

modifient la croissance entraînant la réduction de la taille des animaux, à des concentrations faibles à moyennes, pouvant se retrouver dans l'environnement (respectivement 142 et 197 ng/g de sédiment pour le Phénanthrène et le Benzo(a)pyrène, dès 88 ng/g pour le Diméthylbenzoanthracène. Il est important de noter que dans tous les cas d'exposition les naupli ont atteint le stade N6 qui correspond à un développement normal des naupli en 6 jours, malgré une taille observée et mesurée des individus plus petite chez les individus exposés dans la plupart des cas .

Comme relevé dans la littérature la phase nauplienne des copépodes est la fenêtre la plus sensible de l'organisme pour connaître les effets des contaminants (Hack *et al*, 2008; Lotufo and Fleeger, 1997). Dans nos expositions le taux de survie et la croissance diminuent dans tous les cas d'exposition sauf pour le PCB126. La croissance apparaît comme un paramètre très sensible à la contamination sauf dans le cas du PCB153. Ces composés sont connus dans la littérature pour avoir des effets sur la survie et la croissance chez d'autres crustacés, comme les HAPs connus à fortes concentrations pour avoir des effets létaux chez la crevette adulte *Palaemonetes pugio*, et à concentrations plus faibles entrainer des effets sur la mue et la reproduction (Oberdöster *et al*, 2000). Pour le BaP, une étude antérieure de Forget *et al* (2005) ne montrait aucun effet sur la survie mais des effets sur le développement dès la phase nauplienne, ce que nos résultats confirment. Dans le cas du phénanthrene, Lotufo et Fleeger (1997) ont démontré des effets de ce contaminant sur la survie et le développement de deux espèces de copépodes *Schizopera Knabeni* and *Nitocra lacustris*. Pour Finir le 4-NP est un composé connu comme perturbateur endocrinien chez de nombreux invertébrés et poissons. Zou et Fingerman (1999) ont rapporté un effet du 4 (ter) octylphenol sur la mue en retardant celle-ci chez un crustacé (*Uca pugilator*). Nos résultats confirment cette hypothèse. Pour les PCBs les effets observés sont cohérents avec la littérature, avec une toxicité létale plus élevée du PCB126 par rapport au PCB153 (Nakari and Huhtala (2008).

Les effets sur la croissance sont en général moins renseignés dans la littérature. La croissance apparaît comme très sensible aux contaminants et ceci pourrait être expliqué par la mobilisation de ressources énergétiques pour la détoxification des composés plutôt que de favoriser le développement de l'animal.

### 3.1.2 Bioessai sur embryon et larves de poissons

#### 3.1.2.1 Test embryon-larvaire medaka

Le test de toxicité d'embryo-larvaire Médaka (ELM) a été développé au LPTC dans le cadre des thèses de Ludovic Vicquelin et Iris Barjhoux. Ce test consiste à exposer des embryons de médaka à des sédiments naturellement ou artificiellement contaminés pendant toute la durée de leur vie embryonnaire puis à mesurer les effets létaux et sub-létaux induits sur les embryons exposés et les larves issues de ces embryons.

Vingt-cinq à trente embryons par réplicat sont incubés (9 à 10 jours à 26°C) à la surface d'un sédiment de référence dopé avec différentes concentrations de la molécule à analyser. Le sédiment n'est pas renouvelé pendant toute la durée de l'expérience. Seul le niveau du tampon ERS dans lequel baignent les embryons est ajusté quotidiennement. La température ( $26 \pm 1^\circ\text{C}$ ), l'éclairement, la photopériode (12/12), l'oxygène dissous dans la colonne d'eau (>80%) sont contrôlés pendant toute la durée de l'expérience. A la suite de ces 10 jours d'exposition les embryons non éclos sont placés dans du tampon propre et leur éclosion est suivie quotidiennement pendant 10 jours supplémentaires. Les larves écloses sont placées en eau propre et observées quotidiennement pendant 10 jours. La toxicité

des sédiments est évaluée par la mesure d'une batterie d'effets létaux et sub-létaux sur les embryons et les larves. Outre le taux de mortalité embryonnaire et larvaire, le rythme cardiaque au jour 8, la durée du développement embryonnaire, le taux d'éclosion, la fréquence et la nature des anomalies squelettiques et cardio-vasculaires, la taille du corps et la taille de la tête des larves à l'éclosion ainsi que les dommages à l'ADN (test des comètes) sont pris en compte pour évaluer la toxicité du sédiment dopé (Figure 7).

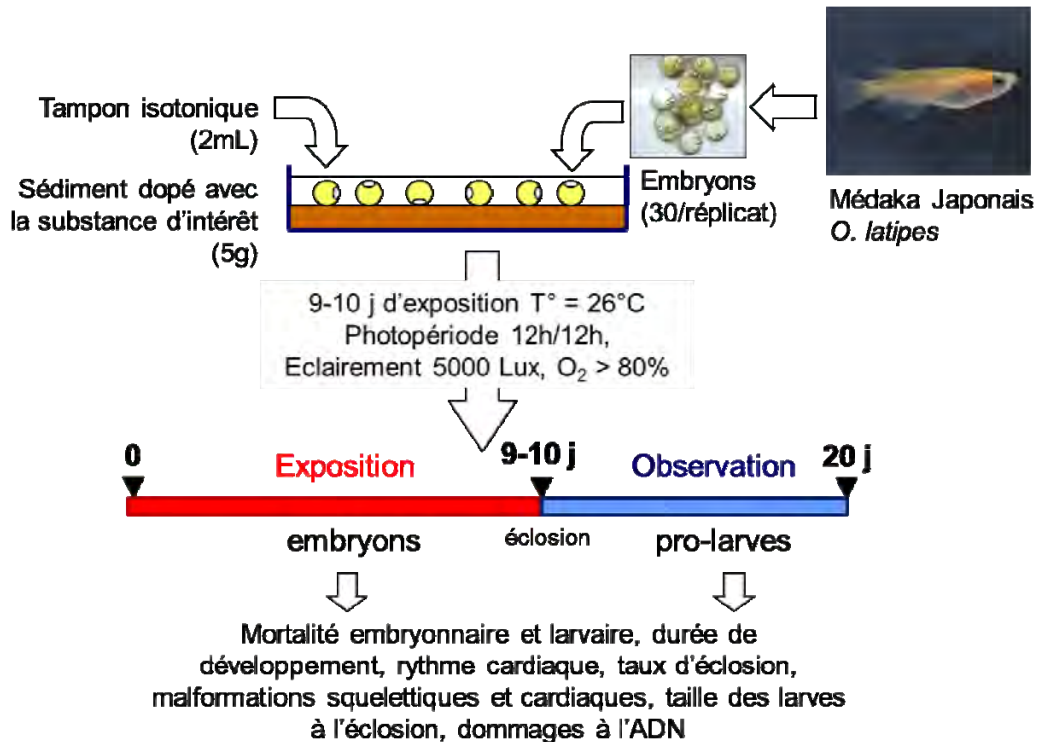


Figure 7: Mode opératoire pour l'évaluation de la toxicité des sédiments en utilisant le test de toxicité embryonnaire-larvaire sur médaka japonais (Test ELM)

Ce test a été validé à l'aide d'un sédiment de référence (Yville-sur-Seine) dopé avec une gamme de différents polluants modèles. Les uns ont été choisis en raison de leur toxicité (diméthylbenzanthracène, PCB126) et les autres en raison de leur présence avérée dans les sédiments de Seine : (benzo(a)pyrène, phénanthrène, fluoranthène, PCB153, nonylphénol, Cd et Cu). Quelques résultats parmi les plus marquants sont présentés ici.

L'exposition d'embryons de médaka à des sédiments dopés au DMBA, PCB126 et nonylphénol (NP) accroît significativement la mortalité embryonnaire mais uniquement aux plus fortes concentrations testées (Figure 8A). Le PCB126 affecte la survie des larves (Figure 8B) à des concentrations intermédiaires (2,5 µg/g) alors que l'exposition au PCB153 n'a aucun effet sur la survie des embryons ou des larves (Figure 8B).

L'exposition des embryons de médaka à une forte concentration de DMBA, PCB126 et NP induit une diminution significative du succès d'éclosion (Figure 9A). Un retard d'éclosion (qui peut aller jusqu'à 7 jours) a été observé pour les embryons exposés au DMBA à des concentrations relativement

modérées (0,5 µg/g) ou au PCB126 pour des concentrations plus élevées (50 µg/g) (Figure 9B). Le PCB153 n'a en revanche aucun effet sur le développement embryonnaire.

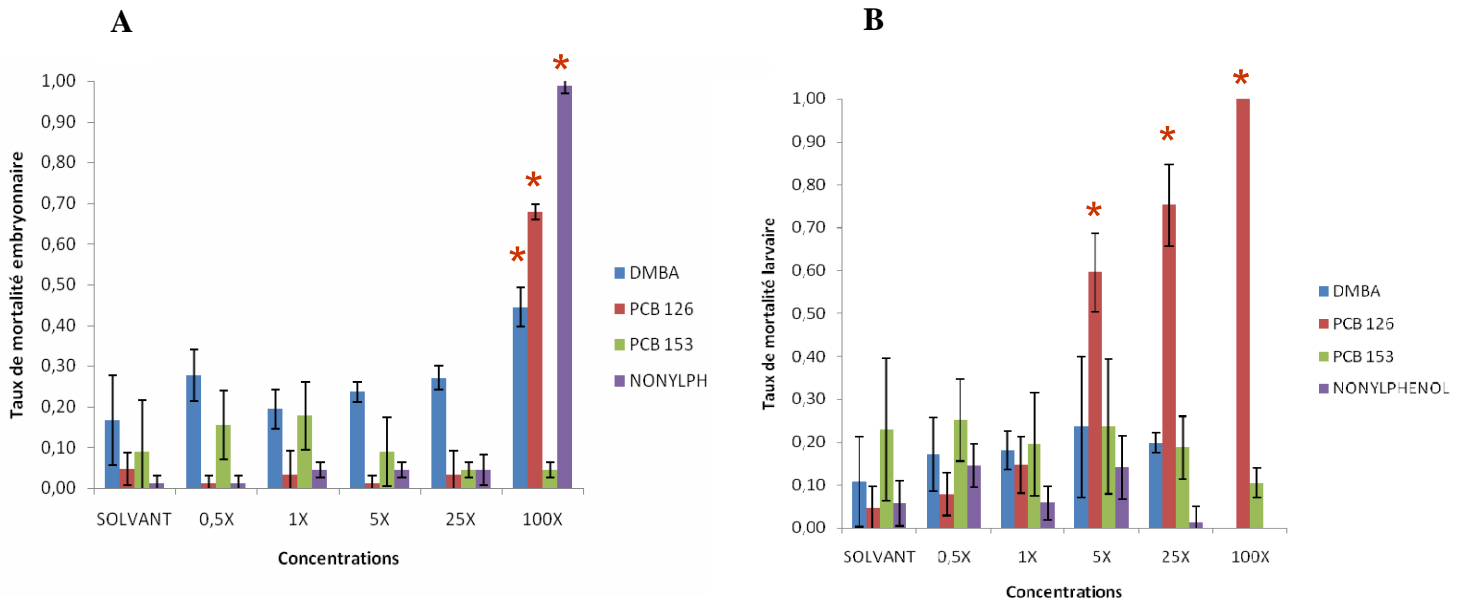


Figure 8 : Mortalité cumulée des embryons (A) et des larves (B) après exposition à des sédiments dopés avec différents polluants organiques (1X=500 ng/g sédiment sec)

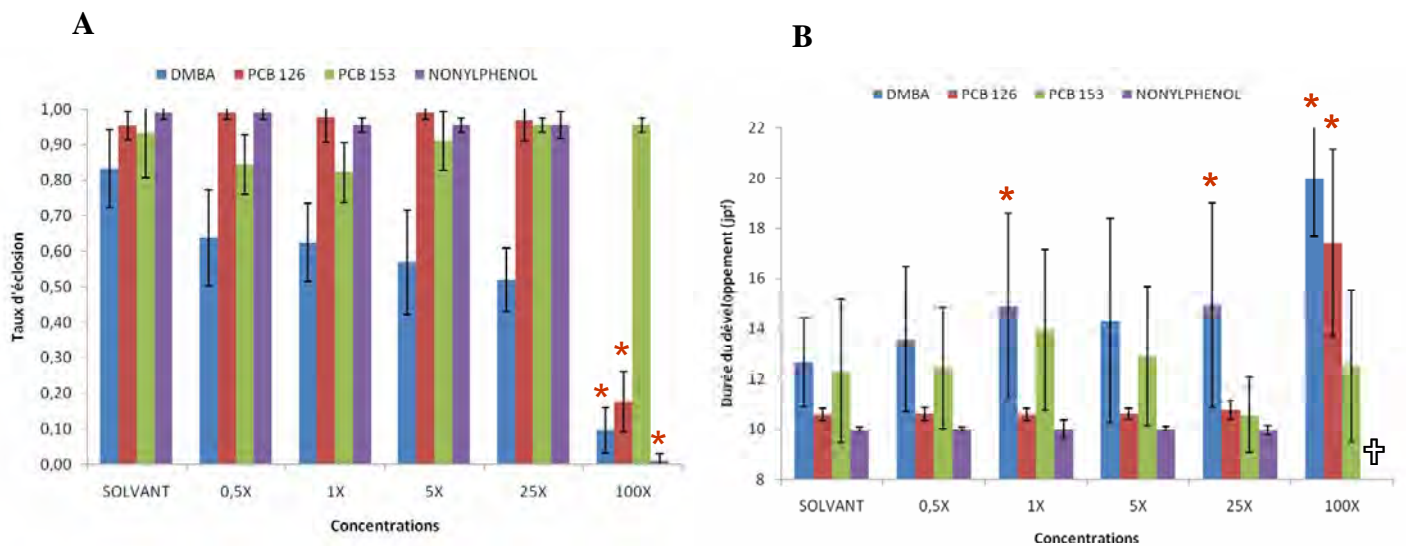


Figure 9 : Taux d'éclosion (A) et durée du développement embryonnaire(B) des embryons de médaka exposés à des sédiments dopés avec différents polluants organiques (1X= 500 ng/g sec de sédiment)

L'exposition des embryons de médaka à des concentrations modérées de DMBA (0,5 µg/g) et 5 fois plus élevées de PCB126 induit un retard de croissance (réduction de la taille des larves à l'éclosion) (Figure 10A) et un accroissement des malformations squelettiques et cardiaques (Figure 10B).

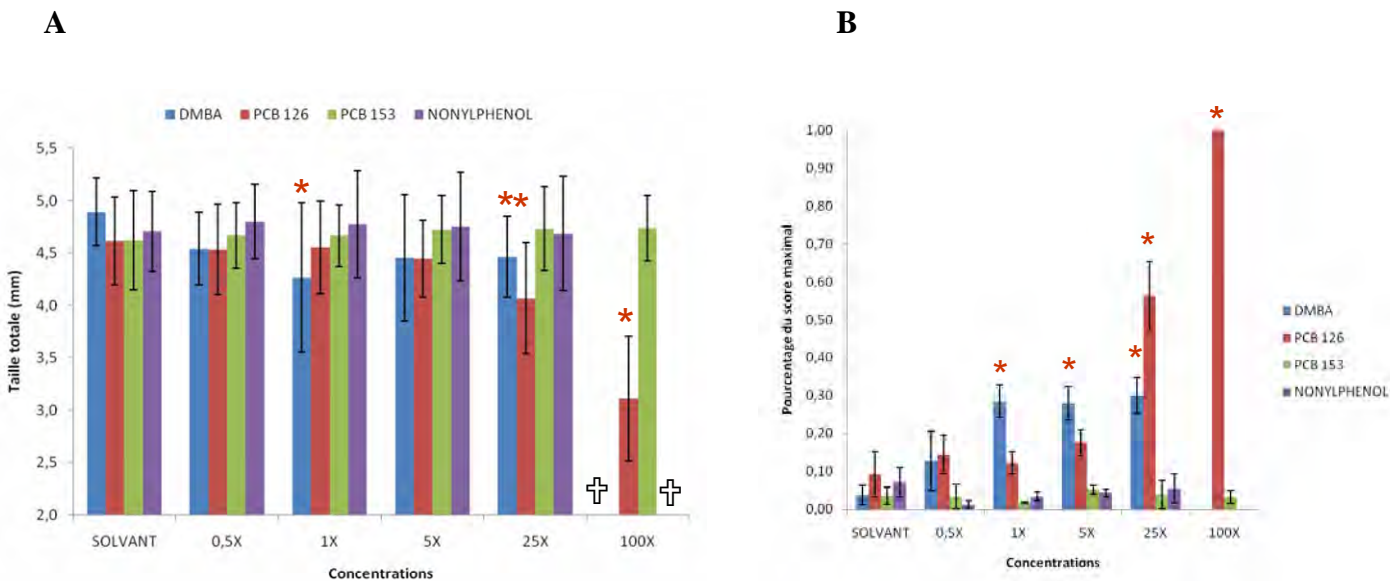
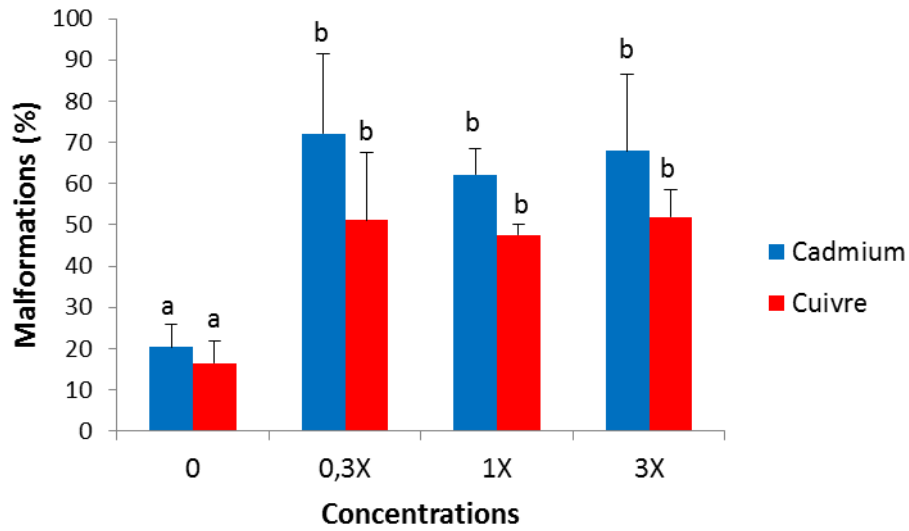


Figure 10 : Taille totale (A) et fréquence de malformations (B) chez les larves de médaka à l'éclosion après exposition au stade embryonnaire à des sédiments dopés avec différents polluants organiques (1X= 500 ng/g sec de sédiment)

Enfin l'exposition des embryons de médaka à des sédiments dopés au cuivre ( $\text{CuCl}_2$ ) ou au cadmium ( $\text{CdCl}_2$ ) n'a conduit à aucun accroissement significatif de la mortalité embryonnaire et larvaire, de la durée de développement, du taux d'éclosion et de la taille des larves à l'éclosion. Une augmentation significative de l'activité cardiaque a été observée dès 6,7µg/g de Cd mais pas pour le cuivre. En revanche une augmentation concomitante de la fréquence de malformations larvaires et du taux de dommages à l'ADN a été observée pour le Cu dès 8,5 µg/g et le Cd dès 1,9 µg/g (Figure 11).

Les seuils de réponse obtenus pour les différents composés testés ont été rassemblés dans le Tableau 1. Les premiers stades de développement de Médaka Japonais sont très sensibles au PCB126 et au DMBA avec des NOEL qui atteignent respectivement 0,04 et 0,09 µg/g, sensibles au fluoranthène (LOEC : 0,44 µg/g) au phénanthrène (LOEC 1,4 µg/g) et au cadmium (LOEC : 1,9µg/g), modérément sensibles au cuivre (LOEC : 8,5µg/g), au benzo(a)pyrène (LOEC : 22,4 µg/g) et au 4-nonylphénol (NOEC : 33,3µg/g) et peu sensibles au PCB153 (LOEC > 1,35 µg/g).

A



B

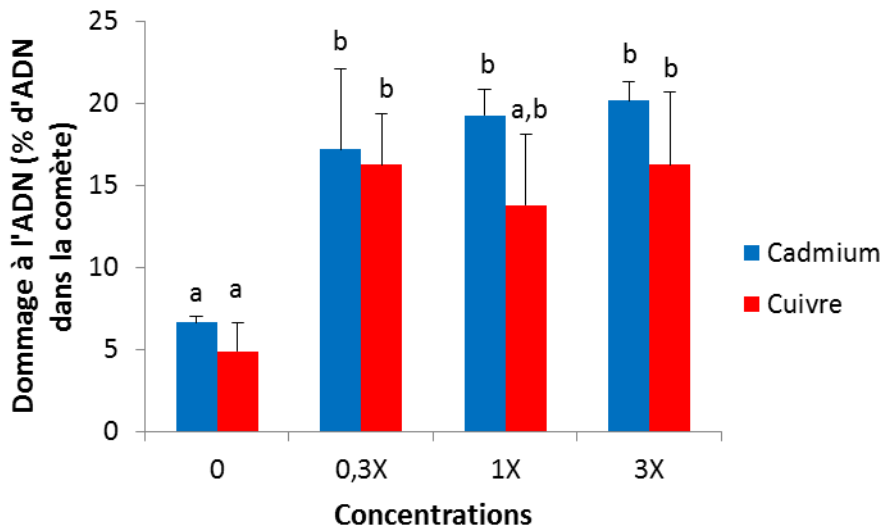


Figure 11 : Malformations (A) et dommages à l'ADN (B) chez les larves de médaka à l'éclosion après exposition au stade embryonnaire à des sédiments dopés avec du Cd ou du Cu (1X= 6,5 µg/g sec de sédiment)

Tableau 1 : Seuils de réponse (LOEC : Lowest Observed Effect Level) obtenus sur embryons et larves de Medaka Japonais pour différents polluants modèles (en µg/g de sédiment sec)

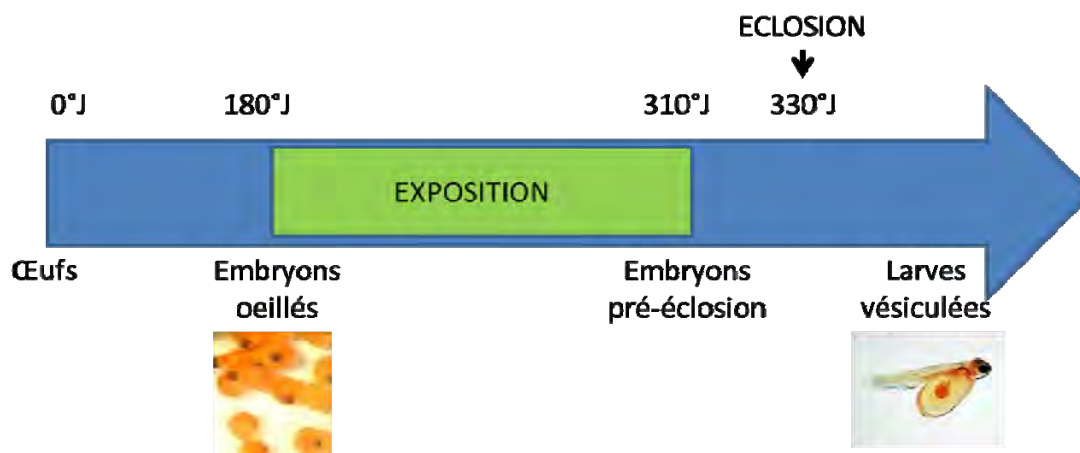
	Cu	Cd	NP	BaP	Phe	Fluo	DMBA	PCB126	PCB153
Concentrations testées µg/g	8.5-23.1	1.9-19.8	0.14-33.3	0.065-22.4	0.12-5.8	0.22-43.6	0.09-36	0.004-0.72	0.006-1.35
Mort. Embryon.	-	-	33.3	-	-	43.6	36	0.72	-
Mort. Larvaire	-	-	-	-	-	8.9	-	0.04	-
Durée dévelop.	-	-	-	-	-	-	0.85	0.72	-
Succès d'éclosion	-	-	33.3	-	-	43.6	6.1	0.72	-
Taille à l'éclosion	-	-	-	22.4	1.4	1.7	0.09	0.04	-
Malformations	8.5	1.9	-	22.4	1.4	1.7	0.15	0.18	-
Lésions de l'ADN	8.5	1.9	-	22.4	-	43.6	0.15	nd	-
Activité cardiaque	-	6.7	33.3	-	-	0.44	0.09	-	-

en rouge les LOEC les plus faibles obtenues pour chaque composé

### 3.1.2.2 Test embryo-larvaire truite arc-en-ciel

Le test de toxicité d'embryo-larvaire truite (ELT) a été développé au LPTC dans le cadre de la thèse de Floranne Le Bihanic. De nombreuses mises au point techniques ont été nécessaires pour d'une part assurer un développement et une éclosion optimales des embryons.

Les embryons œillé (180°J) de truite arc-en-ciel, *Oncorhynchus mykiss* ont été fournis par la station INRA de Sizun (29). Après examen et tri des embryons viables, 25 embryons par réplicat ont été déposés dans des cristallisoirs en verre contenant 12 g de sable dopé et 50mL d'eau de source aérée pendant 48h (pH= 8,2). L'expérience s'est déroulée pendant environ 13j à 10°C à l'obscurité. L'oxygène dissous a été relevé quotidiennement. A 310°J, soit 2 jours avant le début des éclosions, les œufs ont été transférés dans des boîtes de pétri en verre répartis dans 2 canaux contenant 10L d'eau de source en circuit fermé avec un débit d'environ 20L/h (Figure 12).



**Paramètres suivis : mortalité embryonnaire, mortalité larvaire, taux d'éclosion, durée du développement, activité cardiaque, croissance, malformations à l'éclosion, dommages à l'ADN**

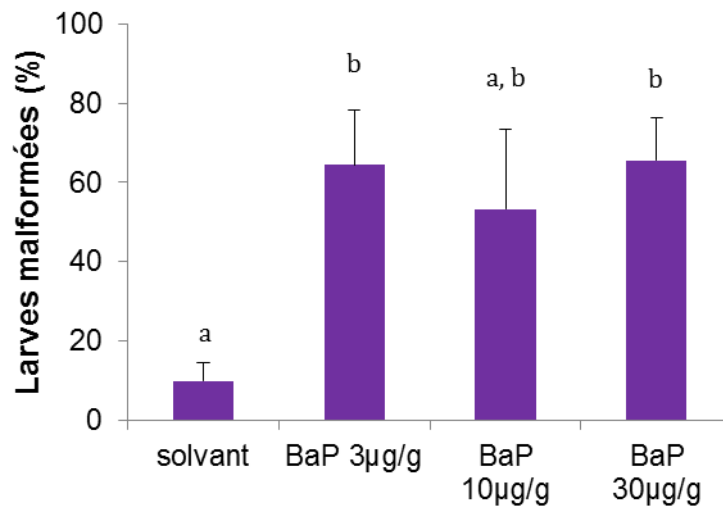
*Figure 12 : Mode opératoire pour le test embryo-larvaire truite (test ELT) pour la mesure de la toxicité de sédiments*

Le sable, de granulométrie 2-4mm (carrière Sibelco, 33) est lavé dans une solution à 1% de HCl. Les solutions stocks de benzo(a)pyrène et fluoranthène sont préparées dans l'isooctane. Pour chaque condition 45g de sédiment sont enrobés avec 90 mL de dichlorométhane et 600µL de solution d'enrobage en fluoranthène ou benzo(a)pyrène dans l'isooctane. Le solvant est évaporé à 45°C, 115 rpm, pendant 1h. Trois concentrations ont été testées pour chaque produit, 3, 10 et 30 µg/g de sédiment sec.

Les premiers résultats ne montrent pas d'augmentation significative de la mortalité embryonnaire et larvaire avec la concentration en fluoranthène ou en benzo(a)pyrène. De même, il n'a pas été observé de variation significative de la durée de développement. Une tendance mais non significative à la diminution du taux d'éclosion et de la longueur totale et de la longueur de la tête avec la concentration des deux composés. En revanche, la fréquence de malformations augmente de façon significative avec la concentration de fluoranthène et de BaP et ceci dès la plus faible concentration testée (3µg/g) (figure 13). Ces malformations correspondent principalement à des œdèmes et à des hémorragies.



A



B

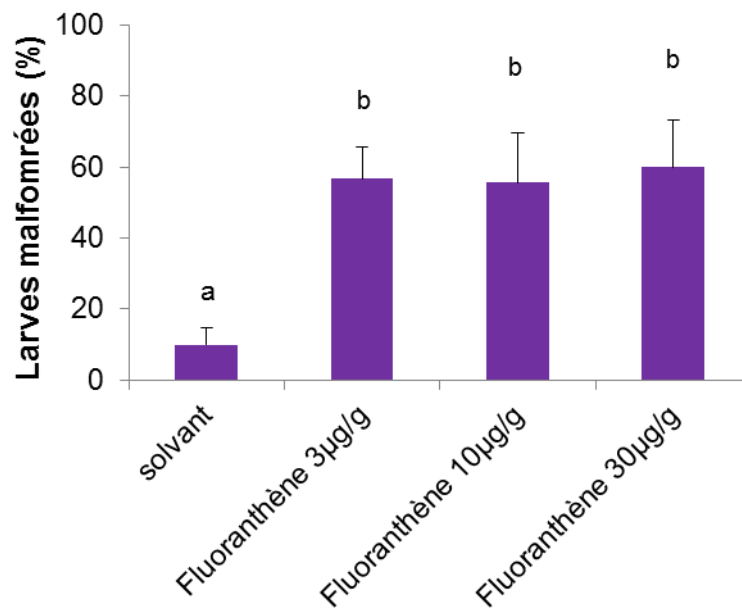


Figure 13 : Pourcentage de larves de truites malformées à l'éclosion après exposition des embryons pendant 13j à des sédiments dopés au BaP (A) ou au fluoranthène (B).

### 3.2 Définition de valeurs guides de toxicité pour les sédiments

Les concentrations seuils sans effet (NOEC) obtenues expérimentalement sur embryons de médaka et nauplius d'Eurythémora pour différents composés modèles ont été rassemblées dans le Tableau 2. Il apparaît globalement que les naupli d'*Eurythemora affinis* sont plus sensibles que les embryons et larves de médaka aux composés testés.

Tableau 2 : Valeurs seuils sans effet (NOEC) obtenus expérimentalement sur stades précoces de développement de médaka japonais et d'Eurytemora

Composé	<i>Eurytemora affinis</i> (nauplius)		Medaka Japonais (embryons et larves)	
	NOEC (µg/g sec)	Paramètre pris en compte	NOEC (µg/g sec)	Paramètre pris en compte
Cuivre	nd		< 8,5	Malformations , dommages à l'ADN
Cadmium	nd		< 1,9	Malformations, dommages à l'ADN
4-Nonylphénol	< 0,136	Survie	8,4	Succès d'éclosion
Benzo[a]pyrène	< 0,066	croissance	5,4	Malformations, croissance, dommage à l'ADN
Phénanthrène	< 0,120	survie	0,30	Malformations, croissance
Fluoranthène	nd		0,22	Activité cardiaque
DMBA	< 0,09	survie	< 0,09	Croissance, activité cardiaque
PCB126	< 0,004	croissance	0,008	Survie larvaire, croissance
PCB153	0,006	survie	> 1,35	-

nd : non déterminé

A partir de ces valeurs seuils de toxicité (NOEC) déterminées expérimentalement sur *E. affinis* et *O. latipes* et en appliquant les recommandations fixées par la réglementation 98/8/EC (Technical Guidance document on risk assessment, part II et Tableau 3) il a été possible de déterminer quelques valeurs guides pour les sédiments (PNECséd ou NQEséd).

$PNECséd = NOEC/\alpha$   $\alpha$  : facteur d'incertitude déterminé selon TGD (98/8/EC)

Tableau 3 : Détermination du facteur d'incertitude pour la dérivation d'une PNECséd (98/8/EC)

Données disponibles	Facteur d'extrapolation
1 test à long terme (NOEC ou CE10)	100
2 tests à long terme (NOEC ou CE10)*	50
3 tests à long terme (NOEC ou CE10)*	10

\* espèces à mode de vie ou mode d'alimentation différents

Les valeurs guides obtenues (Tableau 4) apparaissent très basses pour tous les composés mais plus particulièrement pour les PCB.

Tableau 4 : Valeurs guides pour les sédiments (PNECséd, NQEséd)

Composé	NQEséd (ng/g sédiment sec)
Cuivre	<85
Cadmium	<19
4-Nonylphénol	<2,7
Benzo[a]pyrène	<1,3
Phénanthrène	<2,4
Fluoranthène	2,2
Diméthylbenzantracène	<1,8
PCB126	0,08
PCB153	0,12

### 3.3 Analyse rétrospective de la contamination en Seine par l'analyse d'une carotte de sédiments

L'étude d'une carotte sédimentaire doit permettre un suivi des polluants piégés dans les dépôts profonds et ainsi de retracer l'histoire de la contamination.

#### 3.3.1 Prélèvement et découpe de la carotte

Avec pour objectif de mettre en évidence la toxicité résiduelle des sédiments profonds, une carotte de 110 cm a été prélevée en avril 2008 dans la darse des docks (Fig. 14), en collaboration avec le projet RHAPSODIS.

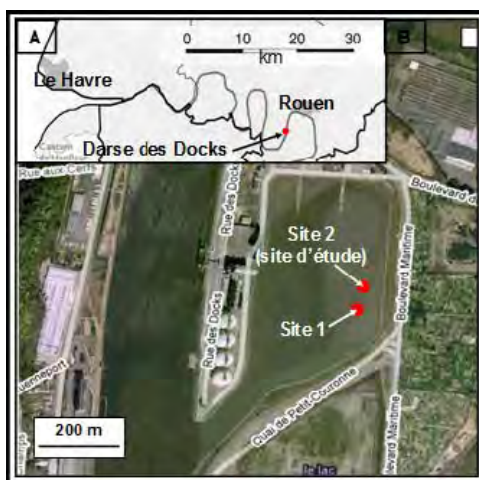


Figure 14 : Localisation de la zone de prélèvement de la carotte TOXSEINE (Vrel, 2009).

Cette carotte a été prélevée depuis la barge du service de lamanage du Grand Port Maritime de Rouen (GPMR) sur laquelle a été installée une plateforme de carottage afin de recevoir le carottier de l'UMR CNRS 6143 M2C (Fig. 15).



Figure 15 : Photographie de la campagne de carottage RHAPSODIS (photo : P. Lesueur, M2C).

En raison des contraintes du site (intertidal), la longueur de la carotte est limitée, toutefois, au regard des données RHAPSODIS, cette carotte représente environ 15 années d'enregistrement des dépôts dans la partie fluviale de l'estuaire de la Seine. La carotte prélevée a été rapidement ouverte dans le hangar mis à disposition par le GPMR. Cette carotte a été décrite, puis sous échantillonnée avec un pas de 5cm, sans prélever sur les bords du tube de carottage afin d'éviter les contaminations potentielles. Les sous échantillons ont été homogénéisés, mis dans des contenants compatibles avec les contraintes de chaque analyses puis transporter à 4°C jusqu'au laboratoire.

### 3.3.2 Caractérisation physico-chimique et profil sédimentaire

La granulométrie des échantillons a été mesurée à l'aide d'un micro-granulomètre laser Beckman Coulter © LS230 qui permet de travailler dans une gamme de 0,02 à 2000µm. Les fractions granulométriques ont été regroupées : Argiles (taille des particules < 2µm), silts (2 à 63µm) et sables (63 à 2000µm). L'analyse du Carbone organique (Corg) a été obtenue à l'aide d'un analyseur carbone : TOC Shimadzu© 5050A basé sur le principe de l'analyse de gaz de combustion par infrarouge non dispersif. Les teneurs en Carbone total (C), Hydrogène (H) et Azote (N) ont été déterminées par chromatographie en phase gazeuse avec une pyrolyse CHN micro-analyseur (Flash Série 2000, CHNS/O Analyseurs Thermo Scientific, IRCOF, France).

La granulométrie de la carotte TOXSEINE de la darse des docks présente une faible variabilité en fonction de la profondeur : les sédiments de cette carotte correspondent à une texture vaso-sableuse, associée à une forte lamination millimétrique. En moyenne, les teneurs en argiles, silts et sables de cette carotte sont respectivement de 4%, 66% et 30%. Toutefois, l'échantillon correspondant à la profondeur 5-10 cm présente une granulométrie plus grossière avec 51% de sable (Fig. 16).

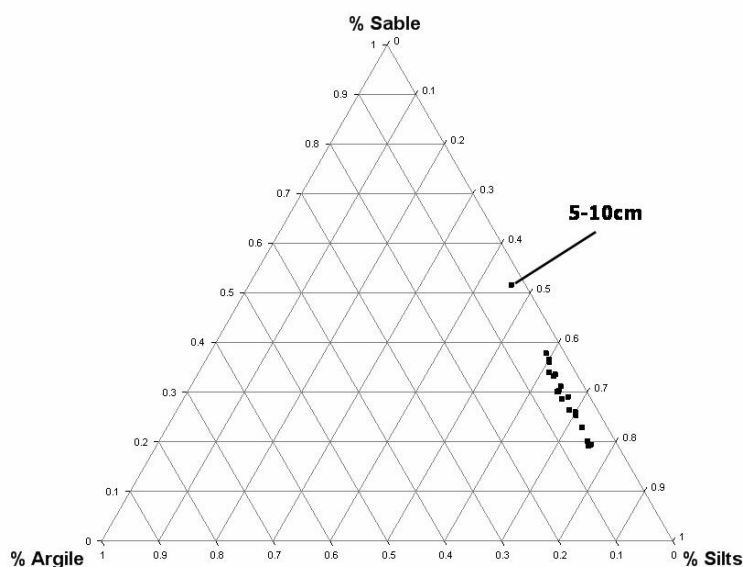


Figure 16 : Diagramme ternaire de la distribution des fractions granulométriques de la Carotte TOXSEINE

L'ensemble des données de caractérisation physico-chimique de la carotte TOXSEINE (granulométrie, %C, %N, %N, %C organique, teneur en eau et % CaCO<sub>3</sub>) a été reporté sur la figure 17. La teneur en eau a été calculée suivant la formule suivante (Gouleau, 1976):

$$W\% = \frac{\text{Masse de la fraction liquide}}{\text{Masse de la fraction solide}}$$

En estuaire de Seine, les variations de la teneur en eau des vases varie de 50% (vases « reliques » indurées) à 424% (échantillon de vase fluide de l'engainement ; Lesourd et al., 2004).

L'ensemble de ces données montre une faible variation des paramètres physico-chimiques de la carotte, à l'exception des données de teneur en eau qui présentent un profil décroissant en fonction de la profondeur.

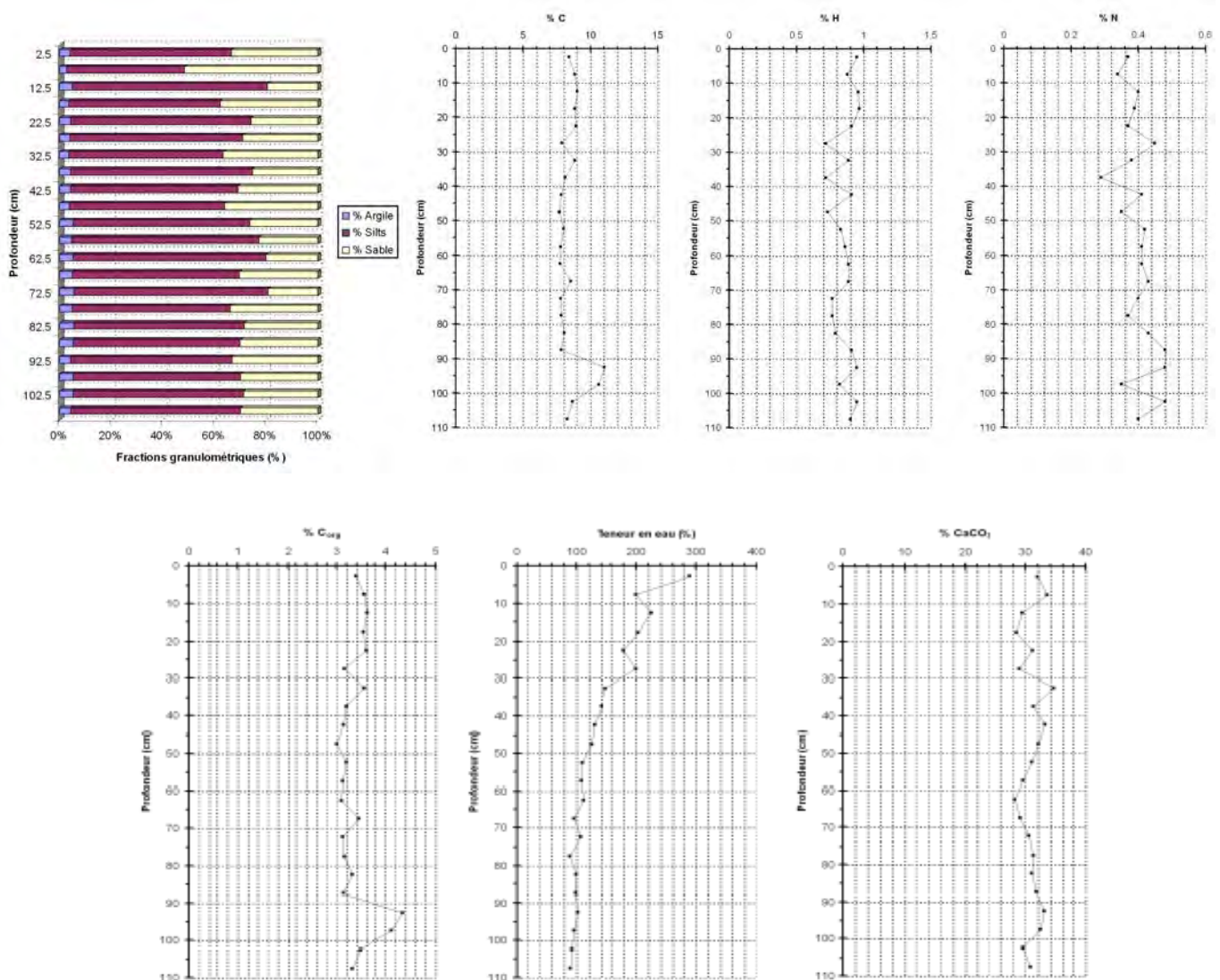


Figure 16 : Répartition des fractions granulométrique, du % de C, %h, %N, %C organique, teneur en eau et % de CaCO<sub>3</sub> dans la carotte TOXSEINE

### 3.3.3 Distribution des micropolluants

#### 3.3.3.1 Eléments traces métalliques

Les résultats des dosages de métaux totaux sont présentés dans la figure 17. Les profils de distribution en fonction de la profondeur sont assez proches d'un élément à l'autre avec une augmentation des concentrations à partir de - 50 cm. Ce site présente des teneurs en mercure largement supérieures à celle de références mentionnées par Thévenot et al (2002) dans le bassin de la Seine. Le profil du mercure en fonction de la profondeur permet de définir la présence de deux phases de dépôt sédimentaires distinctes, la couche supérieure présente une concentration moyenne de 0,50 mg.kg<sup>-1</sup> et les deux couches inférieures deux fois plus contaminées dont les teneurs évoluent progressivement de 0,50 à 0,91 mg.kg<sup>-1</sup>. Cette tendance est valable pour les autres métaux, ce constat laisse supposer que les sédiments récemment déposés sont moins contaminés et l'augmentation en profondeur des teneurs refléterait alors une diminution des apports en métaux dans la Seine.

Le niveau de la contamination des sédiments de la carotte a été évalué par le calcul de l'indice de géoaccumulation, cet indice a été introduit par Muller (1981) et utilisé dans de nombreuses études (Lesven et al 2009 ; Lourino-Cabana 2010).

l'Igeo est exprimé par la formule suivante :

$$I_{geo} = \frac{\log\left(\frac{C}{1.5 * F_g}\right)}{\log(2)}$$

Les concentrations des métaux dans les sédiments ont été comparés aux valeurs références du fond géochimique exprimées en mg.kg<sup>-1</sup> [Cu = 15, Pb = 20, Zn = 60, Cd = 0.22, Hg = 0.03 et Ni = 16] (Thévenot et al 2002) . Les résultats de calcul des indices sont regroupés dans le Tableau 5.

En général, les indices de géoaccumulation de la plupart des métaux sont faibles pour le niveau superficiel par comparaison au fond de la carotte. Ces valeurs montrent que la **carotte est fortement polluée pour le mercure** (Igeo > 4) particulièrement au fond. Le cuivre arrive en deuxième position, la pollution est modérée en surface (1 ≤ Igeo ≤ 2) et forte au fond de la carotte (Igeo > 2). Pour le plomb et le zinc, les valeurs d'Igeo sont comprises entre 1 et 2 indiquant que les sédiments sont modérément contaminés. Pour le nickel et le chrome, les sédiments sont peu contaminés (Igeo ~ 0). La pollution apparaît homogène en fonction de la profondeur pour le cadmium avec des valeurs quasi constantes (Igeo ~ 1,5), indiquant une contamination modérée en Cd.

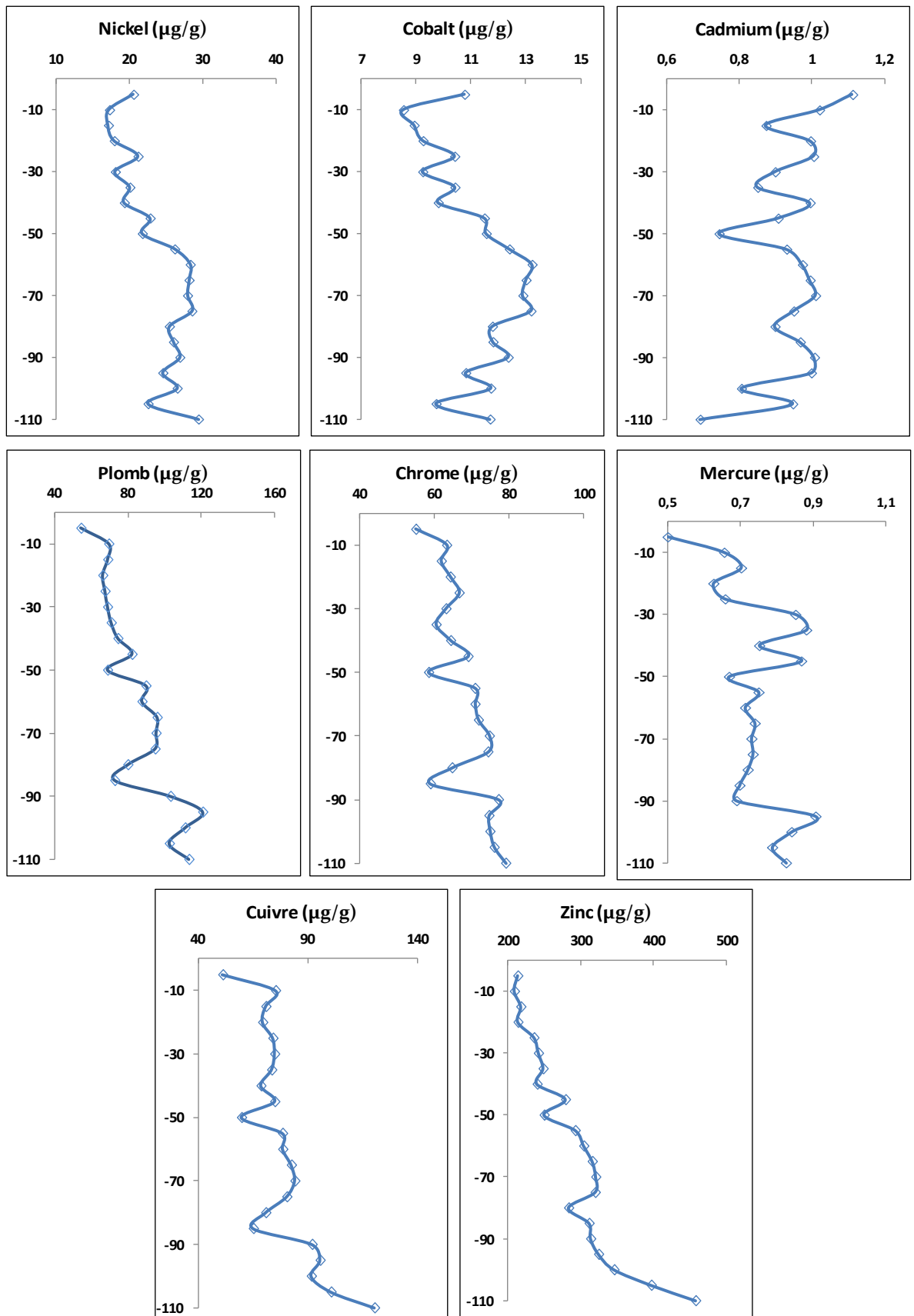


Figure 17 : Evolution des teneurs en éléments traces ( $\mu\text{g/g}$ ) en fonction de la profondeur (cm) dans la carotte prélevée dans le bassin des Docks du port de Rouen.



Tableau 5 : Valeurs de l'indice de géoaccumulation (Igeo) des sédiments de la carotte prélevée dans le bassin de Docks du port de Rouen

Profondeur (cm)	Cr	Cu	Pb	Zn	Hg	Cd	Ni
2,5	-0,12	1,18	0,85	0,98	3,48	1,75	-0,23
7,5	0,08	1,74	1,21	1,42	3,87	1,63	-0,48
12,5	0,04	1,65	1,20	1,31	3,97	1,40	-0,49
17,5	0,10	1,62	1,14	1,31	3,80	1,59	-0,42
22,5	0,15	1,72	1,16	1,37	3,87	1,60	-0,18
27,5	0,07	1,73	1,19	1,30	4,24	1,44	-0,41
32,5	0,01	1,71	1,23	1,29	4,29	1,36	-0,26
37,5	0,10	1,61	1,31	1,21	4,06	1,59	-0,32
42,5	0,20	1,73	1,45	1,35	4,27	1,46	-0,08
47,5	-0,04	1,41	1,19	0,98	3,90	1,17	-0,14
52,5	0,24	1,80	1,58	1,46	4,06	1,49	0,12
57,5	0,24	1,80	1,54	1,45	3,99	1,56	0,12
62,5	0,26	1,87	1,67	1,52	4,04	1,59	-0,61
67,5	0,32	1,90	1,66	1,54	4,02	1,61	0,24
72,5	0,31	1,84	1,66	1,54	4,03	1,52	0,25
77,5	0,11	1,65	1,41	1,30	4,00	1,44	0,08
82,5	-0,03	1,53	1,27	1,26	3,96	1,55	0,11
87,5	0,36	2,03	1,78	1,68	3,94	1,61	0,16
92,5	0,32	2,09	2,01	1,72	4,33	1,60	0,03
97,5	0,32	2,02	1,89	1,68	4,23	1,29	0,14
102,5	0,34	2,16	1,77	1,72	4,13	1,52	-0,09
107,5	0,40	2,42	1,91	1,88	4,20	1,07	0,29

### 3.3.3.2 Micropolluants organiques

Les principaux polluants organiques persistants (HAP, PCB, pesticides organochlorés et PBDE) ont été dosés dans la carotte de sédiments. Les analyses des micropolluants organiques ont été réalisées sur des échantillons lyophilisés et tamisés à 2 mm. Les échantillons ont été extraits sous champ micro-ondes (MASE) dans du dichlorométhane. Ces extraits ont alors été purifiés par chromatographie d'adsorption tout d'abord sur colonne d'alumine contenant du cuivre activé en utilisant du dichlorométhane, puis sur colonne de silice en utilisant un mélange pentane/dichlorométhane (65/35 ; v/v), après élution de la fraction des hydrocarbures aliphatiques. Les extraits ont ensuite été aliquotés en 2. La détermination des HAP a été réalisée sur une des aliquotes par chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse (GC-MS). L'autre aliquote, utilisée pour la caractérisation des composés organohalogénés (PCB, pesticides organochlorés et PBDE), a été purifiée sur colonne de silice acidifiée en utilisant un mélange pentane/dichlorométhane (90/10 ; v/v). L'analyse des PCB, pesticides organochlorés (OCP) et PBDE a été réalisée par chromatographie en phase gazeuse couplée à une micro-détection à capture d'électrons

(GC- $\mu$ ECD). Les concentrations des micropolluants organiques dans les sédiments ont été exprimées en ng/g de poids sec (ps).

Les différents composés organiques suivis dans chaque classe sont :

- pour les HAP : naphthalène, acénaphthylène, acénaphthène, fluorène, phénanthrène, anthracène, fluoranthène, pyrène, benzo(a)anthracène, chrysène + triphenylène, benzo(b)fluoranthène + benzo(k)fluoranthène + benzo(j)fluoranthène, benzo(e)pyrène, benzo(a)pyrène, pérylène, indéno(1,2,3-cd)pyrène, dibenzo(ah)anthracène + dibenzo(ah)anthracène, benzo(ghi)pérylène ;
- pour les PCB : les congénères CB 8, CB 187, CB 18, CB 128, CB 29, CB 200, CB 50 + CB 28, CB 180, CB 52, CB 170, CB 104, CB 195, CB 44, CB 206, CB 66, CB 209, CB 101, CB 87, CB 154 + CB77, CB 118, CB 188, CB 153, CB 105, CB 138, CB 126 ;
- pour les PBDE : les congénères BDE 47, BDE 119, BDE 99, BDE 153 ;
- pour les pesticides organochlorés : hexachlorobenzène (HCB), lindane ( $\gamma$ -HCH), heptachlore, heptachlore époxyde, 2,4'-DDE, cis-chlordane, trans-nonachlore, 4,4'-DDE + dieldrine, 2,4'-DDD, 4,4'-DDD, 2,4'-DDT, 4,4'-DDT, mirex.

**De façon générale, on observe pour les HAP, les OCP (pesticides organochlorés) et les PCB des teneurs relativement élevées et une tendance à l'augmentation des concentrations avec la profondeur** (Figures 18, 19, 20). Cette tendance est particulièrement nette pour les pesticides organochlorés, avec des concentrations variant d'environ 15 à 30 ng/g ps le long de la carotte (Figure 20, en vert). En revanche, **les teneurs en PBDE restent relativement faibles et constantes dans l'ensemble de la colonne sédimentaire** (4 – 7 ng/g ps) (Figure 20, en orange).

Pour les PCB, l'évolution des concentrations avec la profondeur est légèrement différente ; si les concentrations semblent relativement constantes dans les couches les plus profondes (40 – 110 cm), elles présentent une **tendance marquée à la diminution sur les 40 premiers cm de sédiment** (Figure 19). Cette évolution pourrait refléter une diminution des apports depuis un certain nombre d'années. Les proportions de chaque congénère restent constantes dans les différentes couches sédimentaires (10 – 20% de la somme des PCB), avec une légère prédominance des congénères CB153 et CB138 (hexachlorés).

L'empreinte des HAP dans les sédiments peut également être étudiée selon les différentes classes d'aromaticité en déterminant la part relative des composés di, tri, tétra, penta et hexa par rapport à la somme des HAP suivis. Le profil de contamination par les HAP est logiquement caractérisé par une prédominance des composés de haut poids moléculaire. De plus, ces proportions par classe d'aromaticité demeurent constantes le long de la carotte sédimentaire ; les HAP tri-aromatiques représentent 9 – 14% des HAP totaux, les tétra- et penta-aromatiques 33 – 40% (pour chacune des classes) et les hexa-aromatiques 11 – 14%. La détermination de rapports caractéristiques entre isomères structuraux tels que le phénanthrène/anthracène (Phe/A), le fluoranthène/pyrène (Fluo/Pyr), le chrysène/benzo[a]anthracène (Chrys/BaA) et le benzo[e]pyrène/benzo[a]pyrène (BeP/BaP) permet d'identifier l'origine pétrogénique ou pyrolytique de la contamination par les HAP. Les rapports obtenus, à savoir Phe/A compris entre 0,6 et 2, Fluo/Pyr < 1, BeP/BaP compris entre 0,9 et 1, montrent une **contamination par les HAP principalement d'origine pyrolytique**. Ces indices moléculaires demeurent également constants le long de la carotte sédimentaire, y compris dans la couche superficielle.

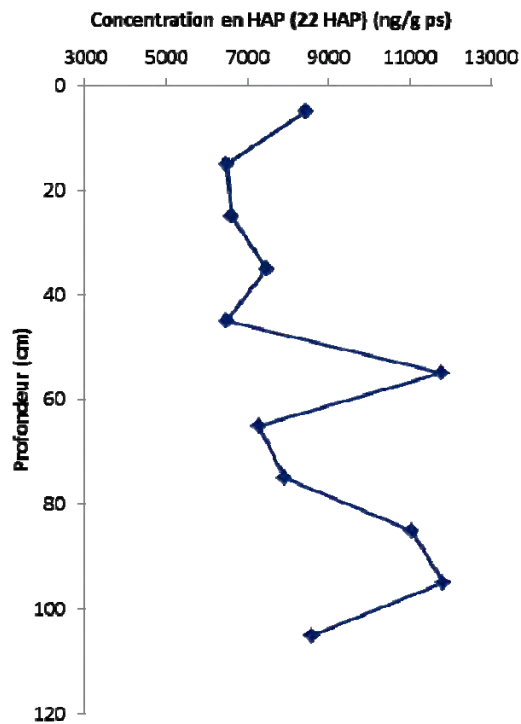


Figure 18 : Profil des concentrations en HAP totaux (22 composés) en fonction de la profondeur dans une carotte de sédiment prélevée dans le port de Rouen en 2008.

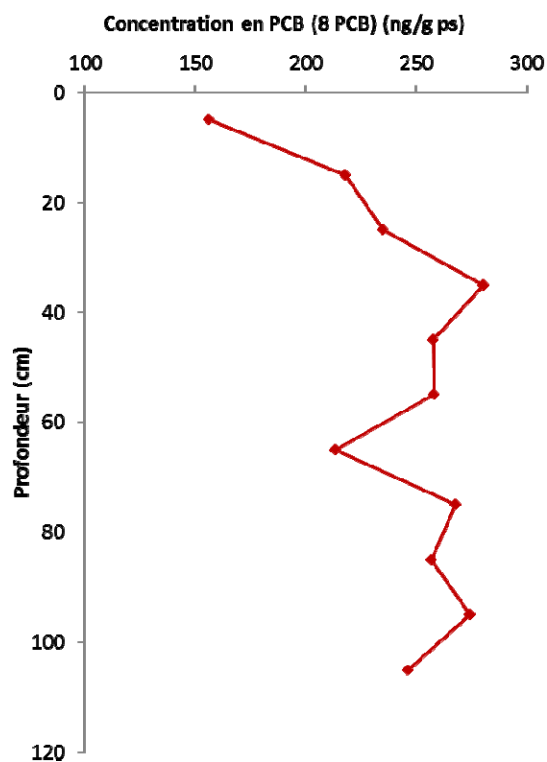


Figure 19 : Profil des concentrations en PCB totaux (8 congénères) en fonction de la profondeur dans une carotte de sédiment prélevée dans le port de Rouen en 2008.

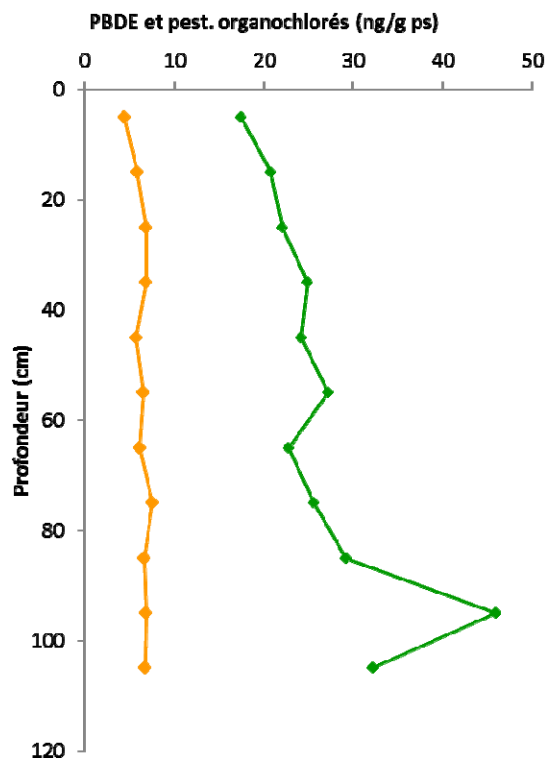


Figure 20 : Profil des concentrations en PBDE (4 congénères) (en orange) et en pesticides organochlorés (12 composés) (en vert) en fonction de la profondeur dans une carotte de sédiment prélevée dans le port de Rouen en 2008.

### 3.3.4 Evaluation de la toxicité des sédiments de la carotte des docks

La toxicité des différents tronçons de carotte a été mesurée sur extrait organique à l'exception du potentiel cytotoxique (test Microtox®) mesuré sur extrait aqueux. Un extrait organique total a été préparé sur chacun des 22 tronçons de carotte après lyophilisation des sédiments. Cet extrait a été réalisé par la méthode ASE (Accelerated solvent extraction) en utilisant comme solvant un mélange heptane-acétone 50:50 v:v. Les extraits ont été reconcentrés (X50) puis resolubilisés dans du diméthylsulfoxyde (DMSO) ou du méthanol (test YES) avant caractérisation toxicologique.

#### 3.3.4.1 Modélisation de la biodisponibilité des métaux

La notion de biodisponibilité des métaux peut être abordée grâce à la détermination de l'indice de toxicité (rapport SEM/AVS : Simultaneous Extracted Metals/Acid Volatil Sulfide), qui donne une estimation de la toxicité potentielle des sédiments. Cet indice traduit la capacité des sédiments à piéger les métaux traces au travers des phases sulfures, limitant ainsi leur mobilité et leur bioaccumulation par les organismes vivants. L'évolution du rapport SEM/AVS (sous forme logarithmique) en fonction de la profondeur (Figure 21) indique une augmentation de la toxicité dans les couches du fond de la carotte, en effet les sédiments du fond sont enrichis en contaminants métalliques et appauvris en

sulfures. Ce rapport AVS/SEM devient un outil de prédiction sur la disponibilité des métaux traces en cas de remobilisation physique du sédiment.

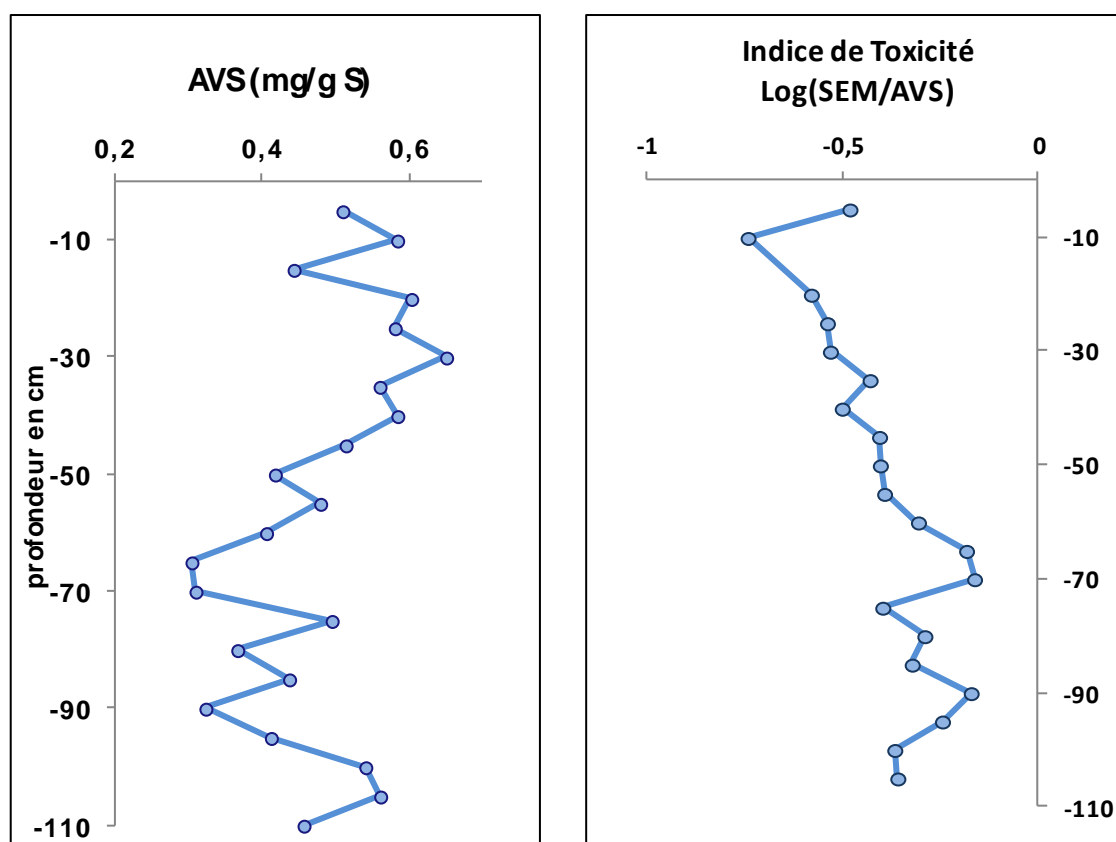


Figure 21 : Evolution des sulfures volatiles AVS (mg/g S) et de l'indice de toxicité sédiments de la carotte prélevé dans le bassin de Docks du port de Rouen

#### 3.3.4.2 Potentiel cytotoxique : test Microtox®

L'évaluation de la toxicité des sédiments a été réalisée par le test Microtox® en utilisant le protocole dit « 100% test protocole » sur extrait aqueux de sédiment (Environnement Canada, rapport SPE1/RM/24, 1992). Cet essai permet l'évaluation du potentiel cytotoxique (vis-à-vis de *Vibrio fischeri*) des substances présentes dans des sédiments et susceptibles de passer dans la phase aqueuse. Pour les échantillons testés, les essais ont été réalisés après extraction en phase aqueuse, aux concentrations 12.5, 25, 50 et 100 % avec un temps de contact de 5, 15 et 30 minutes. Les données ont été traitées par un logiciel « GraphPad Prism5 » pour obtenir les courbes doses-réponses pour calculer les CE50. Les résultats des essais sont présentés dans le Tableau 7, le pourcentage d'inhibition est corrélé ( $R= 0,6$   $0,3$  et  $0,5$  pour le Pb, le Zn et le Cu respectivement) avec les concentrations en métaux trouvés dans les sédiments, une augmentation du pourcentage d'inhibition de *Vibrio Fisheri* des sédiments du fond est à relier à l'indice de toxicité (Figure 21 et Tableau 7). En effet, le rapport SEM/AVS augmente dans les couches les plus profondes de la carotte.

Tableau 7 : Résultats des essais Microtox effectués sur les sédiments de la carotte du bassin des Docks du port de Rouen (2008)

Profondeur	% d'inhibition de <i>Vibrio fisheri</i> à la plus forte Concentration (200mg/ml)	
		CE5030mn
0-5 cm	21.25 %	> 200 mg de sed humide/ml
30-35 cm	17.1%	> 200 mg de sed humide/ml
45-50 cm	Pas d'inhibition	> 200 mg de sed humide/ml
60-65 cm	25.2 %	> 200 mg de sed humide/ml
70-75 cm	Pas d'inhibition	> 200 mg de sed humide/ml
90-95 cm	24 %	> 200 mg de sed humide/ml
105-110 cm	28.45 %	> 200 mg de sed humide/ml

### 3.3.4.3 Potentiel génotoxique : SOS Chromotest

Cette analyse a été réalisée sur des extraits organiques de sédiment (extraction ASE avec mélange heptane-acétone et dilution de l'extrait dans du DMSO). Le potentiel génotoxique des extraits a été mesuré à l'aide du SOS Chromotest (Quillardet et al., 1982) avec et sans ajout d'une fraction microsomale S9 et ceci à deux concentrations d'extrait (1 et 2 mg sec équivalent sédiment). Ces analyses ont été effectuées par la société TOXEM (Le Havre). Les réponses obtenues en SOS Chromotest avec ou sans ajout de S9 (Figure 22) ont permis de mettre en évidence une **forte activité génotoxique pour les couches sédimentaires ensevelies entre 65 et 80 cm de profondeur**. Ces analyses ont également permis de détecter la présence de composés pro-génotoxiques à la fois au niveau des dépôts les plus récents (5 cm premiers cm de profondeur). Une cytotoxicité élevée a été observée pour la plupart des extraits organiques.

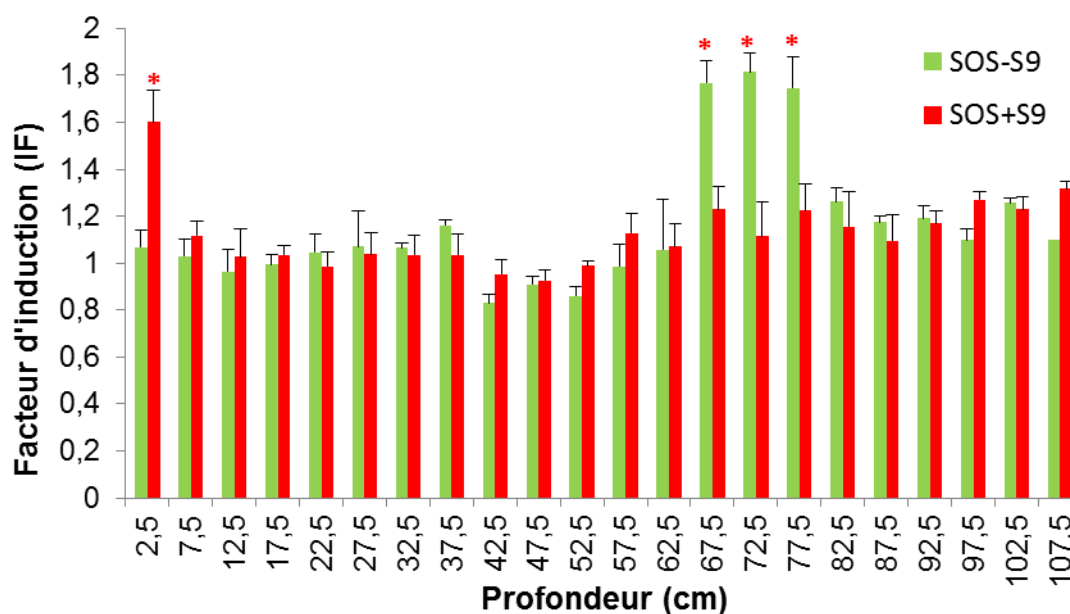


Figure 22 : Potentiel génotoxique (avec ou sans ajout de S9) des extraits organiques de différents tronçons de carotte sédimentaire. 2mg équivalent sédiment sec ont été testés par essai.

### 3.3.4.4 Potentiel œstrogénique : test YES

L'activité œstrogénique des extraits organiques de sédiment a été déterminée par le test YES (yeast estrogen screen) sur extrait organique de sédiment (extraction ASE avec mélange heptane-acétone et dilution de l'extrait dans du méthanol). Ce bioessai a été validé pour la détection d'un large panel d'agonistes des récepteurs à l'œstradiol (E2) ou à la testostérone (Routledge et Sumpter, 1996 ; 1997).

Les extraits ainsi que les blancs ont été dilués en cascade, ajoutés dans une microplaque et laissés quelques minutes à température ambiante pour que l'éthanol s'évapore. Une gamme de concentrations d'E2 a été utilisée comme control positif. Les levures et le milieu de culture contenant du chlorophénol  $\beta$ -D-galactopyranoside (CRPG) ont été ajoutés dans chaque puits et la plaque mise à incuber pendant 3 à 5 jours. L'absorbance de chacun des échantillons a été mesurée à 540 nm, corrigée par rapport aux témoins et comparée à la courbe étalon. L'œstrogénicité mesurée a ainsi été exprimée en équivalent œstradiol (E2Eq). En accord avec les mesures publiées, la valeur moyenne effective pour l'E2 était d'environ 100 pM. L'œstrogénicité totale de chaque échantillon a alors été rapportée par unité de volume d'échantillon.

Les extraits méthanoliques des sédiments ont fait l'objet d'une étude de la présence de composés agonistes ou antagonistes des récepteurs à l'œstradiol. Cependant une forte toxicité des extraits a entraîné une forte mortalité des levures. Les doses létales ont été obtenues pour des quantités de toxiques associés à moins d'un microlitre d'extraits (Tableau 8). La plus forte cytotoxicité a été observée pour l'extrait n°10 (50 cm de profondeur). L'activité œstrogénique des extraits est de l'ordre de 100 pM d'équivalent E2 par  $\mu$ L. L'activité la plus forte est retrouvée dans l'extrait de carotte n°10 et une certaine tendance à décroître est observée pour les autres extraits. Il est à noter que la toxicité mesurée pour certains extraits est de nature à entraîner une sous-estimation de l'activité œstrogénique puisqu'il est difficile d'évaluer dans quelle mesure celle-ci est affectée par la toxicité des extraits (l'effet n'est pas léthal mais pourrait affecter certaines activités cellulaires).

*Tableau 8 : Toxicité et activité œstrogénique des extraits méthanoliques des sédiments observés sur levures Saccharomyces cerevisiae. L'absence de croissance des levures dans les puits a été mesurée par absorbance à 620 nm. L'activité œstrogénique est exprimée en équivalent œstradiol par  $\mu$ L d'extraits de sédiment.*

Sites	Profondeur (cm)	CL50 (nL/mL)	Activité œstrogénique des extraits (nME2Eq/ $\mu$ L)
Extrait 10	50	234	0,4 ( $\pm$ 0,05)
Extrait 11	55	469	0,1 ( $\pm$ 0,05)
Extrait 12	60	Pas de tox	0,075 ( $\pm$ 0,005)
Extrait 13	65	Pas de tox	0,1 ( $\pm$ 0,002)
Extrait 14	70	Pas de tox	< L.D.

< L.D. : en dessous de la limite de détection

### 3.3.4.5 Potentiel neurotoxique : test d'inhibition activité AChE

L'AChE a été purifiée par chromatographie d'affinité à partir d'échantillons triés d'*Eurytemora affinis* frais (Forget et al, 2002). Le rendement de purification a été de 80% et permet d'obtenir un extrait d'acétylcholinestérase à forte activité enzymatique de 15 à 20 DO/ml.

Les analyses ont été réalisées sur extrait organique de sédiment. Lors des essais réalisés à 4 °C, 50µl d'AChE purifiée est mis en contact avec 5 µl d'extrait, le temps d'exposition est de 30 minutes, puis on effectue une mesure de l'activité enzymatique de l'AChE par la méthode d'Ellman (1961) adapté à la lecture en microplaque (Forget et al, 2003).

Les premiers résultats ont révélé une neurotoxicité très élevée des différents extraits organiques, une dilution importante de ces extraits est nécessaire pour pouvoir évaluer leur potentiel neurotoxique (au 100<sup>ième</sup>). La figure 23 présente le potentiel neurotoxique des extraits organiques des différents tronçons de la carotte Rhapsodis. Le profil de distribution de la neurotoxicité montre des valeurs plus élevées pour les tronçons 2 à 13 (10 à 65 cm) dans la partie supérieure de la carotte, avec des inhibitions de l'AChE proche des 50%.

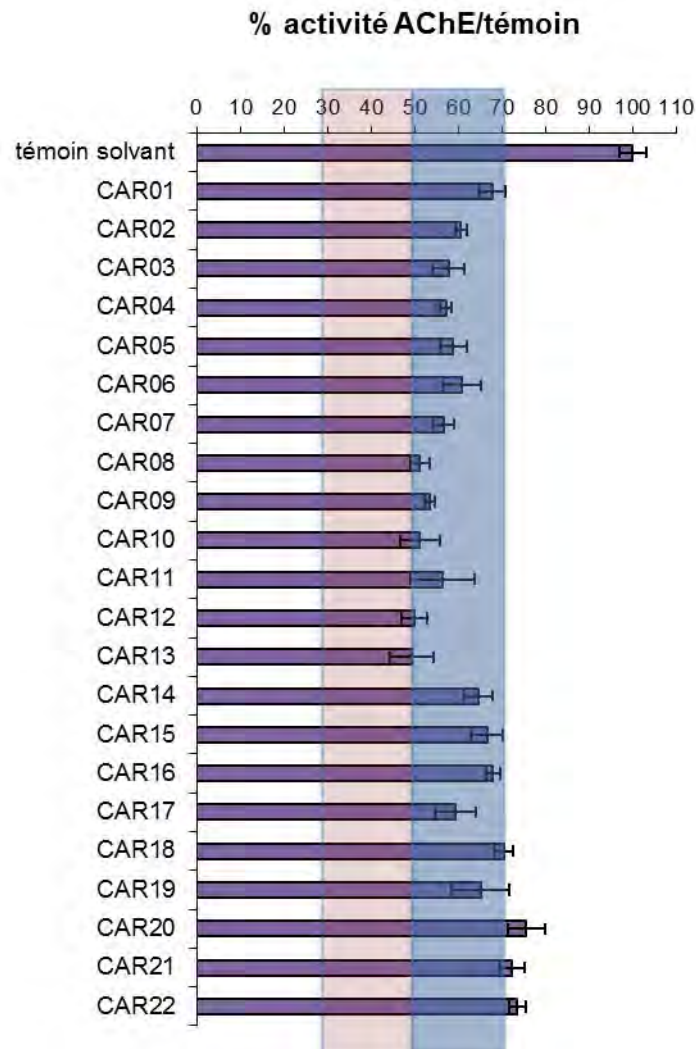


Figure 23 : Activité AChE mesurée in vitro après une exposition de 30 minutes aux différents extraits organiques de la carotte Rhapsodis, en ordonnée figure le % d'activité AChE d'*Eurytemora affinis* par rapport au contrôle et en abscisse les différents tronçons de la carotte.



### 3.4 Analyse des sédiments superficiels

#### 3.4.1 Prélèvement et conditionnement

Afin de cartographier la toxicité des sédiments de surface de l'estuaire de la Seine, des échantillons de sédiments cohésifs ont été prélevés en surface sur 7 sites répartis le long de l'estuaire de la Seine (Fig. 1) : en amont du barrage de Poses (POS), Oissel (OIS), la Bouille (LB), Duclair (DUC), Caudebec (CAU), Quillebeuf (QUI) et la vasière Nord à proximité du pont de Normandie (PN). Pour prendre en compte les éventuelles variations temporelles de la couverture sédimentaire et des conditions physico-chimiques, 4 prélèvements ont été effectués au cours de l'année 2009 dans des conditions hydrodynamiques contrastées (Tableau 9).

Tableau 9 : Conditions hydrodynamique des dates de prélèvement des sédiments de surface des campagnes TOXSEINE.

Date	Débit ( $\text{m}^3 \cdot \text{s}^{-1}$ )	Coefficient de marée
12/02/09	786	108
25/05/09	296	95
28/08/09	173	43
07/12/09	318	82

Sur l'ensemble des sites, les prélèvements ont été effectués à marée basse au cours de la même journée, à l'exception du prélèvement du 28/08/09 qui a été effectué sur deux jours. Deux équipes de prélèvement ont été nécessaires en raison des contraintes liées à la marée. L'une étant chargée des prélèvements en aval de l'estuaire (PN, QUI, CAU), l'autre étant en charge de l'amont (DUC, LB, OIS et POS). Les prélèvements ont été effectués à marée basse sur les bords de Seine systématiquement en respectant une zone de prélèvement définie. L'échantillonnage au site de Poses (immédiatement en amont du barrage) a nécessité l'utilisation d'une benne de type Eckman, car le site est systématiquement ennoyé. Les sédiments ont été conditionnés, en respectant les contraintes analytiques, puis conservés à 4°C jusqu'à leur stockage au laboratoire.

#### 3.4.2 Caractéristiques physico-chimiques

La granulométrie des échantillons de surface est présentée sur la figure 24. Les fractions granulométriques identifiées sont typiques de celles observées en Seine : 10, 45, 80, 200  $\mu\text{m}$ . D'un point de vue spatial, les sédiments les plus grossiers sont observés sur le site de Oissel, avec une proportion de la fraction à 200  $\mu\text{m}$  plus représentées que sur les autres sites.

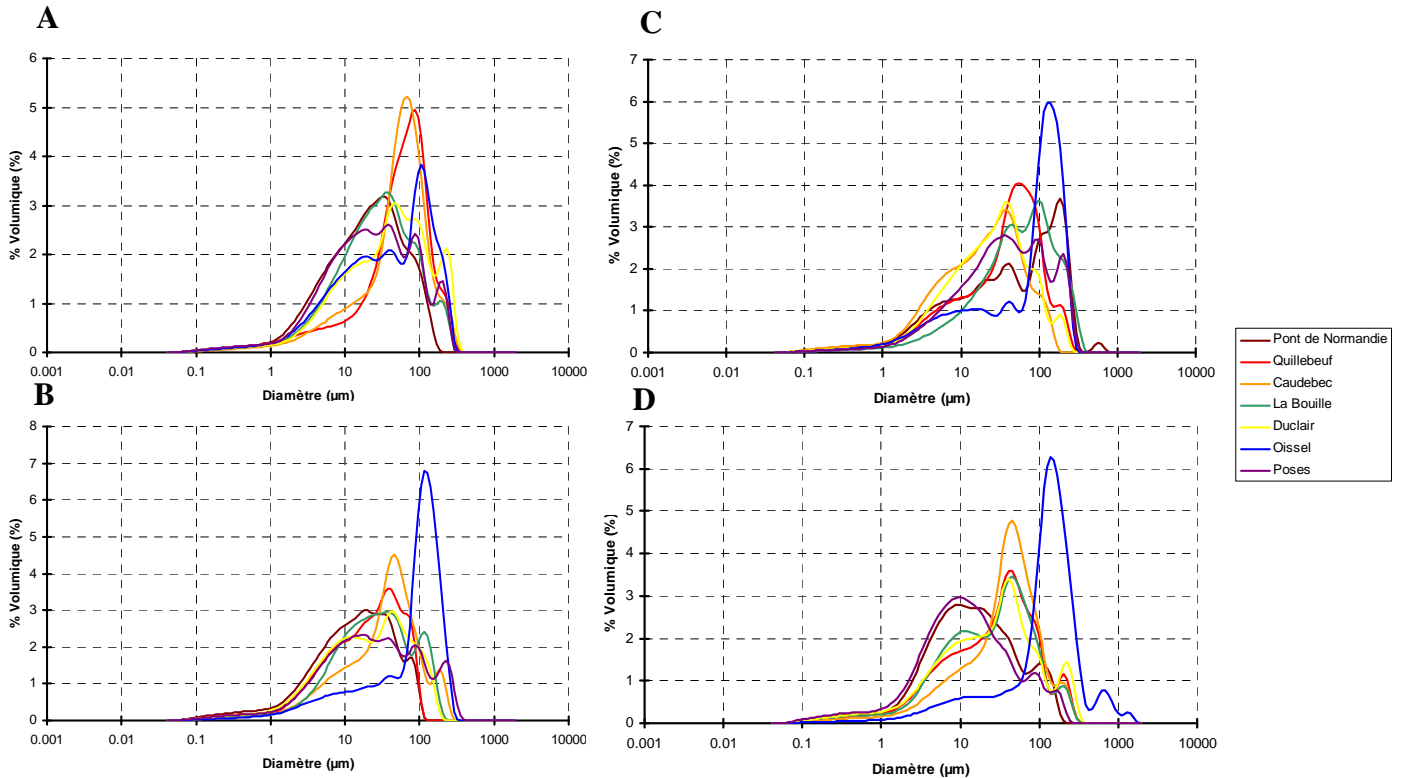


Figure 24 : Distribution granulométrique des échantillons de surface de l'estuaire de la Seine a. Février 2009 ; b. Mai 2009 ; c. Septembre 2009 et d. Décembre 2009.

La représentation des échantillons au sein d'un diagramme ternaire : % Argile, % silts et % sable permet de mieux rendre compte de ces variations (Fig. 25). Quel que soit le site, la proportion en argile est relativement faible et constante dans l'ensemble des échantillons, de l'ordre de 10%. En revanche, la proportion en sable et argile est soumise à des variations spatiales et temporelles sur l'estuaire de la Seine. Les échantillons de Poses possèdent une faible variabilité avec une teneur en sable comprise entre 65 et 85%. Le site de Oissel présente des pourcentages de sable compris entre 40 et 77% avec la plus faible teneur en février 2009 (période de dépôt des sédiments de crue sur le site de Oissel). Les sédiments de Duclair ont une faible dispersion (teneur en sable moyenne de 20%), à l'exception de l'échantillon de Février 2009, qui présente une teneur en sable légèrement plus élevée (36%) ; ce type de variabilité est également présente sur le site de la Bouille (teneur moyenne de 23% de sable), à l'exception de l'échantillon de septembre 2009 qui présente 45% de sable. Les échantillons de Caudebec (30% de sable) et de Quillebeuf (28% de sable) possèdent une variabilité similaire : une dispersion significative, mais sans tendance remarquable. Enfin le site du pont de Normandie (vasière Nord), présente une proportion en sable relativement faible (12%), à l'exception du prélèvement de Septembre 2009, qui présente une proportion de sable de 37%.

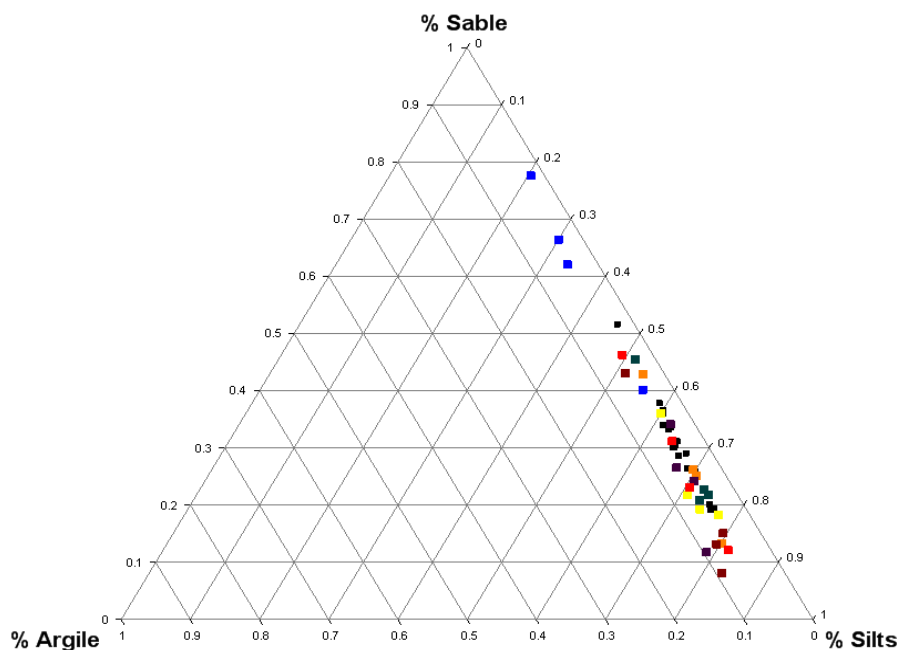


Figure 25 : Diagramme ternaire de la distribution des sédiments de surface de l'estuaire de Seine au cours des 4 campagnes de prélèvement Toxseine.

Les teneurs en pourcentage massique de carbone (C), azote (N) et hydrogène (H) sont reportées sur la figure 26. D'un point de vue temporelle, les proportions des différents éléments présentent une variabilité limitée, à l'exception de la proportion de C au cours de la campagne de décembre 2009 sur le site de Caudebec. Sur l'ensemble des sédiments de surface des 7 sites prélevés, les proportions de C, H et N moyennées sur l'année sont respectivement de 7,62, 0,53 et 0,28%.

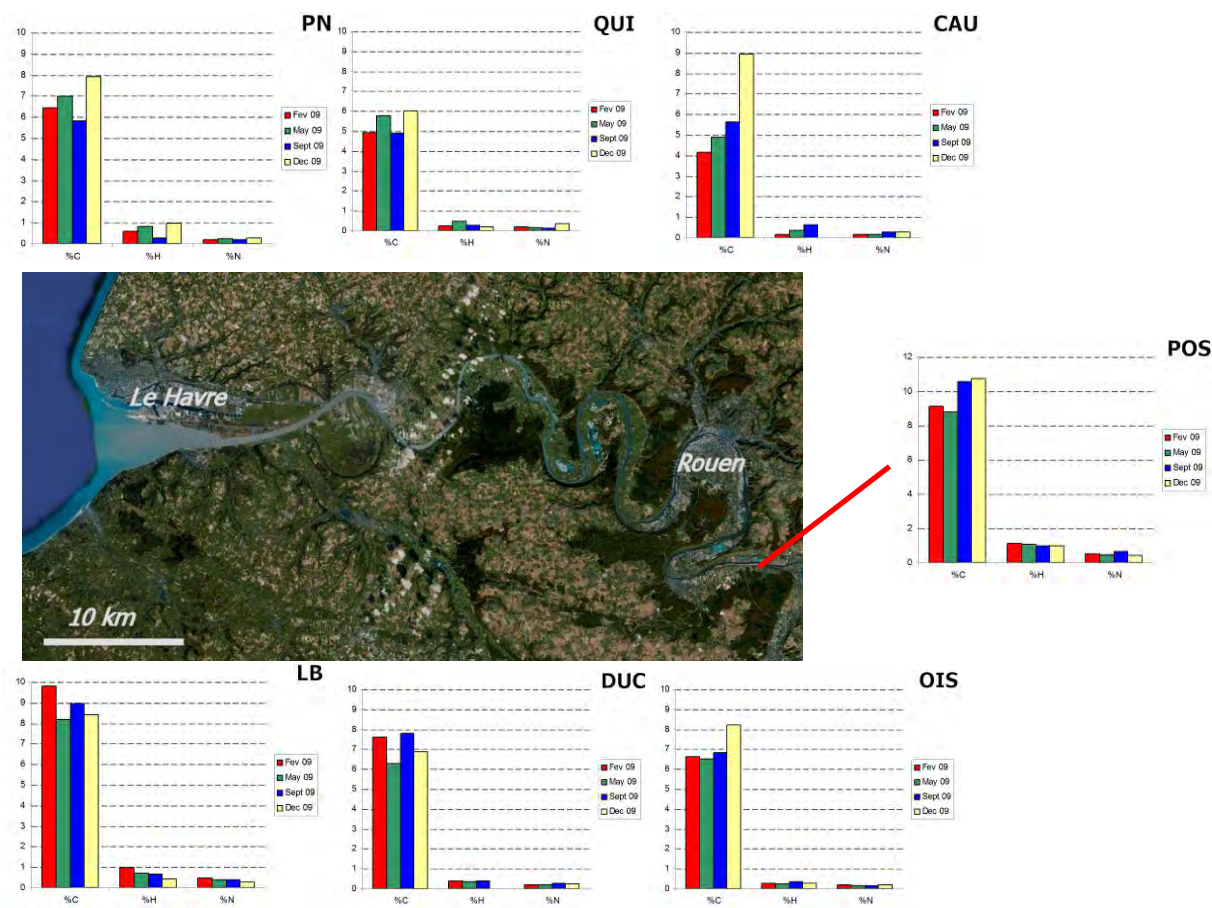


Figure 26 : Proportions en éléments C, H, N des échantillons de surface de l'estuaire de la Seine

Les teneurs en éléments CHN sont reportées dans le Tableau 10. Le rapport C/N est un indicateur qui permet de juger du degré d'évolution de la matière organique, en domaine estuarien il est utilisé comme un des indicateurs de l'origine du matériel (Tan et Strain, 1979 ; Andrews *et al.*, 1998 ; Jaffet *et al.*, 2001 ; Helland *et al.*, 2002 ; Liu *et al.*, 2006 ; Zhou *et al.*, 2007 ; Perdue et Koprivnjak, 2007 ; Yu *et al.*, 2010). De manière globale, les sédiments de l'amont présentent une teneur en C et en N plus élevée, comparativement aux sédiments de la partie aval de l'estuaire dont le ratio C/N est plus faible. Toutefois, la granulométrie est un des paramètres qui contrôle ce ratio, par exemple les sédiments de la vasière de Oissel ne semblent pas répondre à cette tendance avec une teneur relativement faible en N au regard de leur position dans l'estuaire (Figure 27).

Tableau 10 : Proportion moyenne et écart-type des éléments C, H, N des échantillons de surface de l'estuaire de la Seine

	Moyenne C(%)	Moyenne H(%)	Moyenne N(%)	Ecart Type C(%)	Ecart Type H(%)	Ecart Type N(%)
<b>PN</b>	6.78	0.67	0.24	0.88	0.30	0.04
<b>QUI</b>	7.82	0.29	0.20	5.26	0.12	0.11
<b>CAU</b>	5.89	0.37	0.22	2.10	0.22	0.06
<b>LB</b>	8.84	0.69	0.38	0.73	0.23	0.07
<b>DUC</b>	7.14	0.38	0.23	0.69	0.02	0.04
<b>OIS</b>	7.05	0.28	0.17	0.80	0.04	0.01
<b>POS</b>	9.81	1.04	0.51	0.99	0.06	0.09

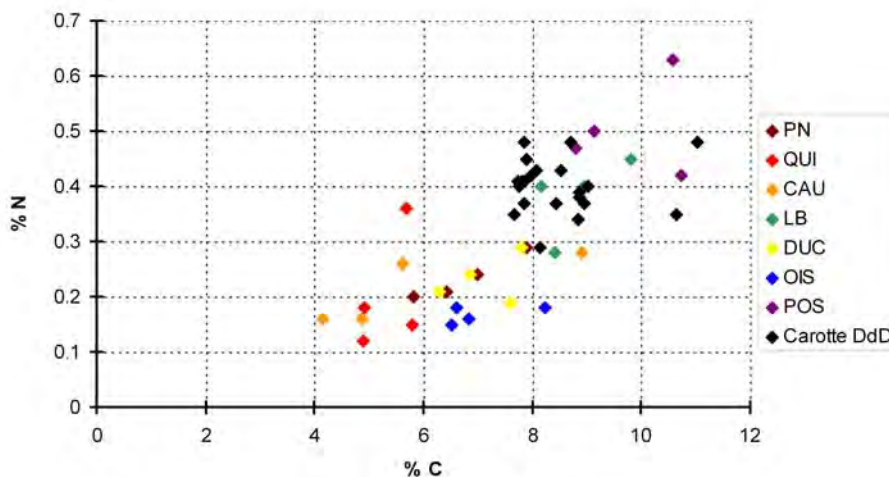


Figure 27 : Ratio C/N dans les sédiments de surface et les sédiments de la carotte de Darse des Docks.

### 3.4.3 Distribution des micropolluants

#### 3.4.3.1 Eléments traces métalliques

Les teneurs en éléments traces présentent des variations spatiales et saisonnières dans les différents sites étudiés. **La contamination est plus importante en amont de l'estuaire.** Les teneurs en éléments traces métalliques (ETM) : Cd, Pb, Zn, Cr, Hg, Ni, Cu déterminés dans les sédiments (Figure 28) ont été comparés aux sites de références non contaminés (fonds géochimiques du bassin de la Seine, AESN). La comparaison des valeurs mesurées avec celles des références indique une **contamination importante des sédiments en cadmium, zinc et mercure**, modérée pour le cuivre et le plomb et faible pour le cobalt et le nickel.

La distribution du cadmium dans les sites d'études est régulière avec des teneurs dépassant la valeur seuil (0,22 µg/g) (Thévenot et al 2002). Les sites en amont sont plus contaminés que l'aval (particulièrement à Oissel et Poses). La concentration maximale en cadmium dépasse 6 µg/g au mois de décembre. Les teneurs en Pb varient peu avec un maximum oscillant entre 100 et 140 µg/g pendant les trois saisons à l'exception du mois de mai, les valeurs les plus élevées sont mesurées au niveau de Poses et Oissel. Pour les trois sites Duclair, Caudebec et Quillebeuf, les concentrations en Pb sont inférieures au seuil de contamination. Le cuivre est caractérisé par une répartition spatiale homogène marquée par des valeurs minimales au niveau du Duclair, Caudebec et Quillebeuf. Les teneurs maximales ont été mesurées au niveau de Poses et Oissel principalement au mois d'août et décembre accédant 8 fois la valeur référence (133 µg/g à Poses au mois d'août).

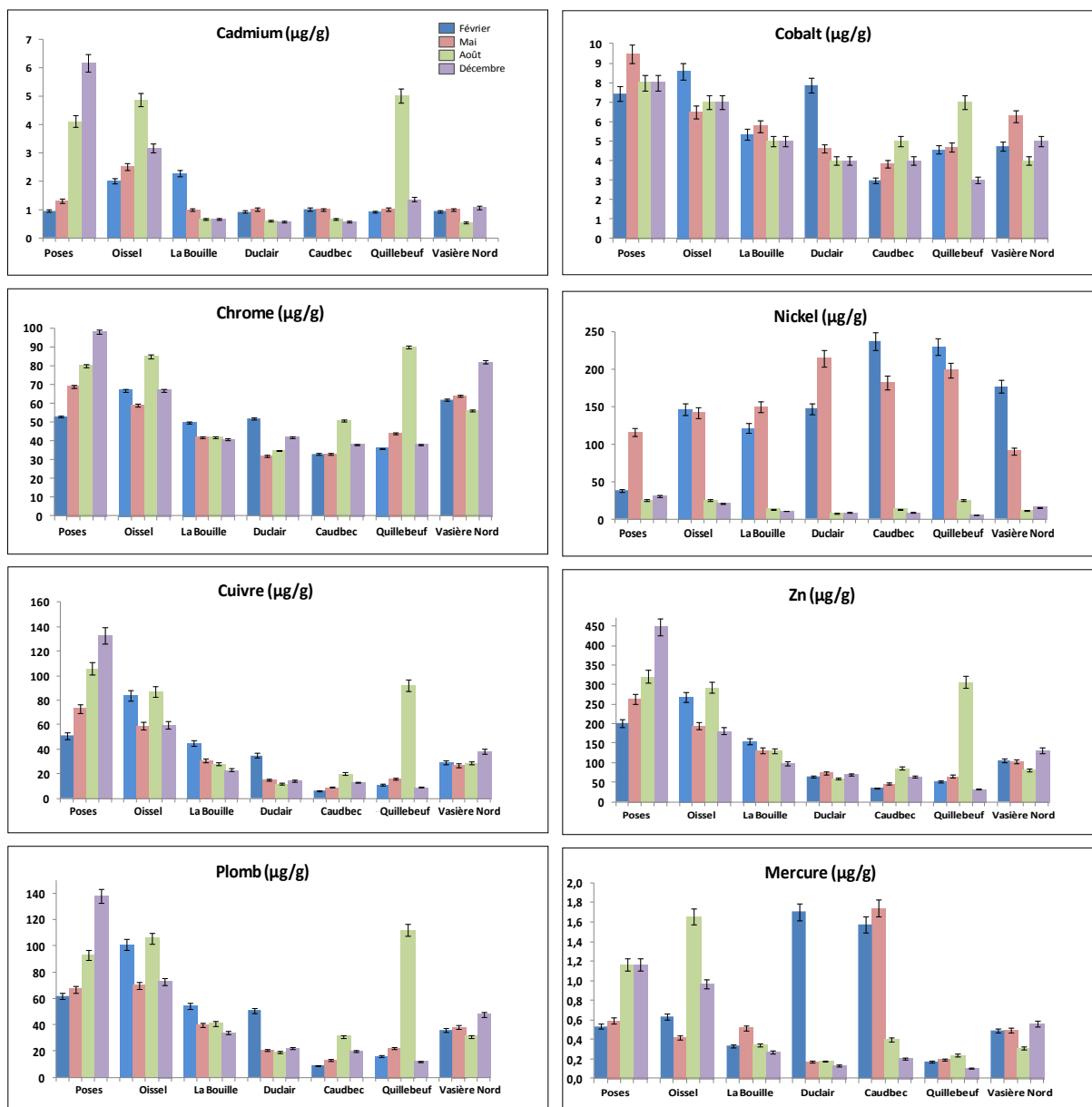


Figure 28 : Evolution de la concentration en éléments traces métalliques (ETM) en  $\mu\text{g/g}$  de sédiments de surface

Afin de statuer sur le niveau de contamination du secteur d'étude, le facteur d'enrichissement (FE) a été calculé pour chaque élément trace. Il est déterminé par comparaison des concentrations relevées pour chaque élément avec le fond géochimique du bassin de la Seine avec une normalisation des teneurs en ETM par rapport à l'aluminium (Thévenot et al, 2002, Priadi et al, 2010). Dans notre cas l'aluminium a été choisi comme élément de normalisation, il est considéré comme un marqueur de la fraction argileuse (Boust et al, 1999 ; Chiffolleau 2001), fraction pour laquelle les métaux traces ont une forte affinité. Toutefois cet élément n'est pas influencé par des sources anthropiques dans le site d'études. Le facteur d'enrichissement est calculé selon la formule suivante :

$$EF = \frac{Me/Al(\text{sédiment})}{Me/Al(\text{référence})}$$

Les facteurs d'enrichissement calculés pour les sept sites (Tableau 10) indiquent une **forte contamination pour les éléments Cd, Hg, Pb, Zn et Cr, avec des valeurs allant de 2 à plus de 50**. La contamination est plus forte pour le mercure et le cadmium, avec un facteur d'enrichissement dépassant 55 pour le mercure dans certains sites comme Oissel et Caudebec et 25 pour le cadmium à Poses.

Tableau 11 : Evolution du facteur d'enrichissement des métaux dans les sédiments de surface

	Campagne	Cd	Cr	Cu	Zn	Ni	Pb	Hg
<b>Poses</b>	Février	4,32	1,33	3,40	3,37	1,43	3,10	17,84
	Mai	5,92	1,73	4,87	4,38	1,81	3,35	19,70
	Août	18,69	2,00	7,07	5,35	1,56	4,65	38,86
	Décembre	<b>28,03</b>	<b>2,45</b>	<b>8,87</b>	<b>7,47</b>	<b>1,94</b>	<b>6,90</b>	<b>38,91</b>
<b>Oissel</b>	Février	9,09	1,68	5,60	4,48	1,27	5,05	21,09
	Mai	11,42	1,48	3,93	3,25	0,74	3,50	13,89
	Août	<b>22,13</b>	<b>2,13</b>	<b>5,80</b>	<b>4,88</b>	<b>1,63</b>	<b>5,30</b>	<b>55,10</b>
	Décembre	14,39	1,68	4,00	3,02	1,31	3,65	32,21
<b>La Bouille</b>	Février	<b>10,32</b>	<b>1,25</b>	<b>3,00</b>	<b>2,60</b>	<b>1,18</b>	<b>2,70</b>	11,07
	Mai	4,43	1,05	2,07	2,20	1,07	2,00	<b>17,24</b>
	Août	2,95	1,05	1,87	2,18	0,81	2,05	11,45
	Décembre	2,95	1,03	1,53	1,65	0,69	1,70	9,05
<b>Duclair</b>	Février	4,18	1,30	2,33	1,08	1,72	2,55	56,75
	Mai	4,57	0,80	1,00	1,23	0,70	1,05	5,74
	Août	2,69	0,88	0,80	0,98	0,50	0,95	5,97
	Décembre	2,55	1,05	0,93	1,17	0,56	1,10	4,38
<b>Caudebec</b>	Février	<b>4,57</b>	0,83	0,40	0,60	0,40	0,45	52,43
	Mai	4,51	0,83	0,60	0,78	0,52	0,65	<b>58,09</b>
	Août	3,03	<b>1,28</b>	<b>1,33</b>	<b>1,43</b>	<b>0,81</b>	<b>1,55</b>	13,14
	Décembre	2,55	0,95	0,87	1,08	0,56	1,00	6,92
<b>Quillebeuf</b>	Février	4,14	0,90	0,73	0,87	0,65	0,80	5,76
	Mai	4,56	1,10	1,07	1,10	0,85	1,10	6,36
	Août	<b>22,82</b>	<b>2,25</b>	<b>6,13</b>	<b>5,13</b>	<b>1,63</b>	<b>5,60</b>	<b>7,94</b>
	Décembre	6,18	0,95	0,60	0,53	0,38	0,60	3,41
<b>Vasière Nord</b>	Février	4,24	1,55	1,93	1,77	1,14	1,80	16,36
	Mai	4,53	1,60	1,80	1,72	1,29	1,90	16,45
	Août	2,42	1,40	1,91	1,37	0,75	1,55	10,32
	Décembre	<b>4,82</b>	<b>2,05</b>	<b>2,53</b>	<b>2,20</b>	<b>1,00</b>	<b>2,40</b>	<b>18,77</b>

L'analyse des résultats obtenus pour les sept sites tout le long de l'estuaire lors des quatre campagnes, montre une **contamination métallique plus forte dans la partie amont de l'estuaire, particulièrement au niveau de Poses** (dont le barrage est considéré comme une source des apports pour l'estuaire). Globalement, la pollution métallique diminue au fur et à mesure que l'on s'approche de la façade maritime de l'estuaire avec une exception pour le mercure où les plus fortes concentrations ont été mesurées au voisinage de Duclair et Caudebec (proximité des industries d'activité mécanique et de traitement de surface) et une particularité pour la campagne du mois d'août

au niveau de Quillebeuf, ce qui laisse penser à la présence de rejets industriels ponctuelles non surveillés dans le secteur. D'une façon globale, la comparaison des résultats trouvés dans cette étude avec ceux reportés dans les travaux antérieurs montre une **réduction au cours du temps des teneurs de l'ensemble des métaux étudiés** (Chiffolleau, 2001). Néanmoins, les conditions physico-chimiques au moment de l'échantillonnage et les variations saisonnières peuvent être à l'origine de certaines variations. Ainsi, les concentrations des métaux totaux dans les sédiments et les facteurs d'enrichissement ne sont qu'une description quantitative des sédiments en terme de pollution chimique.

#### 3.4.3.2 Micropolluants organiques

Les principaux polluants organiques persistants (HAP, PCB, pesticides organochlorés et PBDE) ont été dosés dans les sédiments de surface collectés sur une radiale amont-aval en estuaire de Seine en février 2009. Les différents composés organiques suivis dans chaque classe ainsi que les procédures d'analyse des micropolluants dans les sédiments sont décrites dans la section 3.3.3.2.

**Des niveaux élevés de HAP entre 9 et 10 µg/g ps ont été relevés à Poses et à Caudebec.** Des concentrations plus modérées autour de 4 µg/g ont été mesurées au niveau des sites de Oissel, La Bouille et du Pont de Normandie. Les niveaux les plus faibles sont observés à Quillebeuf (1 µg/g) et plus particulièrement à Duclair où les teneurs atteignent à peine 0,3 µg/g ps (Figure 29). Globalement les concentrations sont du même ordre de grandeur que celles relevées en 2003 (Cachot et al., 2006) mais contrairement à cette précédente étude aucun gradient de dilution amont-aval n'est observé. Le profil de contamination par les HAP dans les sédiments est caractérisé par une prédominance des composés tétra- et penta-aromatiques (30 – 50% pour chacune des classes) et est relativement similaire sur l'ensemble des sites, exception faite de proportions très légèrement supérieures en composés tri-aromatiques à Caudebec et en composés penta-aromatiques à Duclair.

Les teneurs en PCB dans ces mêmes sédiments sont de l'ordre de la dizaine de ng/g à Caudebec et Quillebeuf et comprises entre 30 et 100 ng/g dans la partie amont de l'estuaire (Figure 30). Les PCB n'ont pas été détectés à Duclair, à l'exception du PCB153 présent en faible concentration (0,6 ng/g ps). A contrario, des **concentrations très élevées ont été relevées dans les sédiments collectés au niveau du Pont de Normandie** (170 ng/g ps). Une tendance à la décroissance des concentrations est observée entre l'amont et l'aval de l'estuaire, à l'exception notable de celles enregistrées au Pont de Normandie. A cette dernière exception près, des concentrations sensiblement plus faibles de PCB ont été mesurées en 2009 par rapport à celles mesurées dans les mêmes sédiments en 2003 (Cachot et al., 2006). L'empreinte des PCB (rapports concentration de chacun des congénères/concentration totale) est semblable pour l'ensemble des sites échantillonnés le long de l'estuaire de Seine et est caractérisée par la prédominance des congénères CB153 et CB 158 (20-30% chacun).

Les teneurs en pesticides organochlorés mesurées dans les sédiments sont assez faibles sur l'ensemble des sites avec des concentrations comprises entre 1 et 18 µg/g ps de sédiment (Figure 31). Les plus fortes concentrations ont été relevées dans les sédiments de Poses et du Pont de Normandie. De faibles teneurs en PBDE comprises entre 0,3 et 4 ng/g ps ont été relevées sur l'ensemble des sites (Figure 32), les concentrations de chaque congénère étant souvent proches ou aux inférieures aux limites de quantification.



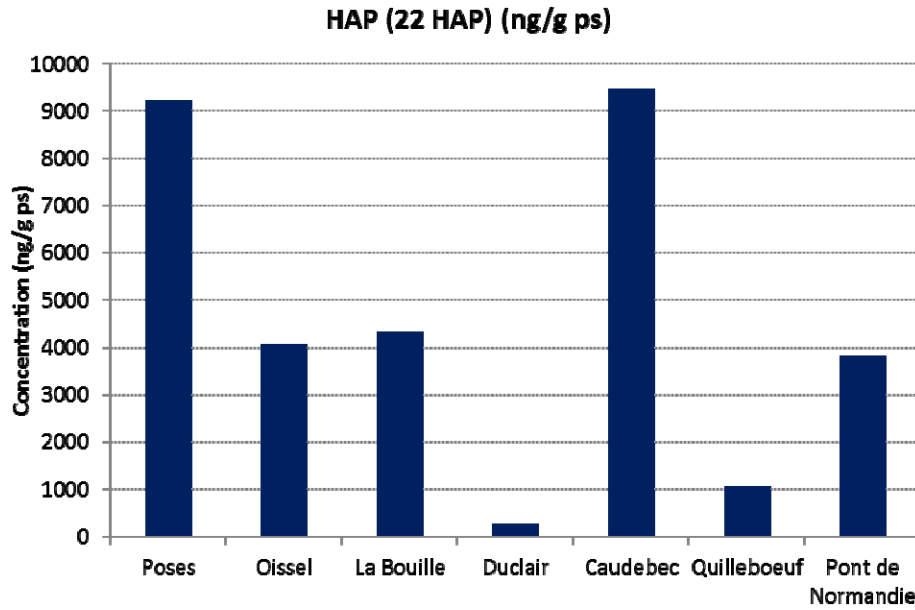


Figure 29 : Concentrations en HAP totaux (22 composés) dans les sédiments prélevés sur une radiale amont-aval en estuaire de Seine en février 2009.

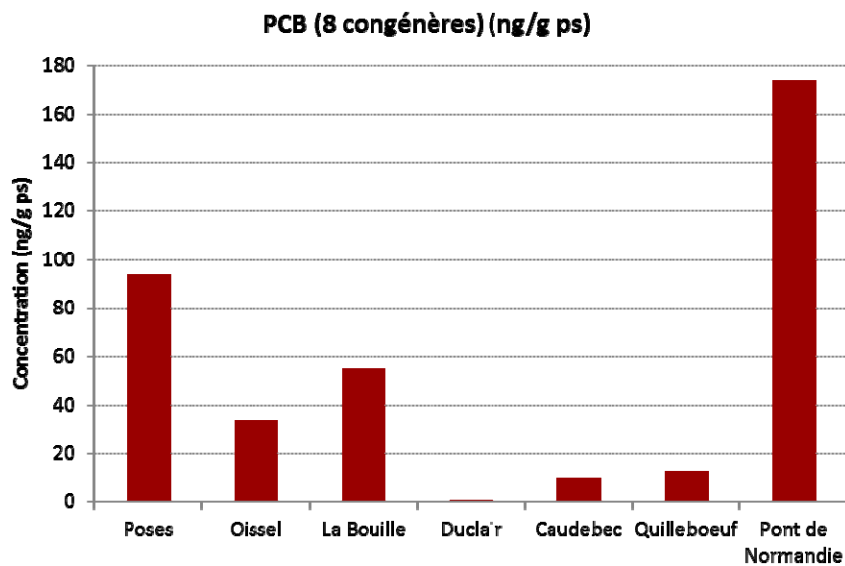


Figure 30 : Concentrations en PCB totaux (8 congénères) dans les sédiments prélevés sur une radiale amont-aval en estuaire de Seine en février 2009.

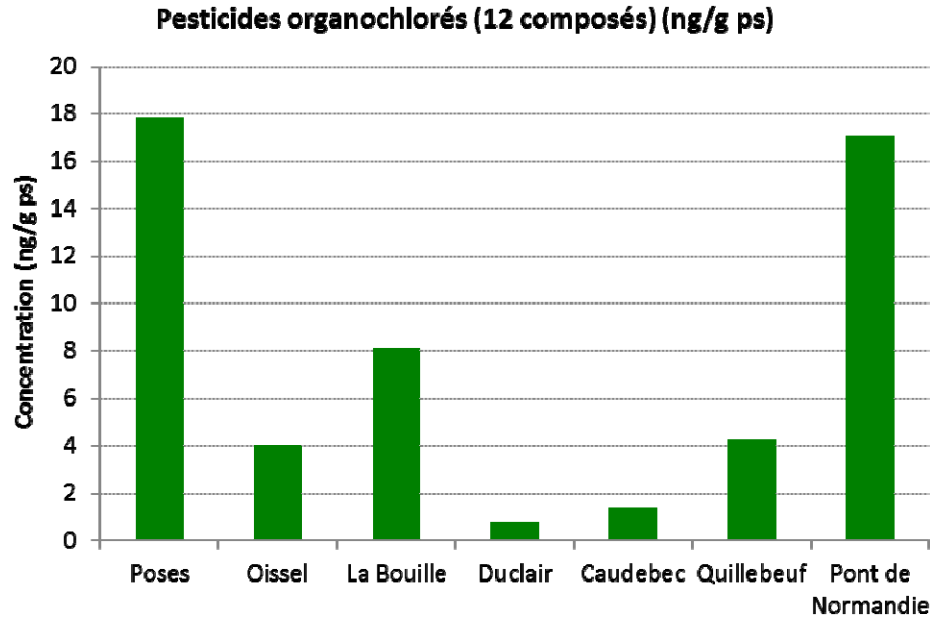


Figure 31 : Concentrations en pesticides organochlorés (12 composés) dans les sédiments prélevés sur une radiale amont-aval en estuaire de Seine en février 2009.

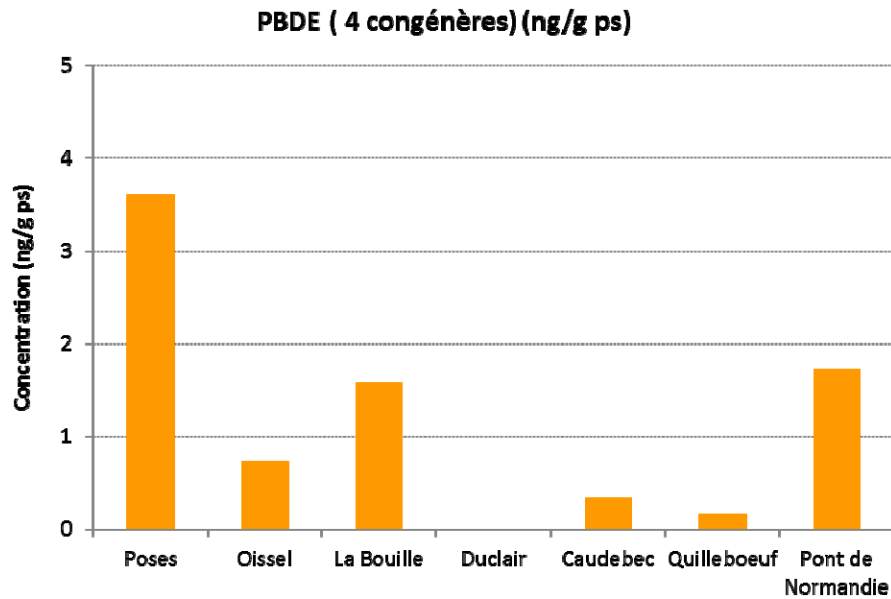


Figure 32 : Concentrations en PBDE (4 congénères) dans les sédiments prélevés sur une radiale amont-aval en estuaire de Seine en février 2009.

### 3.4.4 Evaluation de la toxicité

#### 3.4.4.1 Modélisation de la mobilité des métaux

L'approche de calcul du facteur d'enrichissement ne permet pas de statuer sur l'impact de la contamination métallique et la dangerosité associée pour les organismes aquatiques, les concepts de biodisponibilité des métaux peuvent être abordés grâce à la détermination de l'indice de toxicité (rapport SEM/AVS (Simultaneous Extracted Metals/Acid Volatil Sulfide) qui donne une estimation de la toxicité potentielle des sédiments. Cet indice traduit la capacité des sédiments à piéger les métaux traces au travers des phases sulfures, limitant ainsi leur mobilité et leur bioaccumulation par les organismes vivants. Ce rapport SEM/AVS (sous forme logarithmique) a été calculé pour les sédiments récoltés au cours des quatre campagnes, de prélèvements. Les valeurs calculées pour les sédiments de l'amont sont plus élevées que pour ceux de l'aval (Figure 33). Les sites en aval sont moins contaminés en métaux et plus riches en sulfures (particulièrement au mois de février), la biodisponibilité des métaux est donc plus réduite et ces sédiments ne semblent pas présenter une toxicité marquée. Par contre, l'indice est plus fort pour la campagne de décembre notamment dans les sites de la Bouille et de Poses, en raison d'une sulfuration des sédiments, présentant ainsi un risque avéré pour l'écosystème. La quantité de sulfures volatils (AVS) est plus importante dans les sédiments prélevés au mois de février avec deux pics au niveau de Poses et la Vasière Nord (Figure 33). Ces sulfures fraîchement précipités jouent un rôle clé vis-à-vis des ETM (zinc, cuivre, plomb, cadmium...) puisqu'ils sont susceptibles d'être piégés temporairement ou définitivement par précipitation sous formes de sulfures métalliques et/ou par coprécipitation avec les sulfures de fer.

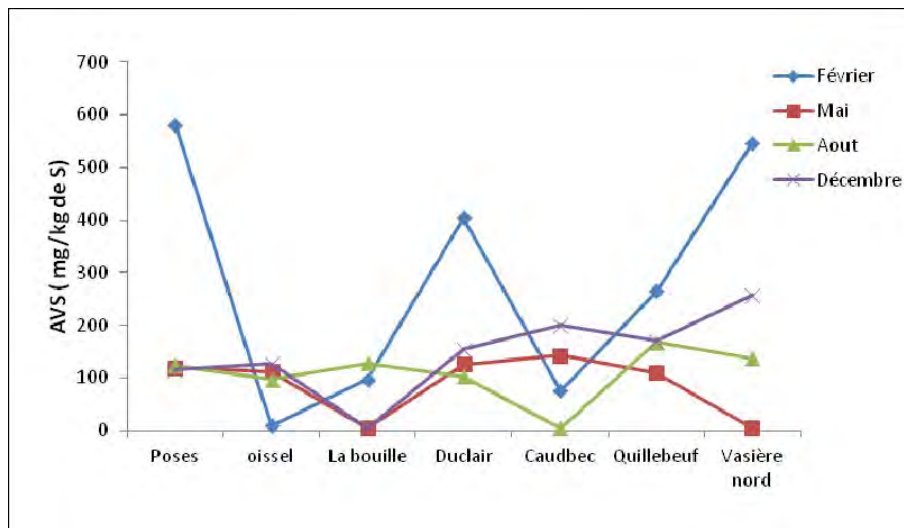


Figure 33 : Evolution des teneurs en AVS (mg/kg) dans les sédiments

Les logarithmes des indices de toxicité sont supérieurs à 0 au mois d'août et décembre pour tous les sites (Figure 34). Ces résultats montrent qu'au moins un des éléments traces métalliques (ETM) utilisés pour le calcul d'IT devrait être présent dans une fraction plus labile comme les carbonates. Ces sédiments qui apparaissent plus contaminés et avec un faible excès d'AVS laisse supposer que ces

métaux pourraient être relativement disponibles pour le biotope. La toxicité des sédiments en février et mai apparaît plus réduite, cela signifie que les sulfures particulaires sont ici en quantité suffisante pour immobiliser et piéger les éléments traces métalliques.

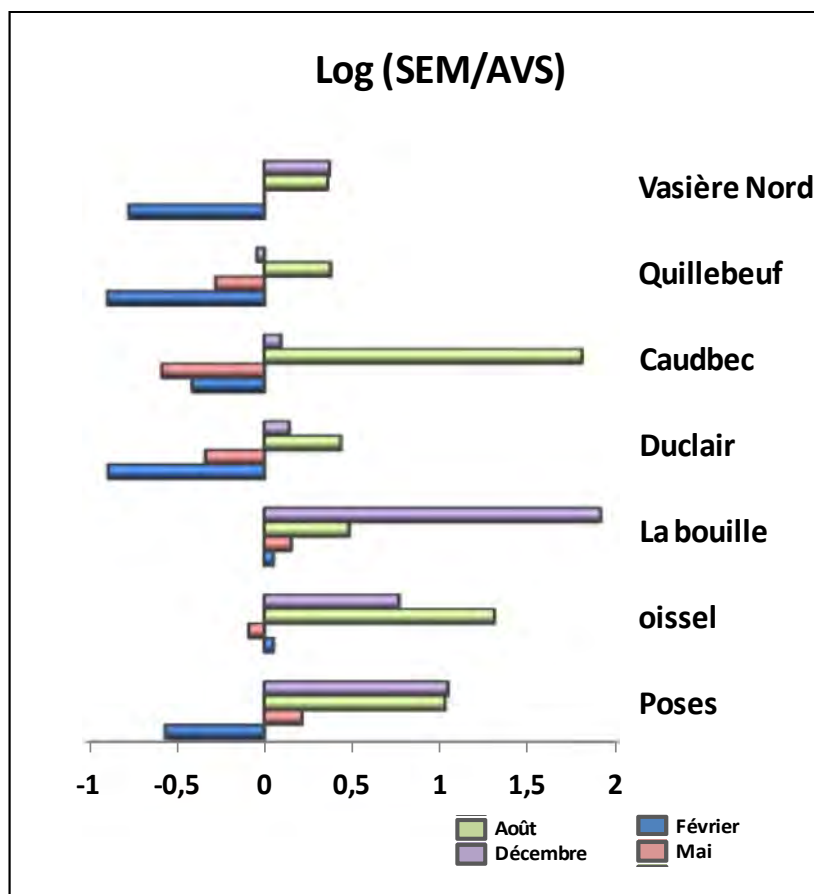


Figure 34 : Evolution du logarithme de l'indice de toxicité (IT)

#### 3.4.4.2 Potentiel cytotoxique des sédiments : test Microtox®

L'évaluation de la toxicité des sédiments a été réalisée par le test Microtox® en utilisant le protocole dit « 100% test protocole » sur extraits aqueux de sédiment (Environnement Canada, rapport SPE1/RM/24, 1992). Des essais préliminaires ont été effectués sur le sédiment de Poses de décembre 2009 après 1, 2, 5 et 15 min d'agitation (300 tr/min, prise d'essai 6 g de sédiment dans 30 ml de diluant) pour définir les conditions d'agitation. L'inhibition étant maximale après 2 et 15 minutes d'agitation ces conditions ont été choisies pour la suite de l'analyse.

Les résultats obtenus pour la radiale de décembre 2009 (Tableau 12). Les échantillons de Poses et Oissel apparaissent les plus toxiques avec une inhibition autour de 40%. Les échantillons de Caudebec et Vasière Nord apparaissent modérément toxiques (inhibition entre 20 et 30%) et ceux de La Bouille sont non toxiques dans nos conditions opératoires (Tableau 12). Au vu des résultats d'inhibition, le classement des sédiments par ordre de toxicité croissante est le suivant : La Bouille < Caudebec <

Vasière Nord < Poses < Oissel. A l'exception du sédiment de La Bouille ces données Microtox sont globalement en accord avec l'indice de toxicité (figure 34).

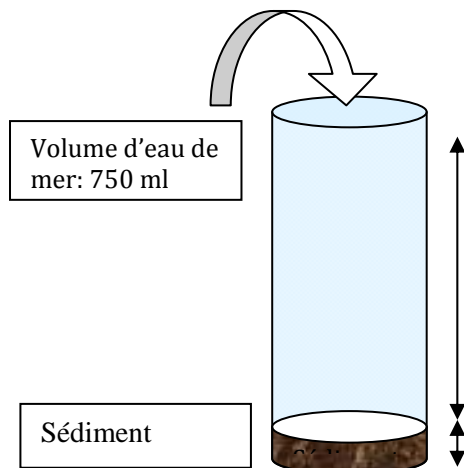
Tableau 12 : Toxicité des sédiments de l'estuaire de décembre 2009 (test Microtox®)

Site	% d'inhibition de <i>Vibrio Fisheri</i> à la plus forte Concentration (200mg/ml)	CE50 <sub>30mn</sub>
Poses 2 min	3,7 %	> 200 mg de sed humide/ml
Poses 15 min	38,9 %	> 200 mg de sed humide/ml
Oissel 2 min	46,3 %	> 200 mg de sed humide/ml
Oissel 15 min	46,3 %	> 200 mg de sed humide/ml
La Bouille 2 min	Pas d'inhibition	> 200 mg de sed humide/ml
La Bouille 15 min	Pas d'inhibition	> 200 mg de sed humide/ml
Caudebec 2 min	17,3 %	> 200 mg de sed humide/ml
Caudebec 15 min	23 %	> 200 mg de sed humide/ml
Pont de Normandie 2 min	28,1 %	> 200 mg de sed humide/ml
Pont de Normandie 15 min	34 %	> 200 mg de sed humide/ml

#### 3.4.4.3 Test de toxicité sur *Corophium sp*

Ce test a été effectué par l'Institut Pasteur de Gravelines selon la norme ISO 16712 sur le crustacé amphipode *Corophium sp*. Ce bio essai n'était pas initialement prévu dans le projet ToxSeine. Il a ajouté au projet à la suite d'échanges au cours du séminaire Seine-Aval de septembre 2008.

Le mode opératoire suit la norme ISO 16712 -(novembre 2007) - Détermination de la toxicité aigüe des sédiments marins et estuariens vis-à-vis des amphipodes. Les amphipodes *Corophium arenarium* sont mis en présence du sédiment brut ou dilué avec un sédiment de référence tamisé à 10 mm. Le sédiment est surmonté d'au moins 5 fois sa hauteur d'eau de mer filtrée aérée par bullage (Figure 35). Les amphipodes s'enfouissent rapidement dans le sédiment et y demeurent grâce à un éclairage permanent (figure x). Le test est conduit pendant 10 j à 15°C+/-2°C. Au bout de 10 jours les sédiments sont passés sur un tamis pour mesurer la proportion d'amphipodes vivants dans chaque concentration. Afin de contrôler la sensibilité des amphipodes utilisés et les conditions opératoires retenues, chaque série de tests a été accompagnée d'un test de référence utilisant le cadmium (durée : 96 heures en milieu eau de mer seule). La validé du test est vérifiée par la mortalité dans le témoin négatif (<10%) et la sensibilité des crustacés à un toxique de référence (LC50<sub>96h</sub> Cd<sup>2+</sup> = 0,69 mg/l).



Vue de la salle de tests

Figure 35 : Détermination de la toxicité aiguë des sédiments marins et estuariens vis-à-vis des amphipodes (ISO 16712).

Les résultats présentés dans la Figure 36 ne font pas apparaître de toxicité importante des sédiments à l'exception du **sédiment de Duclair de février 2009** où la mortalité dépasse les 40%.

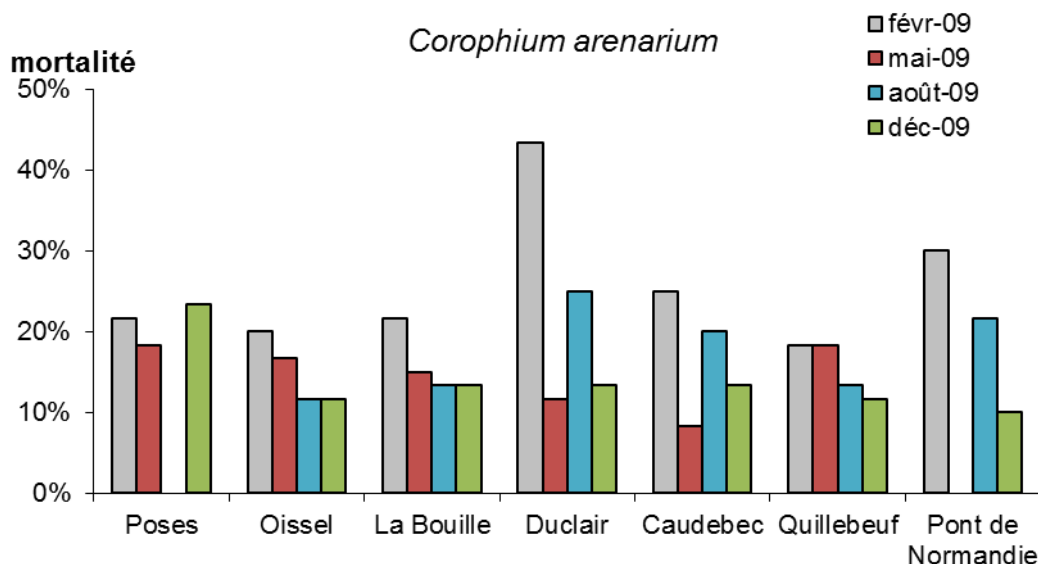
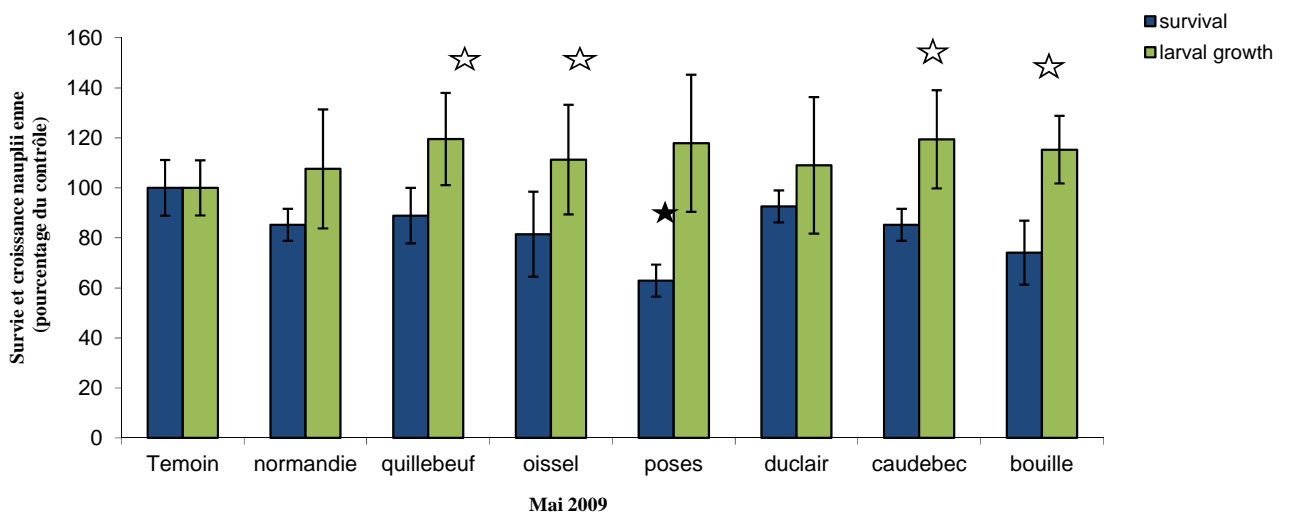
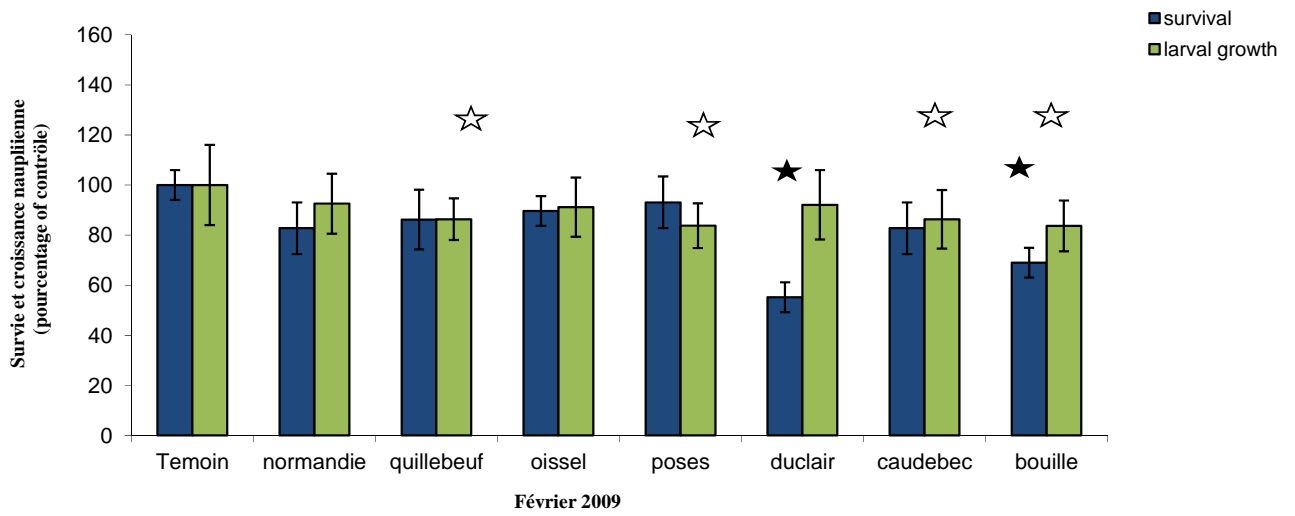


Figure 36 : Mortalité cumulée des amphipodes *Corophium arenarium* exposés aux sédiments de l'estuaire de Seine (Norme ISO 16712)

#### 3.4.4.4 Toxicité sur nauplius d'*Eurytemora affinis*

Les tests ont été réalisés dans les mêmes conditions que celles présentées dans le paragraphe 3.1.1. La figure 37 présente les effets des éluviats de différents sédiments naturels de l'estuaire de Seine sur la survie et la croissance des nauplii du copépode *Eurytemora affinis*. **Les sédiments de surface prélevés en février 2009 à Duclair et La Bouille, en mai 2009 à Poses, en Août 2009 à Oissel et Poses, et en décembre 2009 à Poses et Duclair présentent une toxicité aiguë significative pour les nauplii.** Des effets positifs sur la croissance des nauplii ont été observés pour de nombreux

sédiments prélevés en mai, août et décembre 2009. Des effets négatifs sur la croissance des nauplii ont été également observés mais uniquement sur les prélèvements de février 2009 (Figure 37).



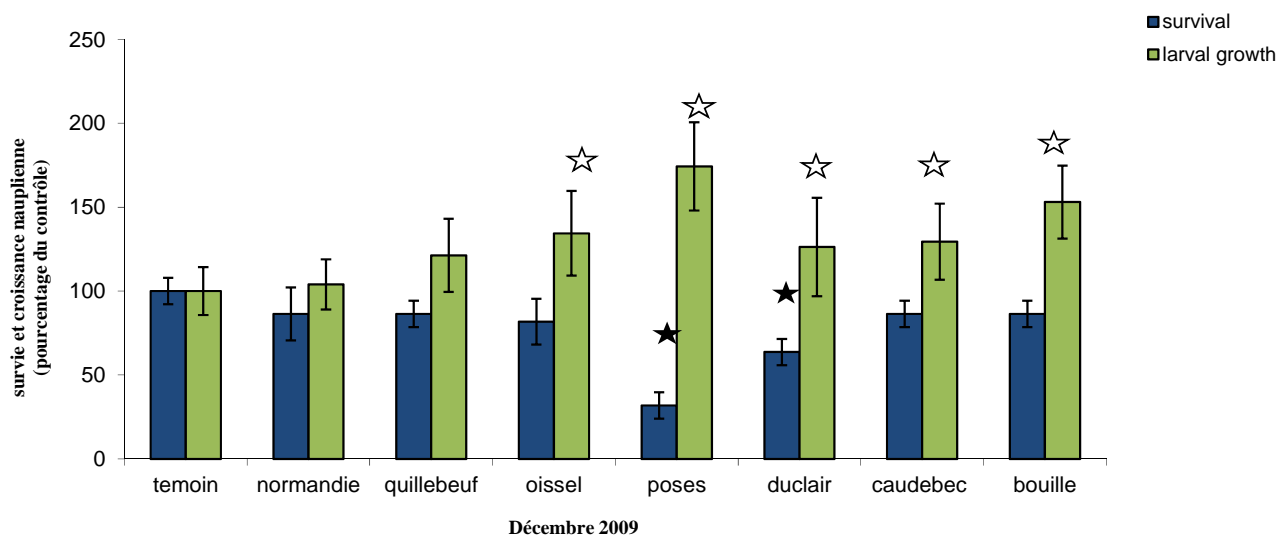
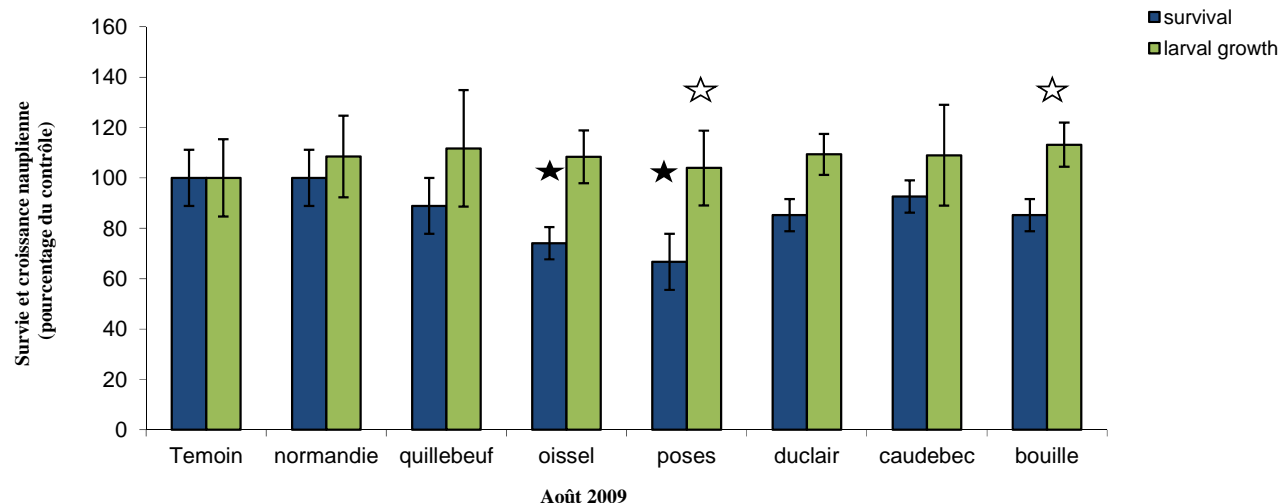


Figure 37. Survie et croissance des nauplii au cours des 6 jours d'exposition aux éluviats des sédiments naturels de l'estuaire de Seine. (\*) représente une différence significative par rapport au contrôle (Unilateral Mann-Whitney rank sum test ;  $p < 0,05$ ).

#### 3.4.4.5 Toxicité sur embryons et larves de poissons médaka

Les tests ont été réalisés dans les mêmes conditions que celles présentées dans le paragraphe 3.1.2. soit sur sédiments préalablement lyophilisés (radiale de février 2009) ou sur sédiment humide (radiale de décembre 2009). Les données obtenues ont été comparées statistiquement à celles d'un sédiment de référence (gravière d'Yville-sur-Seine).

Pour la radiale de février 2009 on observe une **toxicité aiguë importante des sédiments de la partie amont de l'estuaire de Seine** qui se traduit par un accroissement significatif de la mortalité embryonnaire et larvaire et d'une diminution significative du taux d'éclosion (Tableau 13). Un petit accroissement de la mortalité embryonnaire a également été observé pour le sédiment de Quillebeuf.



Outre une augmentation de la mortalité embryon-larvaire, les médaka exposés au sédiment de Poses présentent un retard d'éclosion, une taille plus réduite à l'éclosion et un accroissement de la fréquence de malformations.

Tableau 13: Toxicité des sédiments de la radiale de février 2009 sur embryons et larves de Médaka Japonais. Seules les valeurs statistiquement différentes du contrôle (sédiment de Yville-sur-Seine) ont été indiquées.

Sites	Mortalité embryon.	Mortalité larvaire	Taux d'éclosion	Durée développ.	Taille à l'éclosion	Malformations	Domage à l'ADN	Activité cardiaque
Poses	61,1%	47,1%	23,3%	+5,7j	-0,24 mm	+41,2	nd	-
Oissel	15,5%	4,6%	82,2%	-	-	-	-	+9,9%
La Bouille	17,8%	5,0%	80,0%	-	-	-	-	+6,3%
Duclair	-	-	-	-	-	-	-	-
Caudebec	-	-	-	-	-	-	-	+7,7%
Quillebeuf	+10,0%	-	-	-	-	-	-	+4,8%
Pont de Normandie	-	-	-	-	-	-	-	-

Nd : non déterminé

Pour les sédiments de décembre 2009 une toxicité moins marquée a été observée (Tableau 14). Aucune mortalité n'a été observée quel que soit le sédiment considéré. Néanmoins **tous les sédiments à l'exception de celui de Oissel ont conduit à des effets subaigus significatifs sur les embryons ou les larves**. Ainsi l'exposition des embryons aux sédiments de Pont de Normandie, Quillebeuf, Duclair, La Bouille et Poses affecte de façon significative la durée de développement des embryons ou la taille des larves à l'éclosion (taille totale ou de la tête) (Tableau 14). Les sédiments de Caudebec et du Pont de Normandie semblent être les plus toxiques puisqu'il affectent la durée de développement des embryons et la taille des larves (du corps de la tête). La plus forte toxicité des sédiments de février 2009 peut, pour une part au moins, être la conséquence de la lyophilisation de ces sédiments. En effet, la lyophilisation peut dénaturer la matière organique contenue dans les sédiments et de ce fait augmenter la mobilité et donc la biodisponibilité des polluants associés à cette matière organique.

Tableau 14: Toxicité des sédiments de la radiale de décembre 2009 sur embryons et larves de Médaka Japonais. Seules les valeurs statistiquement différentes du contrôle (sédiment de Yville-sur-Seine) ont été indiquées.

Sites	Mortalité embryon.	Mortalité larvaire	Durée développ.	Taux d'éclosion	Taille à l'éclosion	Malformations	Domage à l'ADN	Activité cardiaque
Poses	-	-	-	-	-0,38mm	-	nd	-
Oissel	-	-	-	-	-	-	nd	-
La Bouille	-	-	-	-	-0,31mm	-	nd	-
Duclair	-	-	-0,84j	-	-	-	nd	-
Caudebec	-	-	-0,66j	-	-0,33mm	-	nd	-
Quillebeuf	-	-	-0,59j	-	-	-	nd	-
Pont de Normandie	-	-	-1,0j	-	-0,39mm	-	nd	-

nd : non déterminé

Les variations saisonnières de toxicité des sédiments ont été étudiées sur trois sites de l'estuaire de Seine : Poses, Duclair et Pont de Normandie. La toxicité mesurée pour les différents paramètres a été comparée à celle d'un sédiment témoin (Yville-sur-Seine).

Pour les sédiments de Poses (Tableau 15) comme ceux du Pont de Normandie (Tableau 16), les variations saisonnières de toxicité sont relativement réduites. On note cependant une toxicité aiguë (mortalité larvaire) pour le sédiment de Poses collecté en mai qui n'est pas observé aux autres saisons (Tableau 15).

*Tableau 15 : Variations saisonnières de la toxicité des sédiments de Poses au cours de l'année 2009 sur embryons et larves de médaka. Seules les valeurs statistiquement différentes du contrôle (sédiment de Yville-sur-Seine) ont été indiquées.*

Sites	Mortalité embryo.	Mortalité larvaire	Taux d'éclosion	Durée dévelop.	Taille à l'éclosion	Malfor- Mations	Activité cardiaque
Février	-	-	-	-	-0,33mm	+36%	-
Mai	-	+9%	-	-	-0,27mm	+35%	-
Août	-	-	-	-1,0j	-0,44mm	+37,8%	-
Décembre	-	-	-	-1,4j	-0,29mm	+28,9%	-

*Tableau 16 : Variations saisonnières de la toxicité des sédiments du Pont de Normandie au cours de l'année 2009 sur embryons et larves de médaka. Seules les valeurs statistiquement différentes du contrôle (sédiment de Yville-sur-Seine) ont été indiquées.*

Sites	Mortalité embryo.	Mortalité larvaire	Taux d'éclosion	Durée dévelop.	Taille à l'éclosion	Malfor- Mations	Activité cardiaque
Février	-	-	-	-	-0,46mm	+48,9%	-
Mai	-	-	-	-	-0,46mm	+24,5%	-
Août	-	-	-	-	-0,34mm	+26,7%	-
Décembre	-	-	-	-1,05j	-0,27mm	-	-

Pour le site de Duclair les variations saisonnières sont plus marquées (Tableau 17) avec une toxicité modérée en février et plus élevée en mai (mortalité embryonnaire et réduction du succès d'éclosion). En revanche, cette toxicité n'est pas retrouvée en août ni en décembre de la même année.

Tableau 17 : Variations saisonnières de la toxicité des sédiments de Duclair au cours de l'année 2009 sur embryons et larves de médaka. Seules les valeurs statistiquement différentes du contrôle (sédiment de Yville-sur-Seine) ont été indiquées.

Sites	Mortalité embryo.	Mortalité larvaire	Taux d'éclosion	Durée dévelop.	Taille à l'éclosion	Malfor- Mations	Activité cardiaque
Février	-	-	-	-1,47j	-0,34mm	-	-
Mai	+29,3%	-	-31,7%	-	-0,40mm	+50,7%	-
Août	-	-	-	-	-	-	-
Décembre	-	-	-	-	-	-	-

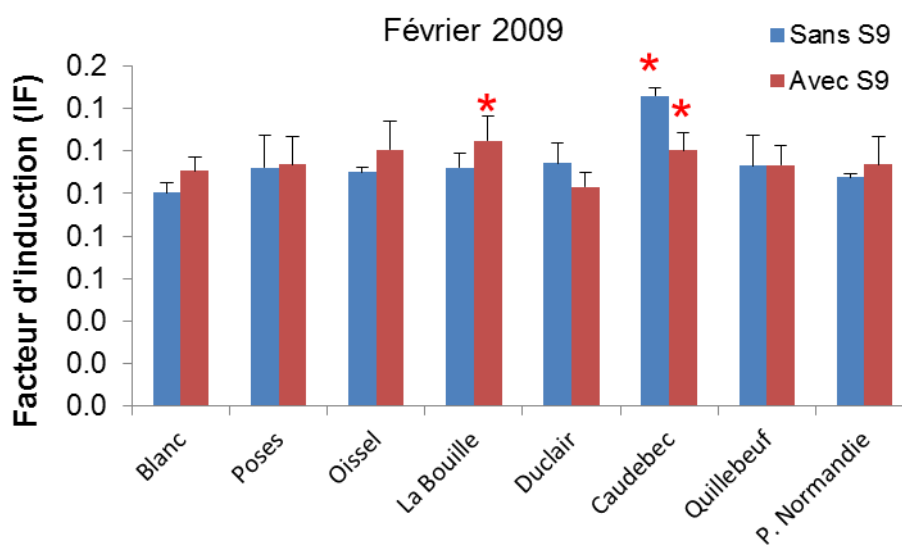
#### 3.4.4.6 Potentiel génotoxique des sédiments

Un extrait organique total a été préparé à partir de chacun des sédiments de surface préalablement lyophilisés. Ces extraits ont été réalisés par la méthode ASE en utilisant comme solvant le dichlorométhane. Les extraits ont été reconcentrés (X20) puis resolubilisés dans du diméthylsulfoxyde.

Le potentiel génotoxique des extraits organiques de sédiment a été mesuré à l'aide du SOS Chromotest (Quillardet et al., 1982) avec et sans ajout d'une fraction microsomale S9 et à une seule concentration d'extrait. Ces analyses ont été effectuées par la société TOXEM (Le Havre).

L'ensemble des résultats pour les quatre campagnes de prélèvement est présenté dans les figures 38 et 39. **Le potentiel génotoxique est globalement faible et très variable au niveau spatial et temporel.** Ce sont pour l'essentiel les **sédiments collectés en mai qui apparaissent les plus génotoxiques**. Une génotoxicité plus limitée a été mesurée en février et en août et aucune génotoxicité n'a été mesurée en décembre. Aucun gradient clair de génotoxicité clair. **Les sédiments de Poses apparaissent génotoxiques lors des deux campagnes de mai et août 2009.** La plupart des extraits génotoxiques apparaissent également cytotoxiques.

A



B

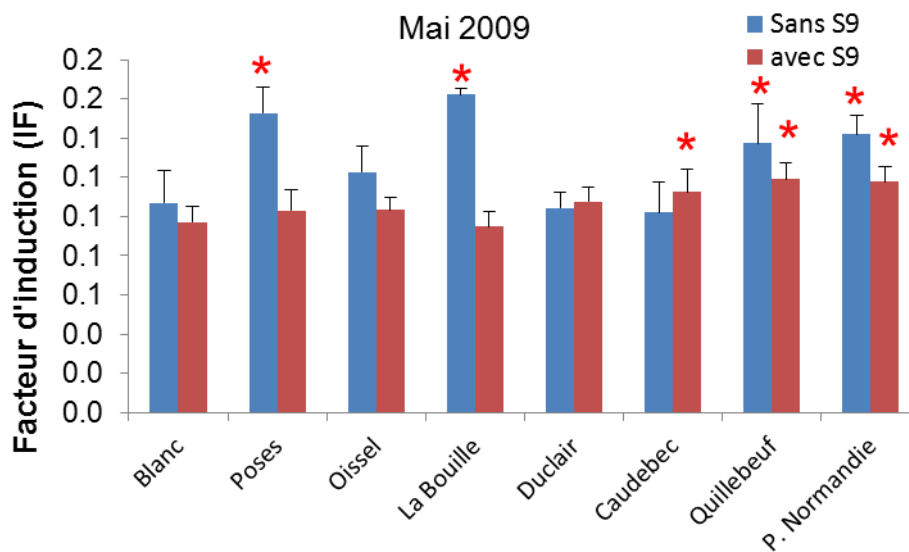
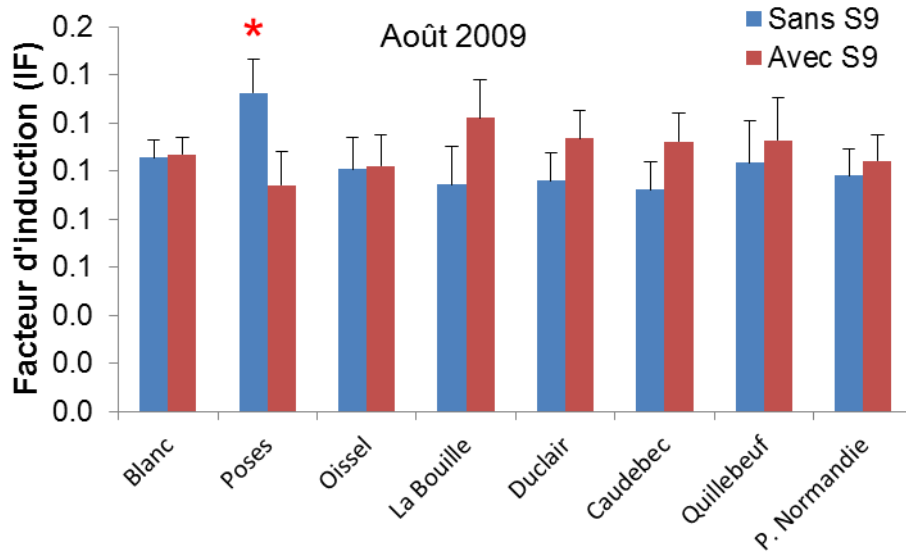


Figure 38 : Potentiel génotoxique (SOS Chromotest) mesuré avec et sans S9 sur extrait organique de sédiments de surface collectés en Seine en février (A) et mai (B) 2009.

A



B

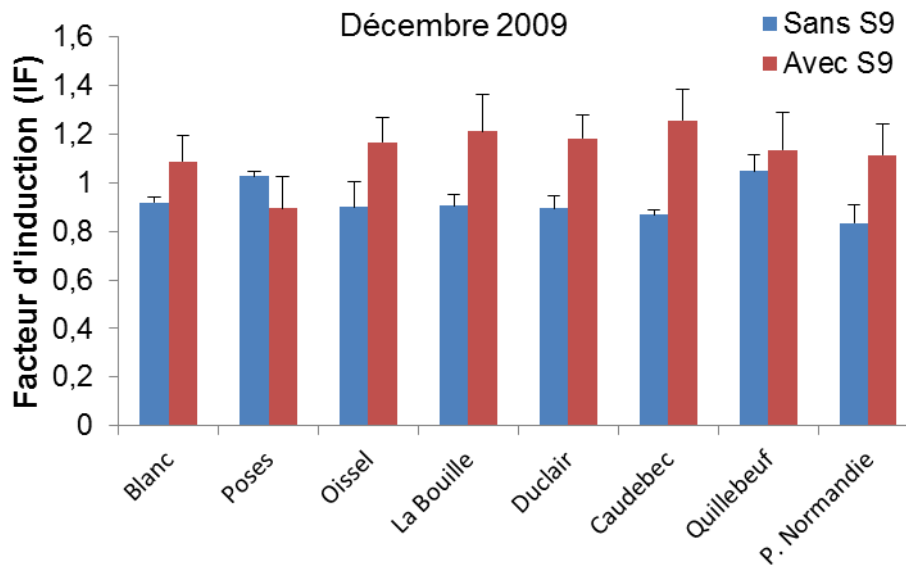


Figure 39 : Potentiel génotoxique (SOS Chromotest) mesuré avec et sans S9 sur extrait organique de sédiments de surface collectés en Seine en août (A) et décembre (B) 2009.

#### 3.4.4.7 Cartographie des niveaux de danger dans l'estuaire de Seine

Afin de mieux identifier et cartographier les niveaux dangers liés à la contamination chimique des sédiments de l'estuaire de Seine nous avons construit une échelle de danger à cinq niveaux (Tableau 18) prenant en compte à la fois les niveaux de contamination pour les métaux et

polluants organiques analysés, les réponses sur des tests *in vitro* de toxicité, les réponses sub-létales sur des tests *in vivo* et enfin les réponses létales sur des tests *in vivo*.

Tableau 18 : Cotation des niveaux de danger associés à la contamination chimique des sédiments

Niveaux de danger	Critères pris en compte
0	Niveau de contamination faible (< NQE)
1	Niveau de contamination modéré à fort (> NQE)
2	Toxicité <i>in vitro</i> avérée
3	Toxicité subaiguë <i>in vivo</i> avérée
4	Toxicité aiguë <i>in vivo</i> avérée

En appliquant cette grille de cotation des dangers aux sédiments de l'estuaire de Seine il a été possible de produire une carte des niveaux de danger en fonction des sites et des saisons (Tableau 19). Les données obtenues sur embryons de médaka étant partielles, elles n'ont pas été prises en compte pour cette analyse. Au vu de cette carte il apparaît très clairement que le site de Poses constitue quelle que soit la saison considérée un « point chaud » de danger. La portion d'estuaire comprise entre Oissel et Caudebec est une zone à danger plus modérée avec néanmoins une variabilité saisonnière importante notamment au niveau du site de Duclair. Enfin, la partie basse de l'estuaire de Quillebeuf à l'embouchure constitue une zone de moindre danger avec toxicité plus réduite des sédiments.

Tableau 19 : Distribution spatio-temporelle des niveaux de dangers des sédiments de l'estuaire de Seine au cours de l'année 2009

	Février	Mai	Août	Décembre
Poses	4	4	4	4
Oissel	1	3	3	3
La Bouille	4	3	3	3
Duclair	4	1	1	4
Caudebec	3	3	1	3
Quillebeuf	1	3	1	1
Vasière Nord	1	1	1	1

Pour construire cette grille ont été pris en compte les teneurs en métaux et polluants organiques, le potentiel génotoxique, les effets aigus et subaigus sur *Corophium sp* et *E. affinis*.

### 3.5 Etude de la remise en suspension des sédiments superficiels

#### 3.5.1 Cinétique de relargage des métaux

Après la détermination du niveau de contamination des sédiments, l'étape suivante a été d'évaluer le déstockage des polluants lors de la remise en suspension des sédiments. Notre étude s'est focalisée sur les sites de Poses et Oissel (prélèvement du mois de décembre). Ces deux sites sont considérés comme les plus contaminés en ETM (facteurs d'enrichissement les plus élevés) avec des concentrations en sulfures limités ce qui faciliteraient leur remobilisation. La répartition des métaux traces dans les différents constituants minéraux et organiques a été déterminée par extraction séquentielle pour connaître le mode d'association aux particules et ainsi mieux comprendre la réactivité. Le principe de cette technique est basé sur des attaques successives du matériel sédimentaire par des réactifs de forces croissantes de plus en plus agressifs. La méthode standardisée du BCR a été utilisée (Rauret et al, 2000) avec quelques modifications, des tests d'optimisation sur le sédiment certifié (BCR-701) ont été effectués. La répartition se fait en quatre étapes d'extraction mettant en jeu plusieurs réactifs. Les extractions sont réalisées sur sédiment humide non tamisé sous flux d'azote afin d'éviter des oxydations possibles du sédiment (Billon, 2001).

La phase solide se répartie selon 4 fractions :

- La fraction *échangeable* qui regroupe les métaux solubles dans l'eau et en milieu faiblement acide (notamment associés aux carbonates) cette phase est extraite par l'acide acétique à 0,11 mol/L.
- La fraction *réductible* (métaux généralement liés aux oxydes de fer et de manganèse), extractible dans une solution de chlorure d'hydroxylamine 0,5 mol/L
- La fraction *oxydable* (métaux liés à la matière organique et aux sulfures), extractible avec du peroxyde d'hydrogène 8,8 mol/L
- La fraction résiduelle regroupant les aluminosilicates, silicates et certains oxydes réfractaires. une minéralisation totale en milieu acide concentré est réalisée comme pour la détermination des métaux totaux.

Pour évaluer la remobilisation physique du sédiment induite par les marées, les aménagements ou le trafic des bateaux, des expériences de remise en suspension ont été réalisées en laboratoire dans des conditions contrôlés avec l'eau de l'estuaire de Seine. Ces expériences ont consistées en une dispersion de quelques grammes de sédiments bruts de surface dans un volume donné d'eau naturelle filtrée et prélevée dans le site d'étude de l'estuaire.

Toutes les expériences de cinétique de remobilisation ont été réalisées durant 10 jours à température contrôlée, dans des flacons inertes en polyéthylène et en utilisant différentes masses de sédiments (400 mg, 1 g et 5 g) dans un litre d'eau. Le dispositif utilisé lors de ces essais est présenté dans la figure 40. Les sondes ont été plongées en permanence dans l'eau permettant la mesure en continu du pH, du potentiel d'oxydoréduction, de la température et de l'oxygène dissous.

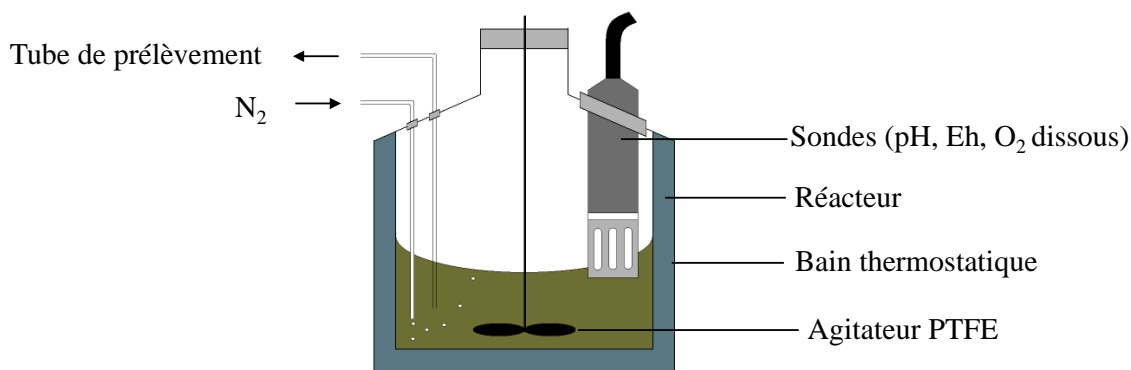


Figure 40 : Montage expérimental pour les expériences de remobilisation

Dans un second temps, des expériences de remobilisation ont été réalisées en présence d'un chélatant, l'EDTA. L'EDTA permet une complexation instantanée des métaux remobilisés (formation de complexes stables). Cette expérience permet de quantifier la fraction maximale pouvant être mobilisée, aidant ainsi à prédire les risques liés aux remaniements des sédiments à long-terme. A noter que les principaux avantages de cette approche en batch et en mode statique sont la simplicité de mise en œuvre avec la possibilité de simuler les conditions naturelles relativement proches de la réalité du terrain.

Des bioessais ont été effectués simultanément avec les expériences de remise en suspension pour évaluer le risque comme précédemment dans l'étude de la carotte sédimentaire du port de Rouen. La quantification des métaux totaux a été réalisée par ICP-AES et/ou ICP-MS pour tous les échantillons.

La toxicité est souvent liée à la forme chimique des éléments ainsi qu'à leur mobilité. En générale la forme chimique est en relation directe avec la biodisponibilité et le potentiel de bioaccumulation dans la chaîne alimentaire. La détermination des formes chimiques biodisponibles des ETM est nécessaire pour estimer les fractions mobiles capables de s'accumuler dans les organismes vivants. Chacun des métaux présents dans les sédiments montre une répartition chimique qui lui est spécifique, avec toutefois une certaine similarité (Figure 41). A l'exception du cadmium, les métaux sont présents plus dans la fraction résiduelle (F4) dans le site de Poses, sur le site de Oissel ils sont plutôt dans la fraction réductible (F2). Les métaux Pb, Zn et Ni ont quasiment la même distribution sur les deux sites, ils sont plus présent dans les fractions réactives. Le Cd est plus labile, présent majoritairement dans les deux premières fraction (plus de 85% à Poses et plus de 60% à Oissel).



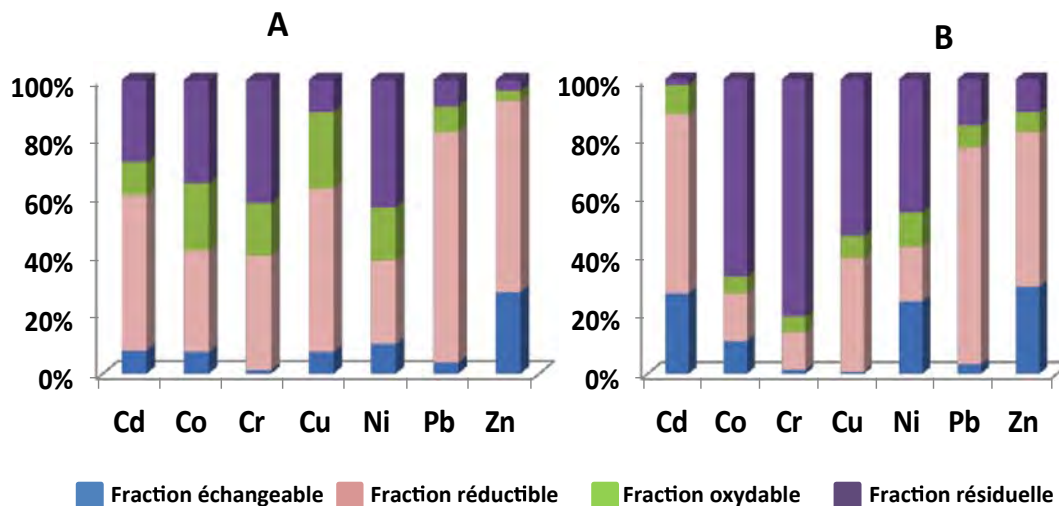


Figure 41 : Répartition des métaux en pourcentage entre les quatre fractions sédimentaires (A : Oissel, B: Poses)

Pour le Cr la distribution varie selon le site, il est surtout concentré dans la fraction résiduelle beaucoup moins labile, avec plus de 80% à Poses et moins de 40% à Oissel. La fraction réductible (oxyde et hydroxyde de fer et manganèse) est plus forte à Oissel (35%).

Pour les sédiments de Poses, la répartition permet de diviser les ETM en 3 groupes. Le premier rassemble le Cd, le Zn et le Pb, ils sont plutôt liés aux fractions échangeable et réductible (plus de 80%) donc plus labile, ces trois métaux sont connus pour leur affinité aux oxyde et hydroxydes de fer et manganèse (Luoma et al 1983). Le deuxième groupe comprend le Ni et le Cu qui sont principalement contenus dans la fraction résiduelle (50%). Le Cr et le Co sont classés dans le troisième groupe, ils sont associés à plus de 70% à la fraction résiduelle. D'après la répartition des ETM dans les sédiments du site de Poses, ils peuvent être classés selon leurs mobilités : Cd > Pb > Zn > Ni > Cu > Cr.

Suite aux résultats d'analyses des métaux totaux, de leur disponibilité et de l'évaluation de la toxicité induite ( $IT > 1$ ), le site de Poses a été choisi pour réaliser des expérimentations sur la remobilisation en fonction du temps. L'objectif principal est de préciser l'impact de phénomènes de remaniement des sédiments consécutifs aux événements de crues, de marées, de dragage ou de trafics sur la mobilité des contaminants métalliques. Lors de tels événements, les sédiments anoxiques sont remobilisés en milieu oxygène favorisant l'oxydation des phases soufrées et en conséquence la mobilité des métaux traces associés. Ainsi la toxicité potentielle des sédiments, plus facilement mobilisable, apparaît problématique. Nous avons focalisé les essais sur le site de Poses, les expériences de remobilisation ont consisté en une dispersion de quelques grammes de sédiment, conservé dans les conditions du milieu, dans un volume d'eau filtrée du site de l'étude. Le suivi de divers paramètres en fonction du temps (pH, T, Eh, concentrations des métaux...) permet d'envisager le devenir des contaminants métalliques suite à la remise en suspension du matériel sédimentaire. Le tableau 20 résume l'évolution des paramètres physico-chimiques (pH, potentiel d'oxydoréduction) pour les expériences réalisées avec différentes proportions eau-sédiment (400 mg/L, 1000 mg/L et 5000 mg/L).

Au cours de toutes les expériences de remise en suspension, l'évolution du pH est relativement commune pour les différentes expériences en suivant une augmentation de 7,2 jusqu' à 8,6 en fonction du temps.

Tableau 20 : Variation du pH et du potentiel redox (mV) en fonction du temps dans les trois expériences

Temps	400 mg/L Exp 1		1000 mg/L Exp 2		5000 mg/L Exp 3	
	pH	Eh (mV)	pH	Eh (mV)	pH	Eh (mV)
0 min.	7,64	273	7,35	292	7,24	214
1 min.	7,59	273	7,39	287	7,28	180
2 min.	7,6	271	7,41	285	7,34	181
3 min.	7,61	270	7,44	286	7,37	170
5 min.	7,63	267	7,48	283	7,47	178
10 min.	7,66	267	7,64	293	7,59	200
15 min.	7,67	267	7,76	298	7,66	217
30 min.	7,77	265	8,02	308	7,84	235
1 h	7,9	259	8,29	316	8,06	235
2 h	8,07	249	8,48	316	8,29	227
3 h	8,21	242	8,55	312	8,4	222
4 h	8,27	238	8,61	307	8,51	216
5 h	8,34	235	8,6	304	8,53	214
6 h	8,38	233	8,6	304	8,57	213
7 h	8,41	230	8,6	310	8,61	212
24 h	8,18	263	8,62	362	8,63	200
2 J	8,2	255	8,62	351	8,07	154
3 J	8,24	251	8,66	330	7,93	266
4 J	8,22	273	8,69	302	7,96	370
5 J	8,2	251	8,34	242	8,01	371
6 J	7,89	256	8,4	221	8,02	394
7 J	7,98	240	8,22	235	8,06	400
8 J	8,03	253	8,41	220	8,16	399
10 J	8,21	201	8,3	224	8,26	323

L'augmentation du pH est dû à la dissolution de la phase carbonate (caractéristique des sédiments de la Seine), elle vient tamponner le milieu et diminuer l'effet l'acidification due à l'oxydation de la matière organique. Cette hypothèse est bien validée par l'augmentation du calcium dissous par relargage et/ou dissolution sous forme hydrogénocarbonate (Figure 42).

Pour le potentiel d'oxydo-réduction, une diminution de ce paramètre est observée dans les premières minutes. Le milieu réactionnel semble s'oxyder lentement pour retrouver les mêmes conditions oxydantes après quelques jours de remobilisation.

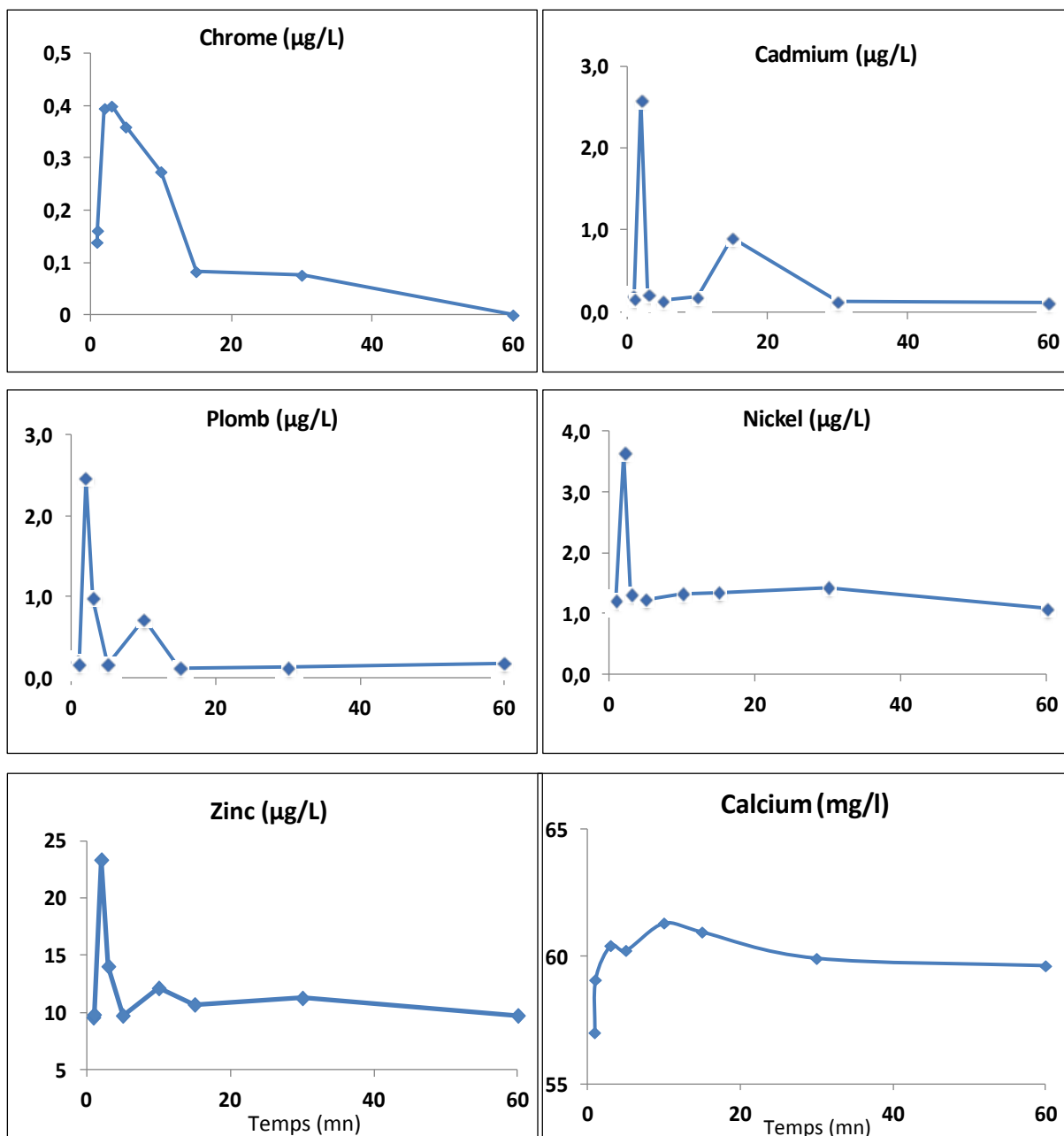


Figure 42 : Evolution de la concentration des éléments traces dans l'essai de remobilisation en fonction du temps (Expérience 1, 400 mg/L).

La figure 42 présente une partie des résultats de la remobilisation en fonction du temps. On observe un comportement presque similaire pour les différents métaux, avec une libération temporaire et conséquente en cadmium, chrome, plomb, nickel mais surtout en zinc, dans les premières minutes dû à une oxydation des sulfures et une dissolution des carbonates, ces résultats corrobore avec les travaux de Morse et Rickard (2004). Le zinc représentant plus de 50 % de la fraction SEM, il apparaît donc logique de retrouver ce métal dans de plus grande proportion dans les essais de remobilisation. Après dix minutes d'agitation, les concentrations diminuent fortement en conséquence des phénomènes d'adsorption et/ou de coprécipitation avec des hydroxydes de fer ou de manganèse ou sur des matières

humiques présentes (cas du Pb, (Evans, 1977)). Beaucoup de travaux de recherche ont été consacré au sujet de la remobilisation des métaux mais sans convergence appropriée vu la difficulté du nombre de phénomène se produisant simultanément et la compétition entre plusieurs réactions. Taillefert et al (2000) ont mis en évidence une remobilisation du Pb à l'interface eau-sédiment dans un milieu lacustre qu'ils ont attribué à la réduction des oxyhydroxydes de Fe et de la redissolution des complexes Fe-EPS (Substances Polymériques Exocellulaires). Cantwell and Burgess, (2004) ont trouvé que des maximums de cadmium et de nickel après 6 heures et 12 heures d'agitation respectivement. Kalnejais et al. (2010) ont montré que moins de 1% de plomb et 6% de cuivre de la phase particulaire sont été relargués après 90 heures d'incubation avec deux vitesses d'agitation. La plupart des auteurs ont montré que les caractéristiques de sédiments contrôlent la quantité des métaux relargués.

Le calcul du pourcentage de remobilisation des ETM permet de comparer la cinétique de relargage pour les différents métaux. Ce pourcentage est le rapport entre la concentration mesurée par relargage lors des essais de remobilisation et la concentration extraite par attaque acide (HCl 1M, extraction des SEM). A partir des calculs des pourcentages de remobilisation (Figure 43), on constate que **le Cd et le Ni sont les métaux les plus labiles et que pour l'ensemble des métaux le maximum de relargage est observé après deux minutes d'agitation suivi d'une augmentation après 4 jours de remobilisation.**

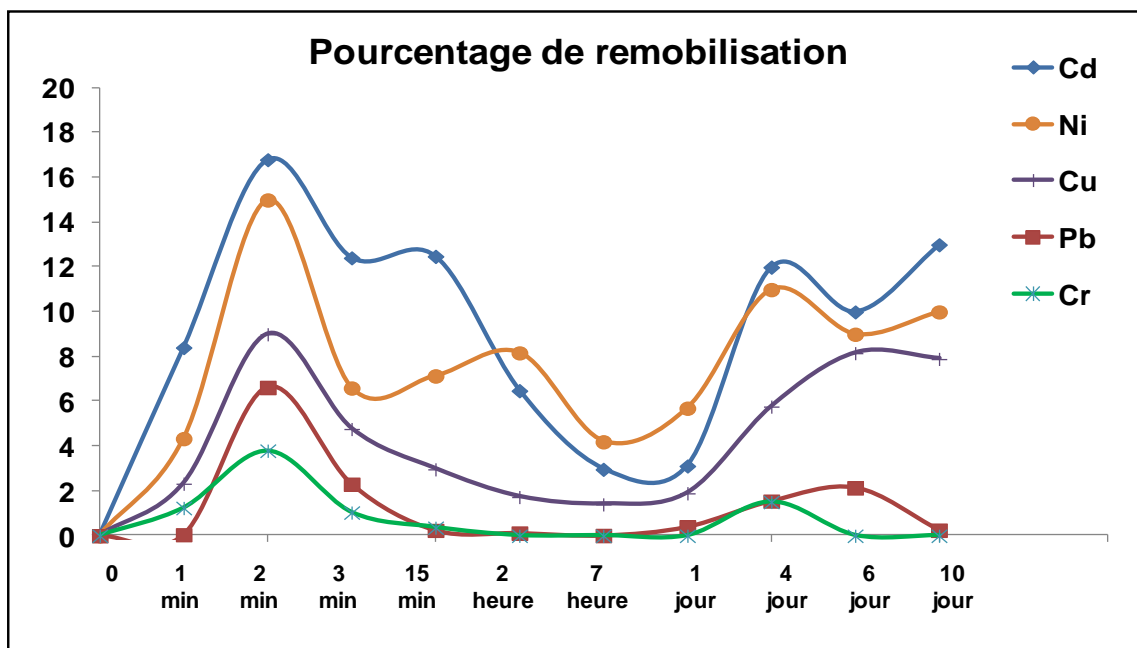


Figure 43 : pourcentage de remobilisation des métaux (400 mg sédiment / litre d'eau).

D'après les résultats de répartition des métaux on constate que le cadmium est le plus mobilisé, ceci peut être relié à sa présence dans les fractions les plus labiles (plus de 90 %). Il apparaît donc logique de retrouver ce métal dans la phase dissoute suite à une oxydation et une agitation avec un relargage maximum qui peut atteindre 16 % dans l'expérience1 (Figure 43). A l'opposé, le chrome est moins labile, le pourcentage de remobilisation maximum ne dépasse pas 4% ce qui est plutôt en accord avec le résultats de la répartition (présence à plus de 80% dans la fraction résiduelle). Pour confirmer ces résultats, une autre série d'expériences de remobilisation a été menée en utilisant un complexant,

l'EDTA qui a été rajouté à l'eau naturelle de Seine utilisée dans les essais de remobilisation. L'ajout d'un agent chélatant permet d'éviter la réadsorption des métaux relargués sur la phase solide du sédiment et d'estimer la quantité maximale de métaux remobilisables. Les résultats de cette expérience sont regroupés dans la Figure 44. Les concentrations des métaux en solution augmentent en fonction du temps pour se stabiliser après 2 heures et atteindre des concentrations de 3 µg/L pour le cadmium et environ 50 µg/L pour le cuivre et le plomb. Les pourcentages de remobilisation très élevés peuvent être atteints en présence d'un agent chélatant (plus de 90 % pour le Cd, Ni, Cu et Pb) confirmant ainsi la mobilité de ces métaux. A l'inverse pour le chrome et cobalt (moins labiles), le pourcentage de remobilisation est respectivement de 37 et 13% (Figure 44).

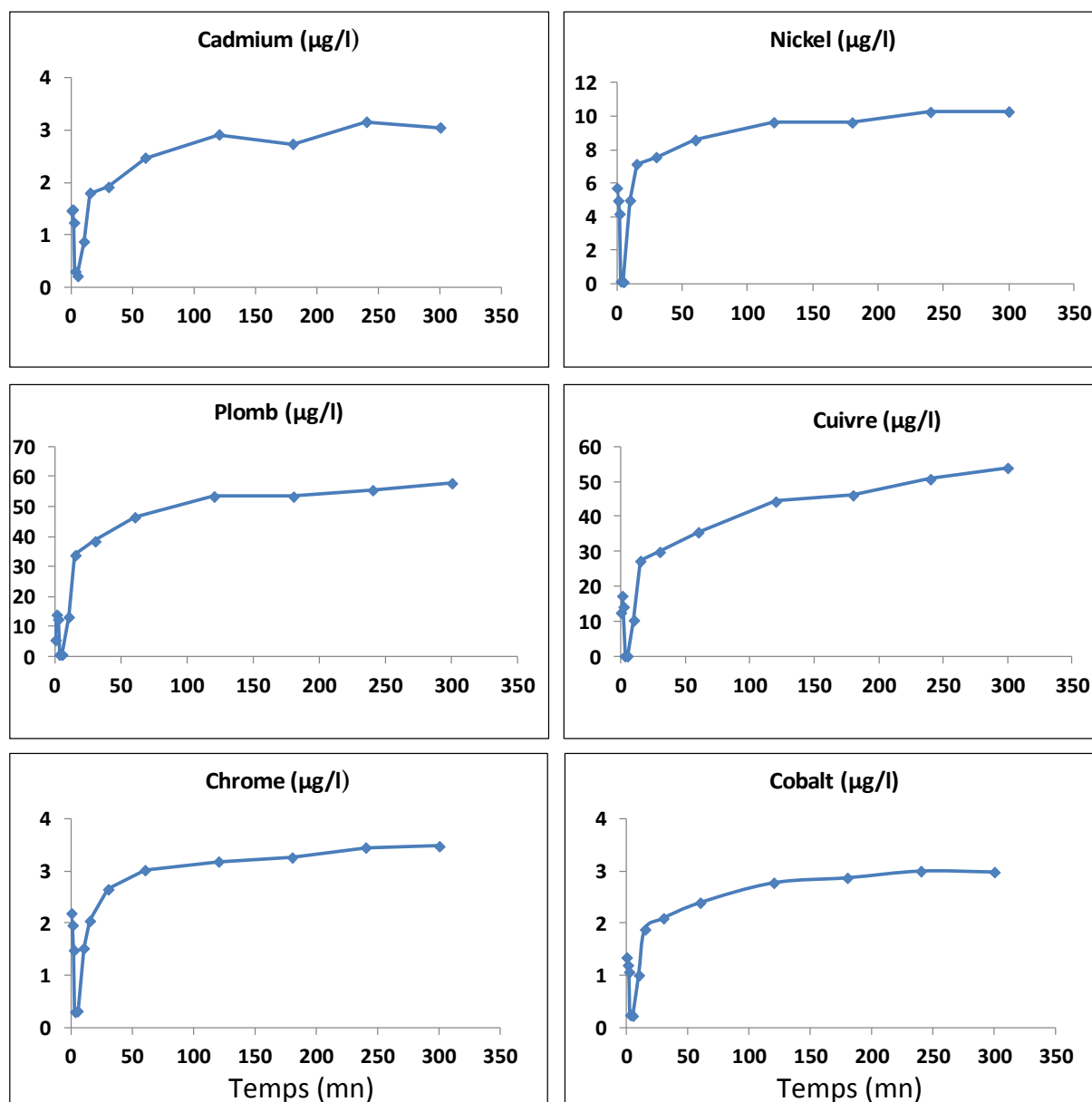


Figure 44 : Evolution de la concentration des éléments traces dans l'essai de remobilisation en fonction du temps en présence d'EDTA

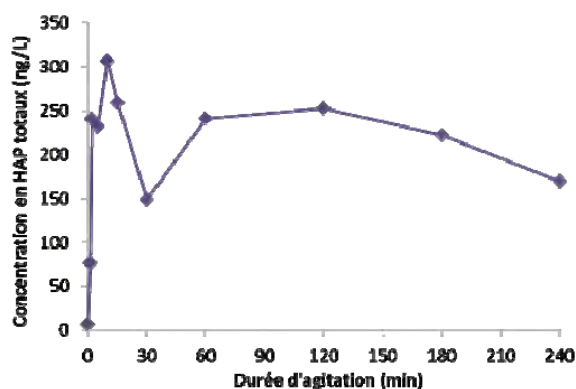
### 3.5.2 Cinétique de relargage des polluants organiques

Les conditions de remise en suspension du sédiment sont les mêmes que celles décrites dans le paragraphe précédent (3.5.1).

L'analyse des HAP a été réalisée sur 10 mL d'échantillon par micro-extraction sur phase solide (SPME) couplée avec la GC-MS (SPME-GC-MS) en mode immersion à l'aide d'une fibre SPME en polydiméthylsiloxane (PDMS 100  $\mu\text{m}$ ). L'analyse des PCB a été réalisée sur 10 mL d'échantillon par SPME-GC- $\mu\text{ECD}$  en mode (*Head Space*) à l'aide d'une fibre SPME en polydiméthylsiloxane (PDMS 100  $\mu\text{m}$ ). Les différents composés organiques suivis dans chaque classe sont indiqués dans la section 3.3.3.2.

Les concentrations en HAP totaux dans l'eau utilisée pour les tests de remise en suspension ( $t=0$  min) sont respectivement de 6 et 8 ng/L pour les expériences à 400 mg (Figure 45) et 5 g (Figure 46) de sédiment (Poses, décembre 2009). Dans l'expérience réalisée avec 400 mg de sédiment, un pic de relargage des HAP (70 ng/L) dans l'eau apparaît dès la première minute de remise en suspension du sédiment (Figure 45A). Si la plupart des HAP sont détectés, ce sont les HAP tri- et tétra-aromatiques qui présentent les concentrations individuelles les plus élevées (environ 5 ng/L), en particulier le fluoranthène et le pyrène (environ 20 ng/L). Les concentrations des HAP de haut poids moléculaire sont inférieures à 2 ng/L. Au-delà d'une minute d'agitation, seuls les HAP légers (di-aromatiques) sont détectés, laissant supposer que les HAP de plus hauts poids moléculaires se sont rapidement réadsorbés sur les particules de sédiment. Le naphthalène représente 94 à 98% de l'ensemble des HAP relargués avec des concentrations comprises entre 140 et 300 ng/L (à partir de 2 min d'agitation), les concentrations individuelles des autres HAP di-aromatiques restant inférieures à 10 ng/L (Figure 45B). Dans l'expérience réalisée avec 5 g de sédiment (Figure 46), seuls les HAP légers (di-aromatiques) ont été relargués dans l'eau après remise en suspension du sédiment, à l'exception de quelques traces de fluoranthène et de pyrène après 5 min et 60 min d'agitation (1 - 1,5 ng/L). Le naphthalène représente 88 à 98% de la somme des HAP retrouvés dans l'eau avec des concentrations comprises entre 270 et 430 ng/L. Les autres HAP, le fluorène et l'acénaphène, ont été détectés en concentrations individuelles variables (2 - 60 ng/L) (Figure 46B). En conclusion, seuls les HAP légers, et très majoritairement le naphthalène, sont relargués dans l'eau lors de la remise en suspension du sédiment et ce sans effet apparent de la durée de resuspension, exception faite ici de la première minute d'agitation de la plus petite quantité de sédiment testée (400 mg).

A



B

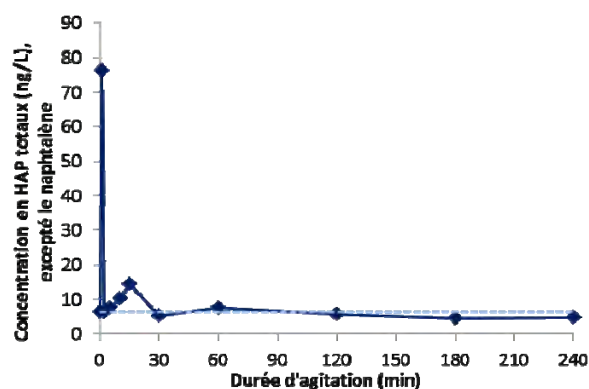


Figure 45 : Concentrations en HAP totaux (A) et en HAP totaux sans le naphthalène (B) en fonction de la durée de remise en suspension de 400 mg de sédiment (Poses, décembre 2009).

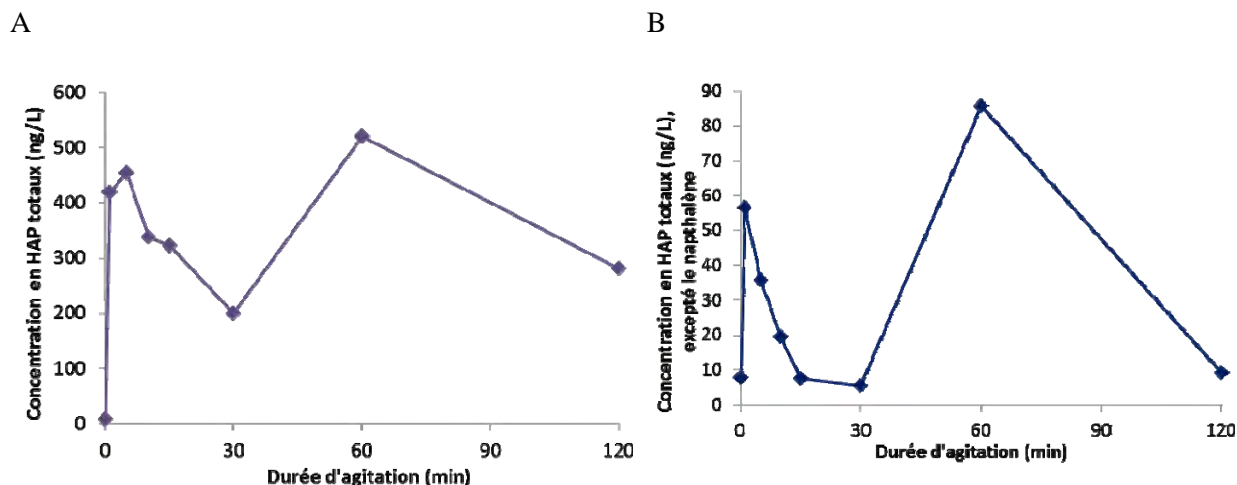


Figure 46 : Concentrations en HAP totaux (A) et en HAP totaux sans naphthalène (B) en fonction de la durée de remise en suspension de 5 g de sédiment (Poses, décembre 2009).

Les concentrations en PCB totaux dans l'eau utilisée pour les tests de remise en suspension ( $t=0$  min) sont respectivement de 1,6 et 1,8 ng/L pour les expériences à 400 mg et 5 g de sédiment (Poses, décembre 2009). Tout comme observé pour les HAP, **un pic de relargage des PCB (7 ng/L), bien que faible, apparaît dès la première minute de remise en suspension lors de l'expérience réalisée avec 400 mg de sédiment** (Figure 47A). Au-delà d'une minute d'agitation, aucun PCB n'est détecté en concentration significativement différente de celle déterminée à  $t=0$  min (concentrations totales des 8 congénères comprises entre 1 et 2 ng/L). **Dans l'expérience réalisée avec 5 g de sédiment** (Figure 47B), **aucun relargage de PCB dans l'eau n'est observé, quelle que soit la durée de remise en suspension du sédiment**. Les concentrations en PCB totaux sont également comprises entre 1 et 2 ng/L. Néanmoins, les congénères tri- et tétra-chlorés (CB28, CB50 et CB52) présentent des concentrations individuelles très légèrement supérieures dans l'eau après 15 et 30 min d'agitation (0,5 ng/L).

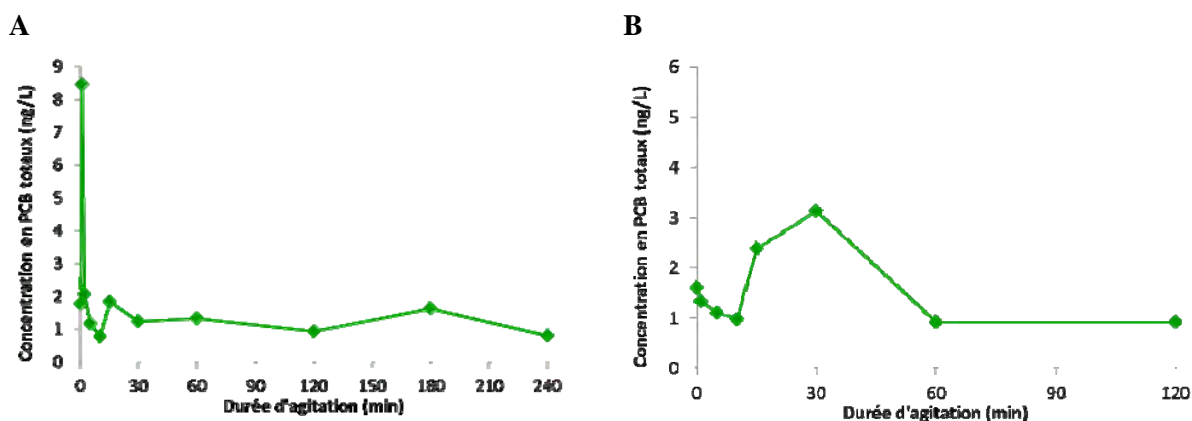


Figure 47: Concentrations en PCB totaux en fonction de la durée de remise en suspension de 400 mg (A) ou 5 g (B) de sédiment (Poses, décembre 2009).

### 3.5.3 Cinétique d'induction de la toxicité

Les tests Microtox® sur des échantillons d'eau filtrée, issu des expériences de remobilisation, n'entraînent pas d'inhibition sur les *Vibrio fischeri* pour l'expérience à 400 mg de sédiment/litre d'eau de Seine, par contre la remobilisation à 5 g/L entraîne jusqu'à 15% d'inhibition après une minute et 30 minutes d'agitation (Tableau 21). Le pourcentage d'inhibition varie en fonction du temps et peut atteindre 44 % après 15 minutes d'agitation pour l'essai de remobilisation à 10 g/L. La toxicité des eaux après remobilisation des sédiments est bien confirmée par ces expériences et l'effet observé peut être la combinaison de plusieurs facteurs (présence des éléments métalliques, organiques, ...). Au vu de ces données il apparaît que la toxicité des échantillons vis-à-vis la *Vibrio fischeri* est proportionnelle à la quantité de sédiments pollués remis en suspension.

Tableau 21 : Résultats des essais Microtox effectués dans des expériences de remise en suspension de sédiment de Poses

Temps	Echantillon	% d'inhibition de <i>Vibrio Fischeri</i>		
		( 0,4 g/L)	( 5 g/L)	( 10 g/L)
0 min	Eau filtrée	Pas d'inhibition	Pas d'inhibition	Pas d'inhibition
1 min	Eau filtrée	Pas d'inhibition	14.8 %	19.7 %
2 min	Eau filtrée	Pas d'inhibition	7.8 %	31.1%
5 min	Eau filtrée	Pas d'inhibition	4.8 %	29 %
10 min	Eau filtrée	Pas d'inhibition	3.4 %	34 %
15 min	Eau filtrée	Pas d'inhibition	4.3 %	44%
30 min	Eau filtrée	Pas d'inhibition	15 %	43%



### 3.6 Identification des substances toxiques

L'approche TIE est une méthode d'identification de polluants qui couple des analyses chimiques à des procédures de fractionnement de l'échantillon suivies de bioessais. Ces fractionnements successifs de l'échantillon (séparations chromatographiques nombreuses et variées) permettent d'éliminer spécifiquement certaines classes de composés et donc de simplifier et de diviser la complexité des échantillons environnementaux de façon à mettre en évidence les substances responsables de la toxicité observée dans l'échantillon total. A chaque étape, la toxicité des fractions est évaluée et seules les fractions toxiques sont soumises à un nouveau fractionnement chimique. *In fine*, les fractions identifiées comme toxiques font l'objet d'une analyse moléculaire qualitative et quantitative par différentes techniques analytiques appropriées. Parmi tous les extraits réalisés dans le cadre de ce programme, l'extrait du sédiment de Poses de décembre 2009 présentant un fort potentiel génotoxique a été retenu pour la mise en place de cette approche.

#### 3.6.1 Fractionnement de l'échantillon et mesure de toxicité des fractions

Le sédiment lyophilisé a été extrait par extraction en solvant par chauffage sous pression (ASE, *Accelerated Solvent Extraction*) en utilisant un mélange dichlorométhane/acétone (50/50 v/v). Un aliquote de l'extrait a été reconcentré (X50) et repris dans du diméthylsulfoxyde. Le potentiel génotoxique de cet extrait a été mesuré à l'aide du test SOS Chromotest avec et sans ajout d'une fraction microsomale S9.

Le reste de l'extrait a ensuite été préfractionné par extraction sur phase solide (SPE) sur cartouche de silice (Supelclean LC-Si) et 4 fractions de polarité croissante ont été obtenues par éluions successives avec de l'heptane (fraction 1, notée F1), puis un mélange dichlorométhane/heptane (F2), puis de l'acétate d'éthyle (F3) et enfin un mélange méthanol/eau MilliQ (F4). Un blanc de manipulation (solvants uniquement) a été fractionné selon la même procédure. Les fractions ont été reconcentrées et reprises dans du diméthylsulfoxyde, puis soumises au test SOS Chromotest. Les 2 préfractions F1 et F3 se sont révélées positives avec et sans S9 (Tableau 22). Selon ce protocole, la fraction F1 contient des composés hydrophobes (par exemple, les PCB, pesticides organochlorés, HAP, d'après le fractionnement d'une solution étalon contenant des composés de polarités très variées) et la fraction F3 contient des composés moyennement polaires (par exemple, les hormones, substances pharmaceutiques).

Tableau 22 : Potentiel génotoxique (IF moyen  $\pm$  écart-type) des différentes fractions organiques isolées à partir du sédiment de Poses de décembre 2009. Seules les réponses significativement différentes du témoin solvant ont été indiquées.

	SOS -S9	SOS +S9
Blanc d'extraction fraction totale	-	-
Fraction totale	8,85 $\pm$ 0,16	4,07 $\pm$ 1,3
Blanc d'extraction fraction F1	-	-
Fraction F1	1,45 $\pm$ 0,21	1,89 $\pm$ 0,04
Blanc d'extraction fraction F2	-	-
Fraction F2	-	-
Blanc d'extraction fraction F3	-	-
Fraction F3	2,06 $\pm$ 0,07	1,57 $\pm$ 0,07
Blanc d'extraction fraction F4	-	-
Fraction F4	-	-

Chacune des préfractions F1 et F3 est divisée en deux et une des aliquotes est reprise dans un mélange eau/acétonitrile puis ensuite hyperfractionnée par chromatographie liquide haute performance (CLHP) en mode inverse sur colonne greffée C18. Quarante hyperfractions de polarité décroissantes sont alors récupérées en utilisant un gradient eau/acétonitrile (de 20 à 100% acétonitrile à 1 mL/min sur 120 min). Un blanc de manipulation a été hyperfractionné selon la même procédure. Les 120 hyperfractions ont ensuite été soumises au test SOS Chromotest.

Parmi l'ensemble des hyperfractions analysées seules deux fractions apparaissent génotoxiques. La fraction F3-16 après bioactivation (+S9) et la fraction F3-26 sans bioactivation (-S9). En revanche aucune des sous-fractions produites à partir de la fraction F1 n'est apparue positive. Il se pourrait que la procédure (aliquotage, hyperfractionnement et changement de solvants) ait conduit à de légères pertes pour les composés hydrophobes de cette fraction, amenant les teneurs des substances toxiques à des niveaux inférieurs au seuil de détection du SOS Chromotest. A titre d'exemple, le chromatogramme CLHP de la préfraction F3 du sédiment de Poses est représenté à la Figure 48, en dessous du chromatogramme de la solution étalon utilisée pour calibrer l'appareil (contrôle qualité pour le fractionnement). Parmi les 40 hyperfractions obtenues, les hyperfractions F3-16 et F3-26 identifiées comme génotoxiques sont surlignées en orange.

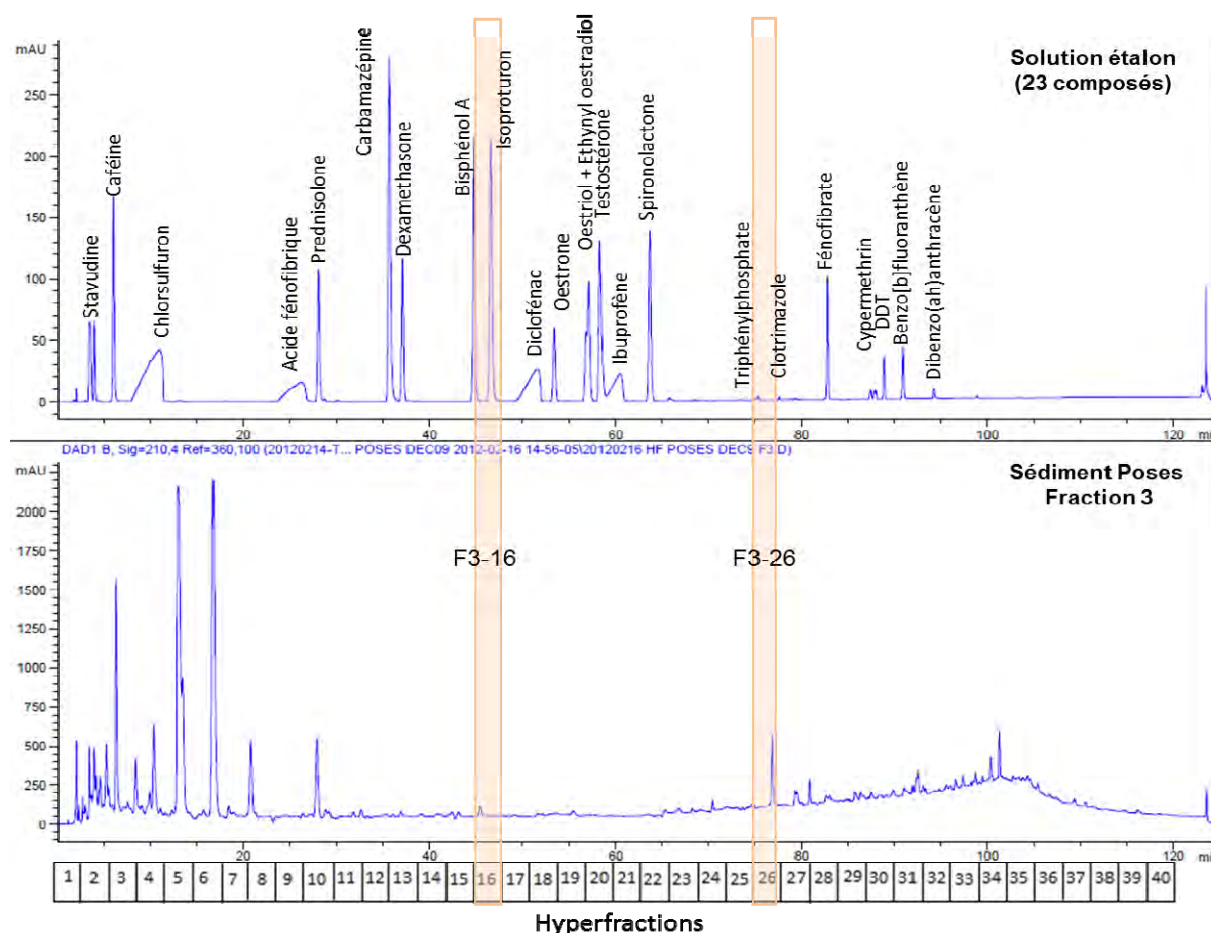


Figure 48 : Chromatogrammes CLHP d'une solution étalon de 23 composés appartenant à différentes classes (HAP, pesticides, stéroïdes et glucocorticoïdes, substances pharmaceutiques) et de la préfraction F3 du sédiment de Poses (décembre 2009). Le numéro des hyperfractions collectées toutes les 3 min est indiqué sous le chromatogramme. Les 2 hyperfractions F3-16 et F3-26 de la préfraction F3 du sédiment de Poses identifiées comme génotoxiques sont surlignées en orange.

### 3.6.2 Caractérisation chimique des hyperfractions génotoxiques

Les 2 hyperfractions identifiées comme génotoxiques (F3-16 et F3-26) ont été analysées par chromatographie en phase liquide couplée à la spectrométrie de masse haute résolution (LC-QTOF) afin d'identifier les composés potentiellement responsables des effets observés. De façon générale, la démarche d'identification de composés inconnus se déroule en deux étapes d'analyse. Une première analyse en MS simple haute résolution (TOF) permet, à partir des spectres de masse, de calculer la composition chimique élémentaire des molécules ionisées pour tous les composés détectés ; l'affectation ultime de l'identité du composé est ensuite effectuée grâce à une deuxième analyse en MS en tandem (MS/MS : Q-TOF) ciblée sur les ions précurseurs (molécules ionisées) sélectionnés dans la première analyse.

Chaque hyperfraction de sédiment, ainsi que l'hyperfraction du blanc analytique correspondante, a d'abord été analysée en MS haute résolution (TOF), et ce en testant différents types de sources (ESI, Jet Stream ESI, APCI) dans les deux modes d'ionisation (positif et négatif) de façon à détecter le plus grand nombre de composés possibles. Les analyses réalisées en Jet Stream ESI en mode positif (ESI+) se sont avérées les plus adaptées ici.

Pour chaque chromatogramme obtenu, le logiciel de traitement de données détecte des composés à partir des masses exactes des ions formés (ainsi que des abondances isotopiques). Il est ensuite possible de comparer les composés détectés dans les hyperfractions positives de sédiment et ceux présents dans les hyperfractions du blanc de procédure correspondantes. A titre d'exemple, le profil des masses des molécules détectées dans la fraction F3-26 du sédiment de Poses et la fraction F3-26 du blanc est représenté à la Figure 49. N'ont été sélectionnés pour la suite de l'étude que les composés présents uniquement dans l'hyperfraction positive de sédiment (ou beaucoup plus abondants que dans le blanc) (en exemple sur la Figure 49, une molécule protonée de masse exacte 277,0781 Da identifiée uniquement dans l'hyperfraction de sédiment, au temps de rétention de 17,68 min).

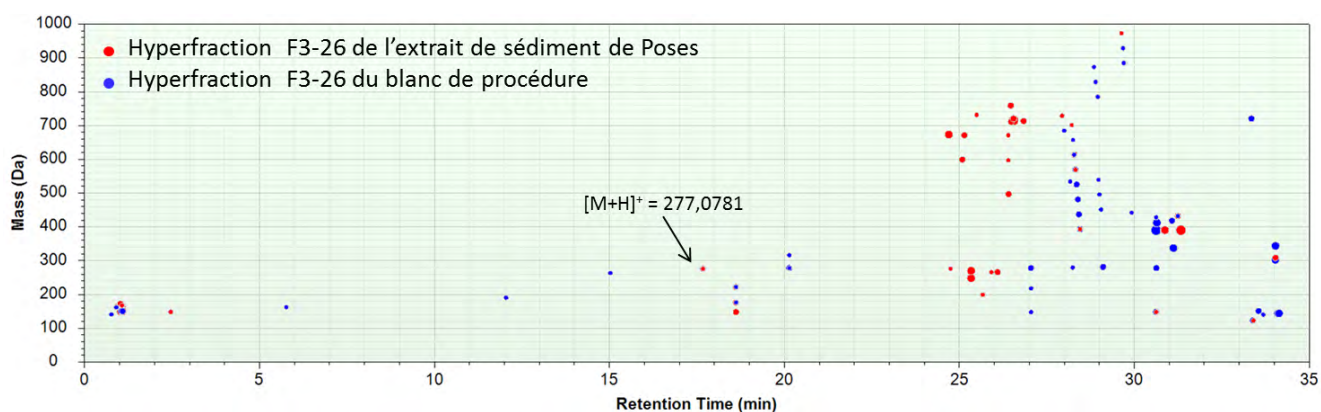


Figure 49 : Profils de masse obtenus en fonction du temps de rétention des composés dans les hyperfractions F3-26 de l'extrait de sédiment de Poses (en rouge) et du blanc de procédure analytique (en bleu). Chaque point représente un composé identifié. En exemple, une molécule protonée de masse exacte 277,0781 Da identifiée uniquement dans l'hyperfraction de sédiment.

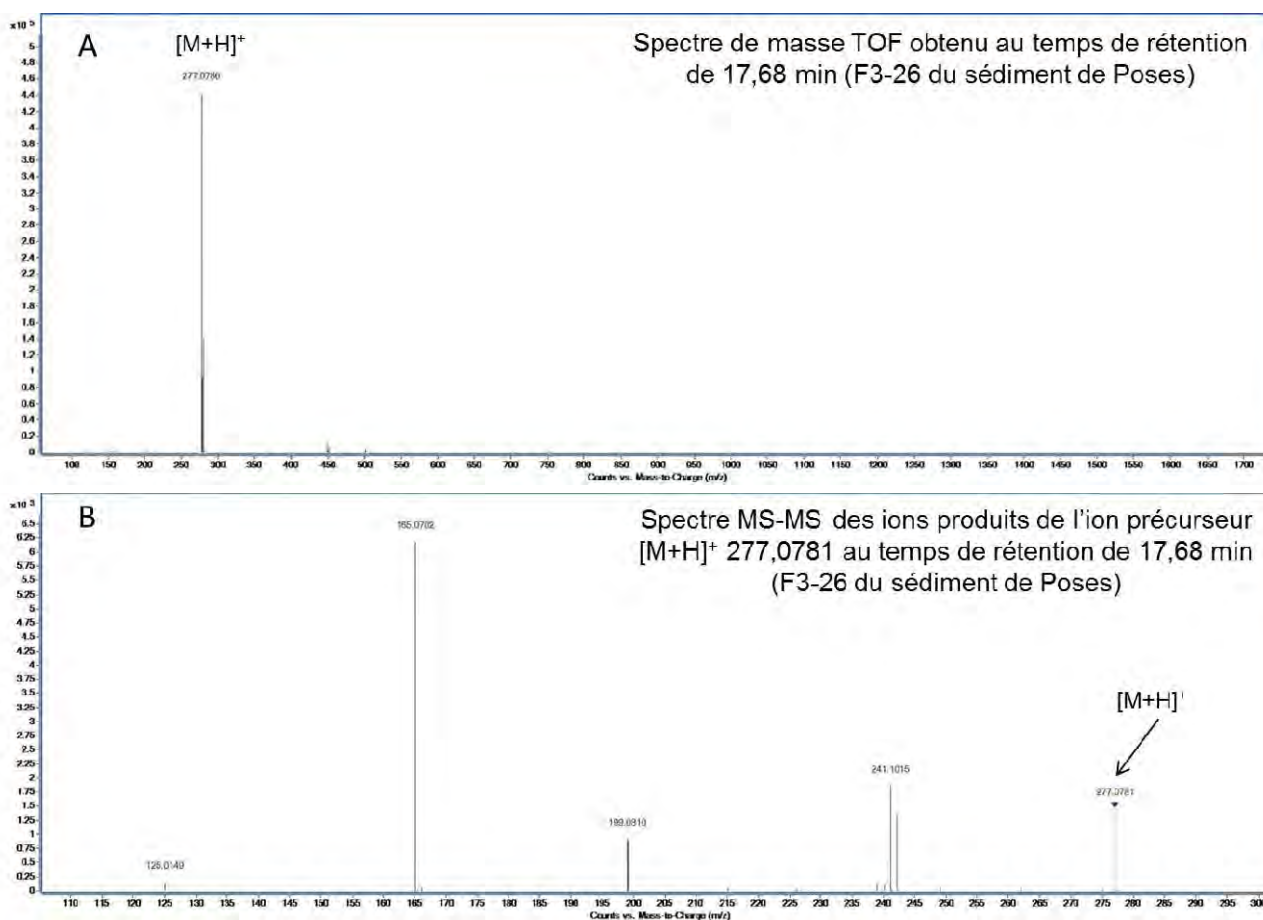


Figure 50 : A) Spectre de masse TOF obtenu au temps de rétention de 17,68 min (correspondant à molécule protonée indiquée sur la Figure 49) dans l'hyperfraction F3-26 de l'extrait de sédiment de Poses (2009). B) Spectre de masse MS/MS des ions produits issus de la fragmentation de l'ion précurseur [M+H]<sup>+</sup> 277,0781 Da au temps de rétention de 17,68 min (F3-26 de Poses).

A partir de leur masse exacte, le logiciel de traitement de données peut également générer une liste de formules moléculaires possibles, à chacune d'entre elles étant assigné un score (probabilité d'adéquation entre la masse mesurée et celle de la formule chimique proposée). Si cette liste peut être encore réduite en appliquant des paramètres choisis par l'utilisateur, des dizaines de formules peuvent malgré tout être proposées pour une masse donnée, sachant de plus que des dizaines voire des centaines de molécules peuvent posséder la même formule brute. Les noms des composés possédant les compositions chimiques les plus probables (ayant le meilleur score) pour une masse donnée ont été recherchés dans différentes bases de données (exemple : Chempidier). Les spectres de masse des composés ciblés ont ensuite été générés de façon à sélectionner les ions clés (les ions précurseurs, c'est-à-dire les molécules protonées) (exemple de l'ion précurseur de masse 277,0781 Da sur la Figure 50A). Afin d'identifier les composés détectés, c'est-à-dire de réduire au maximum la liste des candidats les plus probables, une deuxième analyse de chaque hyperfraction a donc ensuite été réalisée en MS/MS (Q-TOF) sur les ions précurseurs ciblés (ceux uniquement présents dans l'échantillon de sédiment), et ce en faisant varier l'énergie de collision de façon à obtenir un degré de fragmentation suffisant pour l'élucidation structurale (exemple de l'ion précurseur de masse 277,0781 Da sur la Figure 50B). Au final, la confirmation est basée sur l'ensemble des données obtenues (masse exacte de la molécule protonée, son profil isotopique, masse exacte des ions produits, le profil de fragmentation ...) par comparaison avec celles (théoriques) calculées pour la formule moléculaire proposée. Plus le

score calculé par le logiciel est élevé, plus la formule moléculaire proposée a de probabilité d'être la formule correcte.

Des recherches en banque de données de masses exactes et en bibliothèque MS/MS ont également été menées mais **aucun composé détecté n'a pu être identifié avec certitude dans les différentes hyperfractions analysées**. Si différentes molécules, pour lesquelles des formules moléculaires ont été proposées avec un score supérieur à 90%, ont été détectées en mode TOF dans chaque hyperfraction de sédiment (non présentes dans le blanc de procédure), aucune confirmation fiable de ces formules moléculaires n'a été possible en mode MS/MS ; les scores calculés de correspondance entre les spectres de masse des ions produits et ceux des principaux ions attendus pour les formules moléculaires proposées étant généralement inférieurs à 80%, les composés n'ont donc pu être identifiés de façon certaine dans les 2 hyperfractions, à l'exception d'un seul présent dans le fraction F3-26 du sédiment. Ce composé de masse monoisotopique 276,0712 Da (masse de la molécule protonée de 277,0781 Da) est celui utilisé ici en exemple aux Figures 49 et 50. Dix-huit formules chimiques ont été proposées pour cette masse et, parmi les 3 possédant un score supérieur à 90%, la formule C<sub>19</sub>H<sub>13</sub>Cl est la structure très probable (score de 97%). Parmi les 12 composés de formule C<sub>19</sub>H<sub>13</sub>Cl, le spectre de masse MS/MS obtenu permet d'identifier de façon très probable le composé comme étant un des **isomères du chloromethylbenzo[a]anthracène**, composés dont les scores sont les plus élevés (94%) (une illustration est donnée à la Figure 51). Néanmoins, des isomères chloromethylbenzo[c]phenanthrènes et chlorophenylfluorènes présentant des scores de compatibilité acceptables (83 – 90%) ne sont pas à exclure totalement. Pour confirmer l'identité du composé, il serait nécessaire d'analyser de la même façon les composés standards de référence, s'ils sont disponibles commercialement. Dans un deuxième temps, il serait également nécessaire de confirmer le potentiel génotoxique du composé identifié à l'aide du test SOS Chromotest (sans S9). Cette étude souligne *in fine* toute la difficulté de la mise en œuvre d'une telle approche, qui nécessiterait un projet à part entière.

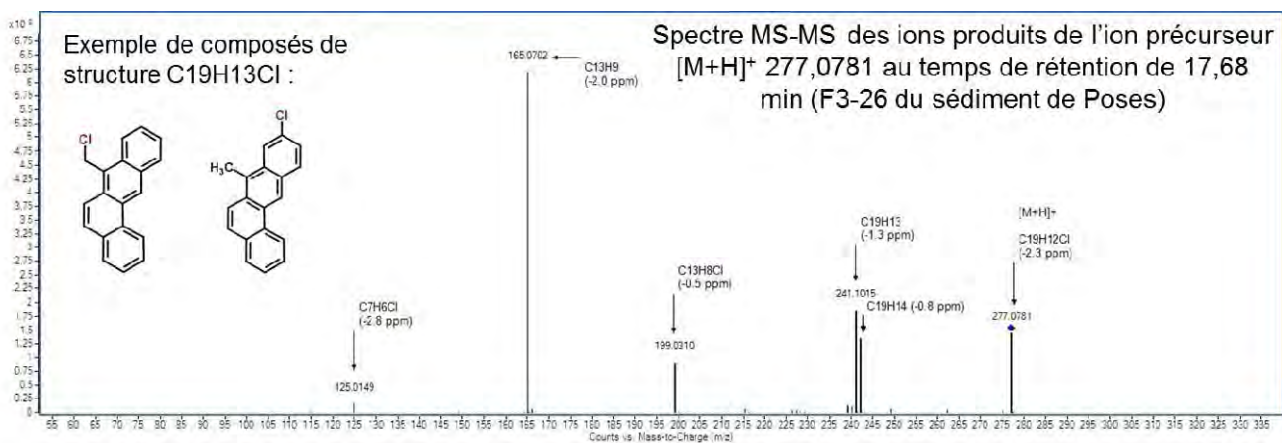


Figure 51 : Spectre de masse MS/MS des ions produits issus de la fragmentation de l'ion précurseur  $[M+H]^+$  277,0781 Da (F3-26 de Poses) sur lequel sont indiqués les fragments correspondants à la structure C<sub>19</sub>H<sub>13</sub>Cl. En exemple sont donnés 2 des 4 isomères chloromethylbenzo[a]anthracènes possédant le score le plus élevé (94%) : le 7-(chloromethyl)-benzo(a)anthracène (à gauche) et le 9-chloro-7-methyl-benzo(a)anthracène (à droite).

#### 4. Retombées opérationnelles directes et/ou indirectes du projet

Ce projet apporte des données nouvelles sur la dynamique des contaminants piégés dans le compartiment sédimentaire et la toxicité qui peut en résulter lors d'une remise en suspension des sédiments. Ces informations sont fondamentales pour comprendre le devenir des polluants adsorbés aux sédiments et le risque écotoxicologique qu'ils peuvent faire peser sur les organismes aquatiques.

Au cours de ce projet deux nouveaux bioessais ont été développés sur les premiers stades de développement d'un microcrustacé estuarien *E. affinis* et sur deux poissons euryhalins le médaka japonais et la truite arc-en-ciel. Ces bioessais ont montré ici tout leur intérêt pour la mesure de la toxicité de substances hydrophobes ou de matrices sédimentaires (sédiments, matières en suspension, boues ...). Après une phase de standardisation voire une normalisation, ces bioessais pourront être utilisés pour l'évaluation prédictive de la toxicité de nouvelles substances chimiques (REACH, AMM...) ou pour l'évaluation réglementaire de la qualité des milieux aquatiques (DCE, SMM...).

Un travail encore préliminaire a permis de fixer quelques valeurs guides pour les sédiments (PNECséd) pour un certain nombre de polluants aquatiques de type HAP, PCB ou métaux lourds. Il reste à compléter ce jeu de données par l'analyse d'autres molécules qui pourraient potentiellement être retrouvées dans les sédiments notamment des pesticides organochlorés, des composés organo-halogénés, certains médicaments et d'autres éléments traces métalliques.

Cette étude a permis une évaluation et une cartographie de la toxicité des sédiments superficiels en Seine. Cette première cartographie permet de mettre en évidence des points chauds de toxicité notamment au niveau de Poses. Cette étude a également permis une étude rétrospective de la toxicité en Seine. L'ensemble de ce travail permettra d'orienter les études ultérieures sur les sites à risques et d'aider les pouvoirs publics dans leur politique de restauration écologique de l'estuaire de Seine.

#### 5. Conclusions

Ces travaux ont permis de développer et de valider deux nouveaux bioessais embryo-larvaires pour l'évaluation de la toxicité de substances hydrophobes ou d'échantillons environnementaux (sédiments, matières en suspension, boues de dragage, boues de station d'épuration...), l'un sur nauplii du microcrustacé estuarien *Eurytemora affinis* et l'autre sur embryons de poisson Médaka Japonais *Oryzias latipes*. Un test similaire sur le salmonidé *Oncorhynchus mykiss* est en cours de développement. Les conditions d'exposition, le choix des paramètres de toxicité, le protocole d'enrobage des sédiments ont été définis et validés avec plusieurs polluants organiques et inorganiques modèles. Les deux bioessais sont sensibles puisqu'ils permettent de mesurer la toxicité de nombreux polluants aquatiques à des concentrations proches ou même inférieures aux concentrations environnementales (Cd, Cu, Fluoranthène BaP, PCB153, nonylphénol, BaP ...). Le test microcrustacé est de plus courte durée (6j) et semble-t-il plus sensible que le test sur embryons de médaka. Il permet de suivre en plus de la survie, un trait d'histoire de vie qui est la croissance. Son inconvénient majeur est l'absence à l'heure actuelle d'une souche de laboratoire parfaitement caractérisée. Le test sur embryon de médaka est un peu plus lourd à mettre en œuvre (14j) mais permet de suivre d'avantage de paramètres notamment le succès d'éclosion et les dommages à l'ADN. Un effort devrait être fait dans l'avenir pour la standardisation voir la normalisation de ces deux bioessais.

Ces deux bioessais ont permis de définir de nouveaux seuils de toxicité pour un certain nombre de polluants présents dans les sédiments de l'estuaire de Seine (NOEC et LOEC sédiment) ainsi que des normes de qualité environnementales pour les sédiments (NQE sédiment). A l'heure actuelle la plupart des NQE sédiment sont calculées par la méthode dite du coefficient de partage (E.C., 2010) en raison du manque de données écotoxicologiques sur organismes benthiques. L'inconvénient majeur de cette méthode c'est qu'elle ne prend pas en compte toutes les spécificités du compartiment sédimentaire (nature, granulométrie, richesse en matière organique, potentiel oxydo-rédox, pH ... ) qui peuvent modifier l'accumulation et la biodisponibilité des polluants et la sensibilité des organismes benthiques à ces polluants. Cette méthode bien qu'ayant le mérite d'exister est donc imparfaite pour évaluer la toxicité d'une substance dans un sédiment. Le développement de nouveaux bioessais fiables reproductible et sensibles sur des organismes benthiques est donc une nécessité afin de pouvoir calculer des NQE pertinents et fiables qui garantissent la protection des communautés benthiques. En appliquant la méthode TGD (98/8/EC) pour dériver des NQE sédiment à partir des valeur de NOEC obtenues expérimentalement sur *E. affinis* et *O. latipes* on arrive à des seuils de concentrations très faibles souvent bien inférieurs aux valeurs retrouvées dans les sédiments de Seine. Ceci peut s'expliquer d'une part par la sensibilité élevée des organismes utilisés dans ces bioessais (stades précoces de développement de poisson et de micro-crustacé), par les conditions particulières de l'essai (sédiment naturel dopé) et par la très grande sensibilité de certains marqueurs de toxicité utilisés (malformations, dommages à l'ADN ...). Bien que ces données n'aient pas été produites avec des tests standardisés, elles mériteraient d'être prises en compte pour l'évaluation des risques en Seine.

La carotte sédimentaire récupérée dans le bassin des docks du port de Rouen de 110 cm de long couvre une 15<sup>aine</sup> d'années d'archives sédimentaires. Cette carotte majoritairement constituée de silt est très homogène du point de vue physico-chimique. L'analyse des contaminants a révélé des teneurs élevées en éléments traces métalliques et notamment en mercure avec des concentrations qui augmentent nettement de la surface vers les couches les plus profondes. De même des teneurs relativement élevées en HAP, PCB et pesticides organochlorés ont été mesurées et un enrichissement avec la profondeur a été constaté. Les PBDE sont faiblement représentés dans la carotte quelle que soit la profondeur. Par ailleurs il a été observé une décroissance marquée des teneurs en PCB sur les 40 derniers cm qui pourrait traduire une diminution des apports en Seine. Les extraits aqueux préparés à partir des différents tronçons de la carotte apparaissent modérément cytotoxiques et ne montrent pas de réelle augmentation avec la profondeur. Par ailleurs une faible activité oestrogénique a été mesurée sur les extraits organiques de sédiment. En revanche, une génotoxicité modérée a été révélée en surface et sur les tronçons situés entre 65 et 80 cm de profondeur. L'activité neurotoxique (inhibitrice acétylcholine estérase) mesurée sur ces mêmes extraits apparaît plus élevée dans la partie supérieure de la carotte notamment entre 10 et 65 cm de profondeur.

Au cours de cette étude une cartographie de l'évolution spatio-temporelle de la contamination et de la toxicité du compartiment sédimentaire en estuaire de Seine a été réalisée. La contamination métallique est importante pour les éléments tels que le Cd, Zn, et Hg et plus modérée pour le Pb et le Cu. Un gradient de dilution amont-aval marqué a été observé pour la plupart des métaux traces. Le gradient de contamination par les polluants organiques est moins marqué. Des teneurs élevées en HAP ont été relevées en février 2009 à Poses et à Caudebec. Pour les pesticides organochlorés et les PCB, les plus fortes concentrations ont été mesurées au niveau de la vasière nord (Pont de Normandie). La toxicité des sédiments varie sensiblement selon les sites, la saison et selon le test utilisé. Les sédiments de Poses apparaissent néanmoins comme les plus toxiques quel que soit le test utilisé (exception faite du test sur *Corophium sp.*). Des variations saisonnières importantes de toxicité ont été observées

notamment au niveau du site de Duclair. A partir des niveaux de contamination et des toxicités mesurés, une cotation des niveaux de danger a été proposée pour les sédiments de l'estuaire de Seine (Tableau 19). Les niveaux de dangers les plus élevés ont été relevés dans les sédiments de la partie amont de l'estuaire et notamment à Poses et dans une moindre mesure à Oissel et La Bouille. Le niveau de danger apparaît en revanche beaucoup plus limité pour les sédiments de la partie aval de l'estuaire notamment pour Quillebeuf et la vasière nord. Une variabilité saisonnière des niveaux de danger s'observe certains sites de l'estuaire moyen notamment à Duclair où le danger se limite à la période hivernale. Il faut garder en tête que l'ensemble des analyses a été réalisé sur des sédiments récents correspondants aux premiers centimètres de dépôt. Ces dépôts sédimentaires sont par nature très labiles et sont sans cesse renouvelés par érosion ou déposition de matières en suspension. Il n'est donc pas aberrant de voir évoluer la charge en contaminants et la toxicité de ces sédiments au cours du temps. Pour ce qui concerne le site de Duclair, on peut émettre l'hypothèse qu'une source locale de pollution (activités liées au bac) associée à une moindre activité microbienne en hiver puisse expliquer une toxicité plus élevée des sédiments collectés en période hivernale. Pour les études futures il conviendrait de focaliser les travaux sur le site de Poses. Ce site apparaît particulièrement préoccupant pour deux raisons : (i) les sédiments de ce site présentent un niveau de danger élevé quelle que soit la période de l'année considérée et (ii) ils peuvent facilement être remobilisés par un phénomène de chasse lors de l'ouverture des vannes du barrage.

Les expériences réalisées avec différentes concentrations de sédiment de Poses de décembre 2009 ont permis d'étudier la cinétique de relargage des micropolluants organiques et métalliques et la toxicité induite. Elles ont permis de montrer que certains métaux tels que le Cd et le Ni sont très mobiles et que la maximum de relargage dans la colonne d'eau intervient au bout de deux minutes et après 4 jours. Les HAP de faibles poids moléculaires (2 à 4 noyaux) peuvent également être relargués dans la colonne d'eau dès la première minute de resuspension du sédiment. Ce déstockage des HAP est plus limité lorsque la concentration en sédiment augmente de 0,4 à 5g. Les PCB en revanche sont peu ou pas relargués quelle que soit la concentration en sédiment. Cependant, les essais de remobilisation en laboratoire ont quelques limites liées principalement à la nature, aux méthodes de prélèvement et de conservation du sédiment. La toxicité induite mesurée par le test Microtox® augmente avec le temps et se stabilise autour de 40% au bout de 15 minutes (pour 5g de sédiment). Cette toxicité croît avec la concentration en sédiment remis en suspension. Ce travail exploratoire doit être poursuivi pour caractériser les conditions de déstockage d'une plus grande variété de polluants notamment organiques et mesurer plus précisément la toxicité induite (avec d'avantage de bioessais et plus ciblés sur un mode d'action).

Une approche TIE (*Toxicity Identification Evaluation*) a été mise en œuvre afin de caractériser les composés ou les familles chimiques des molécules potentiellement à l'origine de l'activité génotoxique observée dans certains sédiments. Aucun des composés détectés dans les fractions ultimes des extraits du sédiment de Poses n'a pu être identifié de façon certaine. Néanmoins, l'un d'entre eux pourrait être de façon très probable un des isomères chloromethylbenzo[a]anthracènes, proposés avec un score de concordance supérieur de 94%. Cette étude souligne toute la difficulté de la mise en œuvre d'une telle approche, qui nécessiterait un projet à part entière. Les rares travaux existants sur le fractionnement d'échantillons, basés sur l'activité AhR plus particulièrement, mettent en évidence la présence de composés HAP-like qui génèrent un fond continu de réponses positives dans l'ensemble des fractions (i.e., Kinani et al., 2010). Dans nos travaux, si l'extrait de sédiment présente une activité génotoxique, une activité beaucoup plus faible est mesurée dans chacune des hyperfractions obtenues, ce qui suggère un effet lié à un mélange de toxiques plus qu'un effet lié à une molécule unique. De façon générale, guidée par ce type d'effet (SOS Chromotest, activité AhR ...), l'approche TIE ne s'avère pas



aussi probante que lorsque sont utilisés des bioessais qui permettent la détection de composés bien particuliers, comme ceux basés sur le couplage récepteur nucléaire/gène rapporteur pour les composés perturbateurs endocriniens (tests in vitro PXR, GR, MR ...) (i.e., Creusot et al., 2010).

## **6. Liste des communications et/ou publications pour l'ensemble des équipes du projet.**

### **6.1 Communications dans des congrès internationaux**

#### **Année 2008**

Vicquelin L., Budzinski H., Leray-Forget J., Cachot J. Embryotoxicité et tératogénicité du phénanthrène chez le Medaka japonais (*Oryzias latipes*). Atelier International sur l'évaluation du stress environnemental, ECOBIM 2008, Bordeaux 15-16 mai 2008 (poster).

Vicquelin L., Budzinski H., Leray-Forget J., Cachot J. Development of an embryo-larval assay using Japanese Medaka (*Oryzias latipes*) for the evaluation of hydrophobic substance toxicity. 1st SETAC Europe Special Science Symposium. Bruxelles October 22-23, 2008 (poster).

#### **Année 2009**

Kadlecová, M., Diviš, P., Kovaříková, Dočekalová, H., Ouddane, B. Determination of dissolved mercury species in river ecosystem using DGT technique with thiol groups in resin gel. 2nd Conference on DGT and the Environment, Santa Margherita di Pula, Sardinia, Italy 7-9 October, 2009 (poster)

Lesueur T., Barka S., Xuereb B., Lecomte C., Cachot J., Leray-forget J. An embryo-larval assay for toxicity assessment of sediment-associated pollutant using *Eurytemora affinis* model. ISTA 14, 30 août-4 septembre 2009, Metz, France (poster)

Vicquelin L., Leray-Forget J., Morin B., LeMénach K., Budzinski H., Cachot J. Development of a fish embryolarval assay for hydrophobic compounds risk assessment, SETAC Europe 19th Annual Meeting, 31 mai -5 juin 2009, Göteborg, Suede. (oral)

Vicquelin L., Leray-Forget J., Morin B., LeMénach K., Budzinski H., Cachot J. A new embryolarval assay for toxicity assessment of hydrophobic and sediment associated pollutants, PRIMO 15, 17 - 20 mai 2009, Bordeaux, France. (oral)

Vicquelin L., Leray-Forget J., Morin B., Budzinski H., Cachot J. Effets of mixture of PAH on survival and development of embryos and larvae of the japanese medaKa (*oryzias latipes*) ISTA 14, 30 août-4 septembre 2009, Metz, France (poster)

#### **Année 2010**

Cachot J., Vicquelin L., Barjhoux I., Bouilly F., LeMénach K., Budzinski H., Deflandre B., Anschutz P., Julien Deloffre, Hamzeh M., Ouddane B., Forget J. Evaluation de la toxicité de matrices sédimentaires à l'aide du test embryo-larvaire médaka (MELA). ECOBIM 2010, Nantes 18 et 19 mai 2010 (orale)

Hamzeh M., Ouddane B., Billon G., Halwani J. Etude de La Contamination métallique des sédiments du bassin des docks de Rouen ; Journées Nord-Ouest Européennes des Jeunes Chercheurs, Villeneuve d'Ascq, France, 19 Mars 2010 (orale).

Hamzeh M., Ouddane B., Baroudi M., Halwani J. Trace metals contamination in the Seine estuary sediment; WATMED 5, Lille, France 26 – 28 Mai 2010 (poster).

Hamzeh M., Ouddane B., Billon G. Trace metals mobilization from surficial sediments of the river Seine estuary, 36th International Symposium on Environmental Analytical Chemistry; Roma, Italy 5 October 2010 (oral)

Vicquelin L., Forget-Leray J., LeMenach K., Morin B., Budzinski H., Cachot J. Medaka Embryo Larval Assay (MELA): a new bioethically acceptable bioassay for environmental risk assessment of sediments. 20th SETAC Europe Annual Meeting, Seville May 23-27, 2010 (oral)

### **Année 2011**

- Barjhoux I., Baudrimont M., Morin B., Gonzalez P., Budzinski H., Cachot J. Relationship between metal bioaccumulation, gene expression and toxic responses in early life stages of Japanese Medaka exposed to cadmium-spiked sediments. 21st SETAC Annual Meeting, Milan May 15-19, 2011 (oral).
- Lesueur T., Barka S., Xuereb B., Boulangé-Lecomte C., Budzinski H., Cachot J., Forget-Leray J. Development and validation of an embryo-larval assay for toxicity assessment of natural sediment using *Eurytemora affinis* model. PRIMO 16, Long Beach, USA, Mai 2011 (poster).
- Hamzeh M., Ouddane B. Mobilité et toxicité des éléments traces métalliques dans l'estuaire de la Seine ; IRePSE, Villeneuve d'Ascq, France 18 Mars 2011 (oral).
- Hamzeh M., Ouddane B., Daye M. The release of trace metals following the resuspension of seine estuarine sediments, TRACESPEC, Pau, France 16-20 May 2011 (poster).

### **Année 2012**

- Hamzeh M., Ouddane B., Cachot J., Clerandau C., Daye M. Impact of Seine sediments resuspension on water quality combined with Microtox bioassay, 37th International Symposium on Environmental Analytical Chemistry; Antwerp, Belgium 21-25 May 2012 (oral).

## **6.2 Articles dans des revues de rang A**

### **Année 2011**

- Morin B., Filatreau J., Vicquelin L., Barjhoux I., Guinet S., Leray-Forget J., Cachot J., 2011. Detection of DNA damage in larvae of the Japanese Medaka, *Oryzias latipes*, by the comet assay. *Analytical Bioanalytical Chemistry* 399 : 2235-2242.
- Vicquelin L., Leray-Forget J., Peluhet L., LeMenach K., Deflandre B., Anschutz P., Etcheber H., Morin B., Budzinski H., Cachot J., 2011. A new spiked sediment assay using embryos of the Japanese medaka specifically designed for a reliable toxicity assessment of hydrophobic chemicals. *Aquatic Toxicology*, 105 : 235-245.

### **Année 2012**

- Barjhoux I., Baudrimont M., Morin B., Landi L., Gonzalez P., Cachot J., 2012. Effects of copper and cadmium spiked-sediments on embryonic development of Japanese medaka (*Oryzias latipes*). *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 79 : 272-282.
- Hamzeh M., Ouddane B., El-Daye M. Trace metals distribution in core sediment from Seine River Docks harbor. (Environmental Technology, en revision) (2012)

## **6.3 Articles soumis**

- Lesueur T., Xuereb B., Boulangé-Lecomte C., Marie S., Cachot J., Vicquelin L., Budzinski H., Forget-Leray J. A new larval bio-assay on sediments using a calanoid copepod specie, *Eurytemora affinis*

Hamzeh M., Ouddane B., El-Daye M., Halwani J. Trace metals mobilization from surficial sediments of the river Seine estuary. (soumis à Journal of Environmental Sciences).

#### 6.4 Thèses

Ludovic Vicquelin (2011). Caractérisation fine de la toxicité des hydrocarbures aromatiques polycycliques vis-à-vis des embryons et des larves de medaka japonais, *Oryzias latipes*. Contribution à l'évaluation des risques environnementaux associés à la pollution chimique des sédiments de l'estuaire de Seine. Thèse Université du Havre soutenue le 7 juillet 2011. Codirection de thèse J. Forget-Leray et J. Cachot

Iris Barjhoux (2011). Etude de la toxicité de polluants chimiques à risque dans les sédiments aquatiques vis-à-vis des premiers stades de développement d'un poisson modèle, *Oryzias latipes*. Thèse de l'Université Bordeaux 1 soutenue le 19 décembre 2011. Co-direction de thèse J. Cachot et M. Baudrimont

Mariam Hamzeh (2012). Dynamique, comportement et toxicité des éléments traces métalliques à l'interface eau-sédiment dans l'estuaire de la Seine. Université de Lille 1, Soutenance le 25 septembre 2012. Directeur de thèse B. Ouddane

#### 7. Bibliographie des publications citées dans le rapport.

Andrews, J.E., Greenaway, A.M. and Dennis, P.F., 2010. Combined Carbon Isotope and C/N Ratios as Indicators of Source and Fate of Organic Matter in a Poorly Flushed, Tropical Estuary: Hunts Bay, Kingston Harbour, Jamaica. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 46 : 743-756.

Ankley GT, Thomas NA, Di Toro DM, Hansen DJ, Mahony JD, Berry WJ, Swartz RC, Hoke RA, Garrison AW, Allen HE, Zarba CS., 1994. Assessing potential bioavailability of metals in sediments: A proposed approach. *Environ Management*, 8 : 331-337.

Billon G., 2001. Géochimie des métaux et du soufre dans les sédiments des estuaires de la Seine et de l'Authie. Thèse de Doctorat, Université des Sciences et Technologies de Lille, France.

Bocquené, G., Galgani, F., 1998. Biological effect contaminants: cholinesterase inhibition by organophosphate and carbamate compounds. *ICES. Tech. Mar. Environ. Sci.*, 22 : 1-12.

Cachot J., Geffard O., Augagneur S., Lacroix S., Le Menach K., Peluhet L., Couteau J., Denier X., Devier M.H., Pottier D, Budzinski H., 2006. Evidence of genotoxicity related to high PAH content of sediments in the upper part of the Seine estuary (Normandy, France). *Aquatic Toxicology*, 79 : 257-267.

Cailleaud K., Forget-Leray, J., Souissi S., Hilde D., LeMenach K., Budzinski H., 2007a. Seasonal variations of hydrophobic organic contaminant concentrations in the water-column of the Seine Estuary and their transfer to a planktonic species *Eurytemora affinis* (Calanoïda, copepoda). Part 1: PCBs and PAHs. *Chemosphere*, 70 : 270-280

Cailleaud K., Forget-Leray J., Souissi S., Lardy S., Augagneur S., Budzinski, H. 2007b. Seasonal variation of hydrophobic organic contaminant concentrations in the water-column of the Seine Estuary

and their transfer to a planktonic species *Eurytemora affinis* (Calanoid, copepod). Part 2: Alkylphenol-polyethoxylates. *Chemosphere*, 70 : 281-287.

Cantwell, M.G., Burgess, R.M., 2004. Variability of parameters measured during the resuspension of sediments with a particle entrainment simulator. *Chemosphere* 56, 51-58.

Chiffolleau J.F., Claisse D., Cossa D., Ficht A., Gonzalez J.L., Guyot T., Michel P., Mirmand P., Oger C., Petit F., 2001. La contamination métallique. Fascicule du programme scientifique Seine-Aval. Ifremer. Ed.,39.

Chiffolleau J.-F. , Auger D., Roux N., Rozuel E., Santini A., 2005. Distribution of silver in mussels and oysters along the French coasts: Data from the national monitoring program. *Marine Pollution Bulletin* 50: 1719-1723

Cornwell J.C. and Sampou P.A., 1995. Environmental Controls on Iron Sulfide Mineral Formation in a Coastal Plain Estuary. In: *Geochemical Transformations of Sedimentary Sulfur*, (Ed. by V.A. Schoonen), pp. 224-242. American Chemical Society, Washington, Etats-Unis.

Creusot N., Kinani S., Balaguer P., Tapie N., Le Menach K., Maillot-Maréchal E., Porcher J.-M., Budzinski H., Aït-Aïssa S. Evaluation of an hPXR reporter gene assay for the detection of aquatic emerging pollutants: Screening of chemicals and application to water samples. *Anal. Bioanal. Chem.* (2010) 396, 569-583.

Cundy B., Hopkinson L., Lafite R., Spencer K., Taylor J.A., Ouddane B., Heppell C.M., Carey P.J., Charman R., Shell D. and Ullyott S., 2005. Heavy metal distribution and accumulation in two *Spartina* sp.-dominated macrotidal salt marshes from the Seine estuary (France) and the Medway estuary (U.K.). *Applied Geochemistry*, 20 : 1195-1208.

Devreker D., Souissi S., Forget-Leray J., Le Boulenger F., 2007. Effects of salinity and temperature on the post embryonic development of *Eurytemora affinis* (Copepoda; Calanoida) of the Seine estuary: a laboratory study. *J. Plankton Res.*, 29 :117-133.

Ellman G., Courtney K., Andres V., Featherstone R.M., 1961. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem. Pharmacol.*, 7, 88-95.

Evans, D.W., 1977. Exchanges of manganese, iron, copper, and zinc between dissolved and particulate forms in the New Port River Estuary, North Carolina. . PhD thesis University Oregon (USA).

Forget J., Livet S., Le Boulenger F., 2002. Partial purification and characterization of acetylcholinesterase (AChE) from the estuarine copepod *Eurytemora affinis* (Pope). *Comp. Biochem. Physiol. C*, 132: 85-92.

Forget J., Beliaeff B., Bocquéné G., 2003. Acetylcholinesterase activity in copepods (*Tigriopus brevicornis*) from the Vilaine River estuary, France, as a biomarker of neurotoxic contaminants. *Aquat. Toxicol.* 62, 195-204.

Forget-Leray, J., Landriau, I., Minier, C., Le Boulenger, F., 2005. Impact of endocrine toxicants on the estuarine copepod *Eurytemora affinis* (Pope). *Ecotox. Environ. Saf.*, 60, 288-294.

Gilliers C., Le Pape O., Désaunay Y. ,Morin J. ,Guérault D., Amara R., 2006. Are growth and density quantitative indicators of essential fish habitat quality? An application to the common sole *Solea solea* nursery grounds. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 69 : 96-106.

- Gouleau D., 1976. Ascension capillaire et variations de la teneur en eau de la pellicule superficielle des vasières découvrantes Atlantiques, *Journal de la recherche océanographique*, Vol. 1, N°3.
- Hack, L. A., Tremblay, L. A., Wratten, S. D., Forrester, G., and Keesing, V., 2008. Toxicity of estuarine sediments using a full life-cycle bioassay with marine copepod *Robertsonia propinqua*. *Ecotox. Environ. Saf.*, 70, 469-474.
- Helland, A., Åberg, G., Skei, J., 2002. Source dependent behaviour of lead and organic matter in the Glomma estuary, SE Norway: evidence from isotope ratios. *Marine Chemistry*, 78 : 149-169.
- Jaffé, R., Mead, R., Hernandez, M.E., Peralba, M.C., DiGuida, O.A., 2001. Origin and transport of sedimentary organic matter in two subtropical estuaries: a comparative, biomarker-based study. *Organic Chemistry*, 32 : 507-526.
- Kalnejais, L.H., Martin, W.R., Bothner, M.H., 2010. The release of dissolved nutrients and metals from coastal sediments due to resuspension. *Marine Chemistry* 121, 224-235. Lespoudre S., Brun-
- Cottan J.-C., Lesueur P., Deloffre J., Lafite R., Caillaud J., Philippe S., 2004. Etude expérimentale du tassement des vases de l'estuaire de la Seine. Rapport Seine Aval, 48pp.
- Kinani S., Bouchonnet S., Creusot N., Bourcier S., Balaguer P., Porcher J.-M., Aït-Aïssa S. Bioanalytical characterisation of multiple endocrine- and dioxin-like activities in sediments from reference and impacted small rivers. *Environ. Pollut.* (2010) 158, 74-83.
- Lesven L, Lourino-Cabana B, Billon G, Proix N, Recourt P, Ouddane B, Fischer J.C, Boughriet A, 2009. Water-quality diagnosis and metal distribution in a strongly polluted zone of Deûle river (northern France). *Water Air Soil Pollut.*, 198: 31-44.
- Liu, M, Hou, L.J, Xu, SY., Yang, Y., Yu, J., Wang, Q, 2006. Organic carbon and nitrogen stable isotopes in the intertidal sediments from the Yangtze Estuary, China. *Marine Pollution Bulletin*, 52 : 1625-1633.
- Lourino-Cabana B, Lesven L, Charriau A, Billon G, Ouddane B, Boughriet A., 2010. Potential risks of metal toxicity in contaminated sediments of Deûle river in Northern France. *Journal of Hazardous Materials*, 186 : 2129-2137.
- Lotufo, G.R., Fleeger, J.W., 1997. "Effects of sediment-associated phenanthrene on survival development and reproduction of two species of meiobenthic copepods. *Marine Ecology Progress Series*, 151: 91-102
- Lotufo, G.R., 1997. Toxicity of sediment-associated PAHs to an estuarine copepod: effects on survival, feeding, reproduction and behavior. *Mar. Environ. Res.*, 44, 149-166.
- Luoma SN. 1983. Bioavailability of Trace Metals to Aquatic Organisms – A Review. *Sci. Total Environ.*, 28:1-22.
- Meybeck M, Lestel L, Bonté P, Moilleron R, Colin J. L, Rousselot O et al , 2007. Historical perspective of heavy metals contamination (Cd, Cr, Cu, Hg, Pb, Zn) in the Seine River basin (France) following a DPSIR approach (1950-2005). *Sci. Total Environ.*, 375: 204-231.
- Minier C., Abarnou A., Jaouen-Madoulet A., Le Guellec A.-M., Tutundjian R, Bocquené, G, Leboulenger F., 2005. A pollution-monitoring pilot study involving contaminant and biomarker

measurements in the Seine Estuary, France, using zebra mussels (*Dreissena polymorpha*). *Environmental Toxicology and Chemistry*, 25 : 112-119.

Miramand P., Guyot T., Rybarczyk H., Elkaïm B., Mouny P., Dauvin J.C., Bessineton C, 2001. Contamination of the biological compartment in the Seine estuary by Cd, Cu, Pb, and Zn. *Estuaries*, 24 : 1056-1065.

Morse J., Rickard D., 2004. Chemical dynamics of sedimentary acid volatile sulfide. *Environmental Sciences Technology*, 38 : 131A–136A.

Nakari and Huhtala, 2008. Comparison of toxicity of congener-153 of PCB, PBB, and PBDE to *Daphnia magna*. *Ecotoxicol Environ Saf.*, 71 :514-518.

Oberdörster E., Cheek A.O., 2000. Gender benders at the beach: endocrine disruption in marine and estuarine organisms. *Environ. Toxicol. Chem.*, 20, 23-36.

Ouddane B., 1990. Comportement des éléments majeurs et mineurs dans un milieu soumis à des gradients physico-chimiques marqués : cas de l'estuaire de la Seine, Thèse de Doctorat, Université de Lille I.

Ouddane B., Mikac N., Cundy A.B., Quillet L., Fischer J.C., 2007. A comparative study of mercury distribution and methylation in sediments from two macrotidal estuaries: the Seine (France) and the Medway (United Kingdom). *Applied Geochemistry*, 23 : 618-631.

Perdue E.M., Koprivnjak J.F., 2007. Using the C/N ratio to estimate terrigenous inputs of organic matter to aquatic environments. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 73 : 65-72.

Priadi CR, Ayrault S., 2010. Caractérisation des phases porteuses de métaux : métaux particuliers en Seine, thèse de doctorat, Université Paris sud 11.

Quillardet P., Huisman O., D'Ari R. & Hofnung M., 1982. SOS Chromotest, a direct assay of induction of an SOS function in *Escherichia coli* K12 to measure genotoxicity. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)*, 79 : 5971-5975.

Rauret G., J.F. Lopez-Sanchez, A. Sahuquillo, E. Barahona, M. Lachica, A.M. Ure, C.M. Davidson, A. Gomez, D. Lück, J. Bacon, M. Yli-Halla, H. Muntau, P. Quevauviller, 2000. Application of a modified BCR sequential extraction (three steps) procedure for the determination of extractable trace metals contents in a sewage sludge amended soil reference material (CRM 483), complemented by a three-year stability study of acetic and EDTA extractable metal content. *J. Environ. Monit.* 2 : 228–233.

Rocher B., Le Goff J., Briand M., Manduzio H., Peluhet L., Gallois J., Devier M. H., Gricourt L., Augagneur S., Budzinski H., Pottier D., Andrée V., Lebailly P., Cachot J., 2006. Genotoxicant accumulation and cellular defence activation in bivalves chronically exposed to waterborne contaminants from the Seine River. *Aquat. Toxicol.*, 79 : 65-77.

Routledge E.J, Sumpter J.P. 1996. Estrogenic activity of surfactants and some of their degradation products assessed using a recombinant yeast screen. *Environ. Toxicol. Chem.*, 15, 241-248.

Routledge E.J, Sumpter J.P. 1997. Structural features of alkylphenolic chemicals associated with estrogenic activity. *J. Biol. Chem.*, 272, 3280-3288.

- Taillefert, M., Lienemann, C.-P., Gaillard, J.F., Perret, D., 2000. Speciation, reactivity, and cycling of Fe and Pb in a meromictic lake. *Geochim. Cosmochim. Acta* 64, 169-183.
- Tan F.C., Strain P.M., 1978. Organic carbon isotope ratios in recent sediments in the St Lawrence Estuary and the Gulf of St Lawrence. *Estuarine and Coastal Marine Science*, 8 : 213-225.
- Thévenot D.R., Meybeck M., Lestel L., 2002. Métaux lourds : des bilans en mutation. PIREN-Seine 1998-2001.
- Togola A., Budzinski H., 2007. Analytical development for analysis of pharmaceuticals in water samples by SPE and GC-MS. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 388 : 627-635.
- Vrel, 2009. L'enregistrement sédimentaire au cours des dernières décennies et ses forçages dans la partie fluviale de l'estuaire de la Seine : L'exemple d'une darse du port de Rouen. Mémoire de Master 2 DYGEC de l'Université de Rouen, 74pp.
- Yu F., Zong, Y., Lloyd, J.M., Huang, G., Leng, M.J., Kendrick, C., Lamb, A.L., Yim W.S., 2010. Bulk organic  $\delta^{13}\text{C}$  and C/N as indicators for sediment sources in the Pearl River delta and estuary, southern China. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 87 : 618-630.
- Zou E., Fingerman M., 1999. Effects of exposure to diethyl phtalate, 4-(tert)-octylphenol, and 2,4,5-trichlorobiphenyl on activity of chitobiase in the epidermis and hepatopancreas of the fiddler crab, *Uca pugilator*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C* 122 :115-120.
- Zhou, J., Wu, Y., Kang, Q. and Zhang, J., 2007. Spatial variations of carbon, nitrogen, phosphorous and sulfur in the salt marsh sediments of the Yangtze Estuary in China. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 71 : 47-59.

Crédit photo couverture : GIP Seine-Aval, C. Dégremont  
Pour tout renseignement, veuillez contacter la coordination scientifique : [cdegremont@seine-aval.fr](mailto:cdegremont@seine-aval.fr)

Le GIP Seine-Aval ne saurait être tenu responsable d'évènements pouvant résulter de l'utilisation et de l'interprétation des informations mises à disposition.

Le GIP Seine-Aval est financé par :

