

**CNRS - PROGRAMME ENVIRONNEMENT VIE ET  
SOCIETES**

**ECOSYSTEMES ET ENVIRONNEMENT**

**APPEL D'OFFRES « DYNAMIQUE DES CONTAMINANTS »**

-----

*Titre du Projet :*

**DEVENIR DES HYDROCARBURES AROMATIQUES  
POLYCYCLIQUES (HAP) DANS UN ÉCOSYSTÈME  
AQUATIQUE ET IMPACT SUR LES ORGANISMES  
VIVANTS :  
EXEMPLE DU PYRÈNE**

*Bilan des travaux*

*(2001-2002)*

RESPONSABLE : JOUANNEAU Yves  
DRDC/BBSI, UMR CNRS 5092, CEA-Grenoble,  
38054 Grenoble Cedex 09  
Tel : 04 38 78 43 10  
Fax : 04 38 78 51 85  
Email : [yjouanneau@cea.fr](mailto:yjouanneau@cea.fr)

## FICHE DE SYNTHÈSE

### **Programme environnement vie et sociétés : écosystèmes et environnement**

Devenir des contaminants dans l'environnement et effets sur les écosystèmes : interactions entre dynamiques physico-chimiques et dynamiques biologiques

**Titre du projet :** Devenir des hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP) dans un écosystème aquatique et impact sur les organismes vivants : exemple du pyrène

**Nom du responsable scientifique :** Yves JOUANNEAU

**Titre et fonction :** Docteur es-sciences naturelles, Directeur de Recherche au CNRS (DR2)

#### **EQUIPE PRINCIPALE :**

Laboratoire de Biochimie et Biophysique des Systèmes Intégrés, CNRS UMR 5092 Département de Réponse et Dynamique Cellulaires, CEA-Grenoble, 38054 Grenoble Cedex 9  
Tél : 04 76 88 43 10 ; Fax : 04 76 88 51 85

#### **EQUIPES PARTENAIRES :**

Equipe 1 : Laboratoire TEPE, ESIGEC - Université de Savoie, 73376 Le Bourget du Lac ;  
Responsable : Prof. Gérard BLAKE, [Gerard.Blake@univ-savoie.fr](mailto:Gerard.Blake@univ-savoie.fr)

Equipe 2 : ENTPE, Laboratoire L.S.E., 69518 Vaulx en Velin Cedex ;  
Responsable : Bernard CLEMENT, [bernard.clement@entpe.fr](mailto:bernard.clement@entpe.fr)

Equipe 3 : Laboratoire LCME, ESIGEC, Université de Savoie, 73376 Le Bourget du Lac ;  
Responsables : Emmanuel NAFFRECHOUX, [Emmanuel.Naffrechoux@univ-savoie.fr](mailto:Emmanuel.Naffrechoux@univ-savoie.fr) et  
Bernard DAVID, [bernard.david@univ-savoie.fr](mailto:bernard.david@univ-savoie.fr)

**MOTS CLES :** HAP, pyrène, spéciation, écotoxicité, biodégradation, microcosmes, sédiments, macrophytes, synergie plantes-microorganismes, bioaccumulation, substances humiques, adsorption

### **Production scientifique relative au projet P.E.V.S.**

#### **Publications :**

- KRIVOBOK S., KUONY S., MEYER C., LOUWAGIE M., WILLISON J.C., JOUANNEAU Y., Identification of pyrene-induced proteins in *Mycobacterium* sp.6PY1 : Evidence for two ring-hydroxylating dioxygenases, *J Bacteriol.*, 185:3828-3841(**2003**).
- JOUANNEAU Y., WILLISON J.C., KRIVOBOK S., MEYER C., CHEVRON N., BESOMBES J-L., BLAKE G Stimulation of pyrene mineralization in freshwater sediments by bacterial and plant bioaugmentation, en préparation. (**2003**).
- FANGET B., DEVOS O., NAFFRECHOUX E., Pyrene transfer from clay particles to water : the role of humic acid, *Journal of Water Science*, vol.15, special n°, 95-108, **2002**.

#### **Proceeding :**

- BOSCHER A., DAVID B. and GUITTONNEAU S., Photodegradation of pyrene on solid phase”, 2<sup>nd</sup> European meeting on environmental chemistry, EMEC 2, Dijon, Ed; Elsevier, 12-15 dec. **2001**.
- BOSCHER A., DAVID B., GUITTONNEAU S., SARAKHA M., Devenir photochimique du Pyrène sur supports modèles et dans des sédiments naturels, influence sur le transfert du Pyrène entre phase aqueuse et phase solide. 1ère rencontre nationale de la recherche sur les sites et sols pollués : bilan et perspectives, Ademe, Paris, 12-13 déc. **2002**.

#### **Rapports :**

- GODDE M., **Evaluation de la toxicité du pyrène sur des organismes aquatiques au moyen de tests monospécifiques**, Mémoire de DEA Sciences et Techniques du Déchet, INSA de Lyon, 53 pages., (2001).
- CAUZZI N., Devenir des hydrocarbures aromatiques polycycliques dans un écosystème aquatique et impact sur les organismes vivants : exemple du pyrène, Mémoire de DEA Toxicologie de l'Environnement, Université de Metz, 60 pages., (**2002**).
- CROZET K., Partition/Evolution du pyrène en milieu aquatique et biodisponibilité vis-à-vis de *Daphnia magna*, mémoire de stage de DUT de l'IUT de Génie Biologique (option agronomie) de Lyon I., (**2003**).

#### **Communications orales :**

- CLEMENT B. Fate and toxicity of pyrene in two lake sediments with contrasted characteristics, conférence au Séminaire scientifique Biodisponibilité des Contaminants et Matière Organique dans les écosystèmes aquatiques , Cemagref de Lyon, 27 sept. **2001**.

- **FANGET B., DEVOS O., NAFFRECHOUX E., Rôle des acides humiques dans le transfert des HAP entre les sédiments et l'eau, ColloqueFranco-Québécois, La pluridisciplinarité dans les problèmes de l'environnement : les interactions air sol eau, Québec, 14-16 mars 2001.**

- DAVID B., Mécanismes de phototransformation des HAP adsorbés sur silice et en suspension dans l'eau, Journée scientifique sur l'impact des HAP engendrés par le trafic routier et autoroutier sur les écosystèmes aquatiques de montagne, Chambéry, 28 fev. **2002**.

- **BOSCHER A., DAVID B., GUITTONNEAU S., SARAKHA M., Etude du mécanisme de photodégradation du Pyrène en solution, congrès du GRUTTEE, Paris, 10-12 septembre 2003.**

- JOUANNEAU Y., KRIVOBOK S., KUONY S., MEYER C., WILLISON J.C., Pyrene biodegradation by Mycobacterium species : identification of the catabolic enzymes involved, First FEMS Congress of European Microbiologists, Ljubljana, Slovénie, 29 juin-3 juillet **2003**.

#### Posters :

- BOSCHER A., DAVID B. and GUITTONNEAU S., Photodegradation of pyrene on solid phase", 2<sup>nd</sup> European meeting on environmental chemistry, EMEC 2, Dijon, 12-15 dec. **2001**.

- DAVID B., BOSCHER A., GUITTONNEAU S., SARAKHA M., Devenir photochimique du pyrene sur supports modèles et dans des sédiments naturels, influence sur le le transfert du pyrene entre phase aqueuse et phase solide", 1ère rencontre nationale de la recherche sur les sites et sols pollués : bilan et perspectives, Ademe, Paris, 12-13 déc. **2002**.

- BOSCHER A., DAVID B., GUITTONNEAU S., SARAKHA M., Photodegradation of pyrene in solution, EMEC 3, Genève, 12-13 déc. **2002**.

- BOSCHER A., DAVID B., GUITTONNEAU S., SARAKHA M., Photodegradation of pyrene sorbed on mineral supports and sediments, EMEC 3, Genève, 12-13 déc. **2002**.

- JOUANNEAU Y., KUONY S., MEYER C., KRIVOBOK S., Biodegradation of pyrene by a Mycobacterium strain : identification of specific catabolic enzymes including two arene dioxygenases, Conférence internationale à l'IFP, Paris, 6-7 juin **2002**.

CAUZZI N., Impact of sediment quality on the toxicity of pyrene in aquatic microcosms, 7ème congrès international de l'Aquatic Ecosystem Health Management Society, Lyon 15-17 sept. **2003**.

## SOMMAIRE

|                                                                                                     |     |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| RESUME.....                                                                                         | 2   |
| 1. INTRODUCTION.....                                                                                | 4   |
| 2. CARACTERISATION DES SEDIMENTS.....                                                               | 8   |
| 3. FACTEURS ABIOTIQUES AFFECTANT LE DEVENIR DU PYRENE EN MILIEU AQUEUX .....                        | 12  |
| 3. 1. Spéciation du pyrène en présence de particules minérales et de MON .....                      | 12  |
| 3.2. Photo-oxydation du pyrène.....                                                                 | 23  |
| 3.3. Conclusions.....                                                                               | 36  |
| 4. EFFETS DU PYRENE ET DE SES PRODUITS D'OXYDATION SUR DES ORGANISMES SUPERIEURS DE REFERENCE ..... | 38  |
| 4.1. Effets du pyrène lors de tests monospécifiques sur organismes de référence.....                | 38  |
| 4.2. Effets du pyrène sur la croissance des macrophytes .....                                       | 49  |
| 4.3 Biodégradabilité du pyrène photo-oxydé par les bactéries .....                                  | 52  |
| 5. DEVENIR DU PYRENE EN MICROCOSMES CLOS .....                                                      | 55  |
| 5.1 Description du dispositif expérimental.....                                                     | 55  |
| 5.2. Conditions opératoires et paramètres mesurés .....                                             | 55  |
| 5.3 Cinétiques de minéralisation du pyrène .....                                                    | 57  |
| 5.4. Bilan de transfert du pyrène et de ses produits d'oxydation dans les microcosmes.....          | 61  |
| 5.5. Bioaccumulation du pyrène dans les plants de <i>Phragmites australis</i> .....                 | 63  |
| 5.6. Effet de la rhizosphère sur l'équilibre redox des sédiments .....                              | 68  |
| 5.7. Identification des produits de biodégradation du pyrène .....                                  | 72  |
| 5.8. Analyses de la microflore bactérienne des sédiments contaminés par le pyrène.....              | 75  |
| 5.9 Conclusions .....                                                                               | 78  |
| 6. DEVENIR ET TOXICITE DU PYRENE EN MICROCOSMES OUVERTS.....                                        | 83  |
| 6.1. Description des essais réalisés.....                                                           | 83  |
| 6.2. Conditions opératoires et paramètres mesurés .....                                             | 83  |
| 6.3. Essais en petits béchers sur sédiment dopé (essai mono) .....                                  | 84  |
| 6.4. Essais en microcosmes de 2 L sur sédiments dopés (essais pluri1 et pluri2) .....               | 88  |
| 6.5. Discussion générale et conclusions.....                                                        | 99  |
| REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES .....                                                                   | 105 |
| ANNEXES.....                                                                                        | 109 |

## **RESUME**

Les travaux présentés dans ce rapport ont été réalisés grâce au soutien financier du CNRS dans le cadre du Programme Environnement Vie et Sociétés, et sous la houlette du Comité 'Ecosystèmes et Environnement'. Ces travaux sont le fruit d'une collaboration entre quatre équipes de la Région Rhône-Alpes pendant une période de 2 ans (2001-2002). Les études ont porté sur le devenir d'un hydrocarbure aromatique polycyclique (HAP) dans un écosystème aquatique, et sur leur impact sur les organismes vivants. Pour simplifier l'analyse, et rendre néanmoins possible une étude multi-paramètres des phénomènes, les expériences ont été réalisées en microcosmes de laboratoire composés de sédiments naturels d'origine lacustre, d'organismes et de plantes aquatiques. Ces microcosmes ont été artificiellement contaminés par du pyrène, un HAP composé de quatre noyaux aromatiques, choisi comme molécule modèle du devenir et de l'effet des HAP.

Le devenir du pyrène et la toxicité induite par ce polluant dans l'écosystème sont étudiés en mesurant les paramètres suivants : répartition du pyrène dans les trois compartiments (sédiment, phases aqueuse et gazeuse), photo-oxydation, biodégradation par les microorganismes (conversion en CO<sub>2</sub> et en métabolites), bioaccumulation dans les organismes aquatiques de référence et dans les plantes, effets sur la survie et la reproduction de ces organismes, ainsi que sur l'abondance relative des bactéries dégradant le pyrène. L'étude a été réalisée sur deux sédiments provenant du lac d'Aiguebelette (73) dont la teneur en matière organique (MO) est très contrastée : l'un est tourbeux (COT = 21%), l'autre crayeux (COT = 1.3%). Les concentrations en MO particulaire dans l'eau interstitielle de ces deux sédiments sont en revanche comparables (290 et 300 mg/L respectivement).

Les mesures de partition montrent que le pyrène se retrouve quasi exclusivement adsorbé aux particules de sédiments, les concentrations résiduelles dans la colonne d'eau étant très inférieures à la limite de solubilité. Les acides humiques semblent jouer un rôle mineur dans la solubilisation aqueuse du pyrène. La lumière provoque une photo-dégradation, assez rapide quand le pyrène est en solution dans l'eau, plus lente quand il est adsorbé sur particules minérales, notamment quand celles-ci sont opaques. Les produits de photo-oxydation ont été partiellement caractérisés et un mécanisme de photo-oxydation chimique du pyrène est proposé. Compte tenu de la partition du

pyrène, la proportion de pyrène susceptible de subir une photo-dégradation est très faible. A cet égard, nous avons constaté que le pyrène photo-oxydé est peu toxique pour, et biodégradable par les bactéries.

Nos études menées sur une série de microcosmes contaminés par du  $^{14}\text{C}$ -pyrène ont révélé que (i) les sédiments possèdent une activité intrinsèque de minéralisation du pyrène détectable après 15-20 j. Cette activité est d'origine bactérienne, et des espèces du genre *Mycobacterium*, isolées des sédiments, jouent de ce point de vue un rôle prépondérant. (ii) l'ensemencement des sédiments par une souche étudiée au laboratoire pour son aptitude à dégrader le pyrène (souche 6PY1) stimule la minéralisation sur une période de 60 j au moins (iii) les roseaux provoquent aussi une stimulation, sans doute de manière indirecte, en véhiculant par leurs racines de l'oxygène dans les sédiments, ce qui favorise la biodégradation oxydative du pyrène par les bactéries. Des mesures de potentiel redox dans les sédiments au voisinage des racines corroborent cette hypothèse. (iv) des produits d'oxydation du pyrène excrétés par les bactéries ont été identifiés dans la colonne d'eau. Le plus abondant d'entre eux peut servir de marqueur spécifique signalant la présence dans l'écosystème de bactéries dégradant le pyrène.

La toxicité du pyrène sur les organismes aquatiques a été testée par exposition à du pyrène en phase aqueuse ou à des sédiments contaminés artificiellement par des doses comprises entre 2 et 200 ppm. Certains organismes y sont sensibles (daphnies, amphipodes), voire très sensibles (microalgues), alors que d'autres ne sont que peu ou pas affectés par le pyrène (chironomes, lentilles d'eau, roseaux). La présence de lumière de laboratoire, comprenant pourtant peu d'UV, suffit à accroître la toxicité du pyrène (phototoxicité) pour les organismes exposés dans la colonne d'eau. Les effets du pyrène sur la survie et la croissance de l'amphipode *Hyaella azteca* sont plus marqués pour le sédiment crayeux. Cet effet est fonction de la teneur en MO du sédiment qui a une forte incidence sur la partition eau/sédiment du pyrène. La relation obtenue entre teneurs en pyrène dans l'eau interstitielle et survie des amphipodes suggère que la mortalité est fortement liée à la contamination de l'eau interstitielle. Les effets observés, pour les amphipodes et les daphnies exposés en phase aqueuse ou dans la colonne d'eau au-dessus du sédiment, peuvent être reliés aux doses de pyrène bioaccumulé mesurées par spectrofluorimétrie directe. Mais le pyrène subit dans certains cas des (bio)transformations qui rendent difficile sa quantification par cette méthode de dosage du fait de la modification du spectre d'émission.

## 1. INTRODUCTION

### Objectifs de l'étude

Comme le titre l'indique, notre projet a porté sur le devenir et l'impact des HAP dans un écosystème aquatique naturel. Le but était d'observer les conséquences d'une contamination artificielle sur les microorganismes et des organismes aquatiques de référence, et d'analyser conjointement la répartition du polluant dans les compartiments de l'écosystème, ainsi que les bio-transformations qu'il subit. Nous avons d'une part étudié les facteurs abiotiques susceptibles d'influencer le devenir du polluant, c'est-à-dire les interactions physico-chimiques polluant-sédiments notamment l'**adsorption**, l'importance des matières organiques dans ces interactions, et les phénomènes **d'oxydation photochimique** par la lumière. Nous nous sommes intéressé, d'autre part, aux facteurs biotiques impliqués, à savoir la **biodégradation** par les microorganismes, la **toxicité** vis-à-vis des organismes supérieurs ainsi que les processus de **bio-accumulation**. Nous avons adopté une démarche résolument simplificatrice, en choisissant de travailler sur des **microcosmes** de laboratoire, et en utilisant le pyrène, un HAP composé de quatre noyaux aromatiques, comme molécule modèle du comportement et de l'effet des HAP. Cette approche permettait de contrôler plus facilement les paramètres des expériences, de pouvoir les reproduire, et de simplifier l'interprétation des résultats. Pour des raisons techniques, nous avons limité la durée des expériences à quelques semaines (2 mois maximum).

### Propriétés des HAP et choix du pyrène

Notre intention n'est pas ici de passer en revue les connaissances sur l'origine, les propriétés les effets et la biodégradation des HAP, mais de rappeler les principales caractéristiques de ce type de polluants. Des informations plus détaillées sont données dans les revues citées en référence. Les propriétés physico-chimiques des HAP les plus courants sont indiquées dans le tableau 1. Ils sont constitués de noyaux aromatiques accolés dont le nombre varie de deux pour le naphthalène à six pour le benzo(ghi)périlène. Ils diffèrent également par l'agencement des noyaux aromatiques qui peut être linéaire (anthracène), angulaire (phénanthrène) ou groupé (pyrène).



La présence des HAP dans l'environnement a deux origines principales, pyrolytique et pétrolière. La pyrolyse, c'est-à-dire la combustion incomplète de la matière organique fossile (charbon, pétrole et ses dérivés) ou plus récente (bois) est l'une des sources majeures de HAP. L'activité industrielle, le chauffage résidentiel, les émissions de véhicules à moteur contribuent de manière prépondérante à la production de HAP, à laquelle s'ajoute celle d'origine naturelle (incendies de forêt, volcans).

La distribution des HAP dans l'environnement est fonction du mode d'émission et de leurs modes de transport. Les émissions atmosphériques, dans lesquelles les HAP sont associés à des particules qui se redéposent, donnent lieu à une contamination dispersée, qui explique l'omniprésence des HAP dans l'environnement.

**Tableau 1.** Propriétés physico-chimiques des HAP

| HAP                | Masse molaire (g/mol) | Point de fusion (°C) | Point d'ébullition (°C) | Solubilité <sup>a</sup> (mg/L) | $f_L/f_S^b$ | log P <sup>c</sup> |
|--------------------|-----------------------|----------------------|-------------------------|--------------------------------|-------------|--------------------|
| Naphtalène         | 128,2                 | 80                   | 218                     | 32                             | 3,53        | 3,35               |
| 1-méthylnaphtalène | 142,2                 | -22                  | 245                     | 27 <sup>d</sup>                | 1           | 3,87               |
| 2-méthylnaphtalène | 142,2                 | 34                   | 241                     | 26                             | 1,24        | 4,00               |
| Acénaphthylène     | 152,2                 | 82                   | 270 <sup>e</sup>        | 3,93                           | 4,61        |                    |
| Acénaphène         | 154,2                 | 93                   | 279                     | 3,42                           | 4,71        | 3,92               |
| Fluorène           | 166,2                 | 116                  | 294                     | 1,9                            | 7,94        | 4,18               |
| Phénanthrène       | 178,2                 | 100                  | 338                     | 1,0                            | 5,65        | 4,52               |
| Anthracène         | 178,2                 | 216                  | 340                     | 0,07                           | 77,5        | 5,54               |
| Fluoranthène       | 202                   | 107                  | 383                     | 0,27                           | 7,09        | 5,22               |
| Pyrène             | 202                   | 150                  | 393                     | 0,16                           | 19,8        | 5,18               |
| Chrysène           | 228,2                 | 254                  | 441                     | 0,006                          | 189         | 5,79               |
| Benz[a]anthracène  | 228,2                 | 156                  | 435 <sup>f</sup>        | 0,0057                         | 21,6        |                    |
| Benzo[a]pyrène     | 252                   | 179                  | 496                     | 0,0038                         | 32,3        | 5,98               |

<sup>a</sup> Solubilité dans l'eau à 25°C

<sup>b</sup> Rapport à 25°C des fugacités d'un HAP entre l'état liquide en surfusion et l'état solide.

<sup>c</sup> logP est défini comme le logarithme décimal du coefficient de partition Kow d'un composé donné dans un système standard diphasique octanol/eau

<sup>d</sup> Liquide dans l'état standard

<sup>e</sup> Se décompose partiellement

<sup>f</sup> Sublimable

Les HAP ont en commun d'être des molécules très stables, peu volatiles et hydrophobes, donc peu solubles dans l'eau. Ces propriétés les rendent résistantes à la biodégradation naturelle et leur temps de séjour dans l'environnement est par conséquent très long. Bien que présents dans l'environnement à des concentrations généralement faibles, les HAP peuvent s'accumuler dans la chaîne alimentaire en raison de leur caractère lipophile. Ces composés ont été détectés dans les tissus humains, notamment les tissus adipeux, le sang et le lait maternel. Des expériences menées sur animaux de laboratoire ont montré que les HAP sont à l'origine de multiples pathologies : tumeurs, affaiblissement du système immunitaire, malformations congénitales, stérilité, altération de la thyroïde. Les HAP appartiennent à la classe IIA (cancérogènes probable pour l'homme) selon la classification dressée par le Centre International de Recherche sur le Cancer.

Le pyrène est constitué de 4 noyaux aromatiques et a une structure condensée. Il est représentatif des HAP lourds ( $\geq 4$  noyaux) avec lesquels il partage les propriétés suivantes : très hydrophobe, peu volatil, plus récalcitrant à la biodégradation que les HAP légers et par conséquent, persistant dans les sols et les sédiments contaminés. Il est mutagène mais il n'est pas considéré comme cancérogène. Ses effets sur les écosystèmes sont relativement mal connus. Les bactéries et les champignons microscopiques sont les seuls organismes connus capables d'utiliser le pyrène comme source de carbone. La majorité des espèces bactériennes capables de dégrader le pyrène qui ont été décrites sont du genre *Mycobacterium* et diffèrent des espèces dégradant les autres HAP. Les connaissances sur le métabolisme bactérien du pyrène sont assez récentes et résultent d'études sur des souches isolées en laboratoire. L'une des équipes participant à ce projet a notamment travaillé sur l'identification des enzymes impliquées dans le catabolisme du pyrène dans une souche appelée *Mycobacterium gilvum* 6PY1. Sur la base des études publiées, un schéma de la biodégradation du pyrène par les bactéries a été proposé et est présenté en Annexe 1.

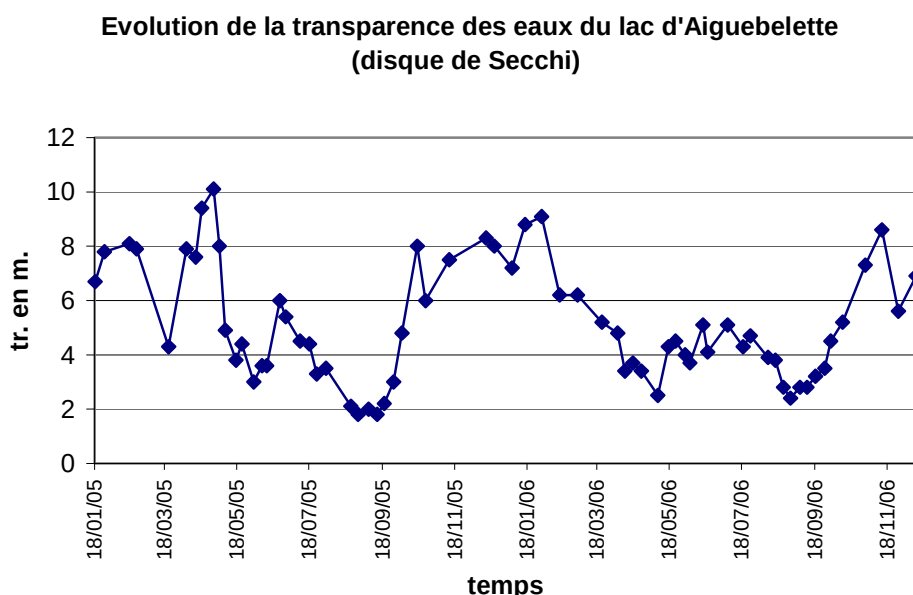
## Méthodologie

L'étude a été réalisée sur deux sédiments naturels provenant du lac d'Aiguebelette (73) d'aspects très différents : l'un est tourbeux (COT = 21%), l'autre crayeux (COT = 1.3%). Ils ont été prélevés sur un site protégé et l'analyse a montré qu'ils ne contenaient que des traces de HAP (**Tableau 2.1**). Les microcosmes étudiés contenaient des sédiments surmontés d'une colonne

d'eau, et des organismes de référence dont la nature et le nombre ont varié en fonction des besoins de l'expérience. Dans certains cas, du  $^{14}\text{C}$ -pyrène a été utilisé comme traceur radioactif pour faciliter le suivi du polluant et de ses produits d'oxydation. Les paramètres suivants ont été mesurés : répartition du pyrène dans les trois compartiments (sédiment, phases aqueuse et gazeuse), photo-oxydation, biodégradation par les microorganismes (conversion en  $\text{CO}_2$  et en métabolites), bioaccumulation dans les organismes aquatiques de référence et dans les plantes, effets sur la survie et la reproduction de ces organismes, ainsi que sur l'abondance relative des bactéries dégradant le pyrène. Ce projet a requis la mise au point d'un grand nombre de procédures nouvelles ou la mise en œuvre de méthodes déjà éprouvées qui sont décrites en annexe.

## 2. CARACTERISATION DES SEDIMENTS

Les sédiments sélectionnés pour notre étude proviennent du lac d'Aiguebelette (73). Ce lac reçoit les eaux de ruissellement de chaussée contaminée notamment par des hydrocarbures. Les sédiments retenus pour ce programme ont été prélevés sur les berges de la grande île, située au sud du lac, en zone non contaminée. Cette situation insulaire protège les sédiments des pollutions. Les sédiments en situation littorale sont exposés à l'éclairement solaire tout au long de l'année en raison de la faible hauteur de colonne d'eau (40 à 60 cm). La transparence des eaux du lac varie fortement en amplitude (**Fig. 2.1**), montrant de fortes valeurs au printemps et en hiver (entre 8 et 10 m.) et de plus faibles en été (2 à 4 m).



**Figure 2.1** Evolution de la transparence des eaux du lac d'Aiguebelette en 2001 et 2002

Les sédiments de ces zones littorales sont variés et le choix s'est porté sur deux types de sédiments :

- un sédiment calcaire (environ 80 à 85% de  $\text{CaCO}_3$ ) appelé « craie » dans la suite de cette étude. Ce sédiment reçoit essentiellement de la matière organique d'origine phytoplanctonique et zooplanctonique. Ces apports sont faibles ce qui a pour

incidence de donner une dominante minérale à ce sédiment. Sa richesse en sels calcaires lui confère un caractère oligotrophe en raison de la chélation facilitée des phosphates. Sa faible granulométrie en fait globalement un sédiment de type anoxique.

- le second sédiment, appelé tourbe dans la suite du rapport, reçoit beaucoup de matières végétales et est très riche en matières organiques si bien qu'il a un aspect de vase tourbeuse fluide qui peut devenir anaérobie sous 3 à 5 cm d'épaisseur. Cette matière est riche en produits de décomposition des plantes susceptibles de former des substances humiques. Ce sédiment est eutrophe, à forte activité bactérienne et contient plus d'organismes vivants que le premier.

Les sédiments ont été prélevés toujours au même endroit au moyen d'une drague à main, puis tamisés à 2 mm et conservés à 4°C quelques mois. Les résultats d'analyse des sédiments figurent au **tableau 2.1**. Les deux sédiments sont surtout contrastés par leur pH (plus élevé pour la craie), teneur en eau (la tourbe étant très fluide), le COT (très élevé pour la tourbe comme on pouvait s'y attendre), le calcium (logiquement plus élevé pour la craie). Si l'on compare les teneurs en contaminants aux seuils fournis par MacDonald *et al.* (2000) (TEC pour Threshold Effect Concentration, ou concentration seuil en-dessous de laquelle les effets sont peu probables, et PEC pour Probable Effect Concentration, teneur au-dessus de laquelle les effets sont très probables), on observe que ces teneurs sont très inférieures à ces seuils, ce qui confirme la possibilité d'utiliser ces sédiments comme sédiments de référence pour l'étude de la toxicité du pyrène. On remarque toutefois que le sédiment « craie » est systématiquement plus contaminé que le sédiment « tourbe ».

La distribution granulométrique des deux sédiments a été effectuée par granulométrie laser (**Tableau 2.2**). Le sédiment Craie s'apparente à un sable très fin comportant une fraction limoneuse importante. La granulométrie de la Tourbe est plus étalée, mais il convient de remarquer que, compte tenu de l'origine principalement végétale de ce sédiment, l'assimilation des particules présentes aux classes habituelles de particules minérales (sables, limons, argiles) constitue un abus.

**Tableau 2.1.** Composition physico-chimique des sédiments utilisés dans le programme

|                                                           | Aiguebelette "craie" | Aiguebelette "tourbe" |
|-----------------------------------------------------------|----------------------|-----------------------|
| pH 20°C                                                   | 7.7                  | 6.9                   |
| % eau                                                     | 47.9                 | 84.7                  |
| Fraction organique (% poids sec)                          | 2.9                  | 38.5                  |
| Fraction minérale (% poids sec)                           | 97.1                 | 61.5                  |
| Azote ammoniacal (N, % poids sec)                         | 0.02                 | 0.13                  |
| Azote Kjeldahl (N, % poids sec)                           | 0.13                 | 1.3                   |
| COT (NFU 44161, % poids sec)                              | 1.3                  | 20.9                  |
| Rapport C/N                                               | 9.9                  | 16                    |
| Phosphore (P2O5, % poids sec)                             | 0.05                 | 0.13                  |
| Calcium (CaO, % poids sec)                                | 32.7                 | 5.1                   |
| Magnésium (MgO, % poids sec)                              | 0.93                 | 0.52                  |
| Potassium (K2O, % poids sec)                              | 0.07                 | 0.08                  |
| % eau                                                     | 51                   | 85                    |
| perte au feu (% poids sec)                                | 4.89                 | 40.48                 |
| COT par oxydation au dichromate à froid<br>(%, poids sec) | 1.49                 | 11.5                  |
| Chrome (mg/kg MS)                                         | 18.6                 | 30.7                  |
| Cuivre (mg/kg MS)                                         | 4.05                 | 16.15                 |
| Cadmium (mg/kg MS)                                        | 0.415                | 0.72                  |
| Plomb (mg/kg MS)                                          | 3.45                 | 7.1                   |
| Zinc (mg/kg MS)                                           | 24.9                 | 63.85                 |
| Nickel (mg/kg MS)                                         | 3.65                 | 10.95                 |
| HAP (µg/kg sec)                                           |                      |                       |
| Naphtalène                                                | -                    | 1.75 +/- 0.53         |
| Acenaphène                                                | -                    | 0.44 +/- 0.13         |
| Fluorène                                                  | -                    | 0.85 +/- 0.25         |
| Phénanthrène                                              | 0.6 +/- 0.18         | 5.99 +/- 1.8          |
| Anthracène                                                | 0.05 +/- 0.02        | 0.49 +/- 0.15         |
| Fluoranthène                                              | 3.12 +/- 0.94        | 14.41 +/- 4.32        |
| Pyrène                                                    | 2.89 +/- 0.87        | 12.69 +/- 3.81        |
| Benzo(a)anthracène                                        | 2.10 +/- 0.63        | 3.70 +/- 1.11         |
| Chrysène                                                  | 2.74 +/- 0.82        | 9.79 +/- 2.94         |
| Benzo(b)fluoranthène                                      | 6.80 +/- 2.04        | 23.29 +/- 6.99        |
| Benzo(k)fluoranthène                                      | 1.89 +/- 0.57        | 4.61 +/- 1.38         |
| Benzo(a)pyrène                                            | 3.71 +/- 1.11        | 9.29 +/- 2.79         |
| Benzo(a,h)anthracène                                      | 0.50 +/- 0.15        | 16.92 +/- 5.08        |
| Benzo(g,h,i)pérylène                                      | 2.82 +/- 0.85        | 15.94 +/- 4.78        |
| Indéno (1,2,3-cd) pyrène                                  | 2.67 +/- 0.80        | 9.54 +/- 2.86         |
| HAPs totaux                                               | 29.9                 | 129.71                |

**Tableau 2.2.** Distribution granulométrique des sédiments d'Aiguebelette (prélèvements des 15 janvier 2001 et 6 mars 2001)

|                                                     | Tourbe 15/01/01 | Tourbe 6/03/01 | Craie 15/01/01 | Craie 6/03/01 |
|-----------------------------------------------------|-----------------|----------------|----------------|---------------|
| % particules < 2 µm<br>(argiles)                    | 1.40            | 1.46           | 4.88           | 3.81          |
| % particules de 2 à 50 µm<br>(limons)               | 15.06           | 15.43          | 35.65          | 20.79         |
| % particules de 50 à 200 µm<br>(sables très fins)   | 31.78           | 30.10          | 52.93          | 54.81         |
| % particules de 200 à 500 µm<br>(sables fins)       | 32.09           | 31.77          | 6.54           | 18.46         |
| % particules de 500 à 2000 µm<br>(sables grossiers) | 19.67           | 21.24          | 0.00           | 2.13          |

### **3. FACTEURS ABIOTIQUES AFFECTANT LE DEVENIR DU PYRENE EN MILIEU AQUEUX**

#### **3. 1. Spéciation du pyrène en présence de particules minérales et de MON**

##### 3.1.1 Comportement du pyrène en présence de kaolinite et d'AH

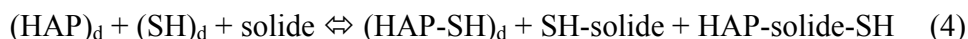
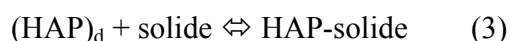
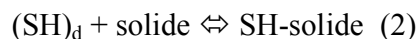
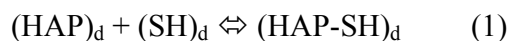
Les substances humiques (SH), constituant 25 à 50% du carbone organique dissous (COD) des eaux de surface (THURMAN, 1985), sont aussi présentes dans les sédiments. Ces acides polyélectrolytiques, qualifiés d'humiques ou fulviques selon leur solubilité aqueuse à pH inférieur à 2, sont produits par la décomposition des molécules organiques d'origine animale et végétale contenues dans les eaux. Leur structure macromoléculaire polyfonctionnelle varie selon leur origine biologique et leur processus de formation mais présente toujours des capacités complexantes à l'égard des métaux (BUFFLE et DELADOEY, 1982) et des propriétés amphiphiles leur conférant un rôle important dans le transport des micropolluants aromatiques (RAV-ACHA et REHBUN, 1992 ; CABANISS et al., 2000). La matière humique présente en effet des propriétés hydrophobes rendant possible les interactions soluté-soluté avec des composés organiques non ioniques (PEURAVUORI, 2001).

Les hydrocarbures aromatiques polycycliques (HAP) interagissent avec les substances humiques dissoutes ou fixées sur les colloïdes et sédiments. De nombreuses études ont été réalisées au cours des dernières années, abordant les aspects thermodynamiques par la détermination des constantes de partition Koc entre l'eau et les molécules humiques (McCARTHY et JIMENEZ, 1985 ; HERBERT et al., 1993 ; CHEFETZ et al., 2000) ou les aspects structuraux par l'étude des relations entre le Koc et les descripteurs moléculaires des substances humiques (CHIN et al., 1997 ; PERMINOVA et al., 1999). L'hydrophobicité des HAP leur confère également la propriété de s'adsorber sur les solides minéraux en suspension dans l'eau ou déposés sur le sédiment (CHIOU et al., 1998). La distribution des HAP dans l'écosystème aquatique dépend donc d'un équilibre entre la fraction adsorbée sur le sédiment et la fraction soluble liée au COD (JOHNSON et AMY, 1995).

Les substances humiques amphiphiles peuvent recouvrir les colloïdes minéraux (argileux ou siliceux) avec une affinité dépendante de leur poids moléculaire apparent (SPECHT et al., 2000), de la nature du minéral et du pH de la solution (ZHOU et al., 1994). La nature et la



quantité de matériel humique fixé au minéral peut alors perturber l'adsorption des HAP sur le solide. Les différentes interactions entre les solutés ( $(\text{HAP})_d$  et  $(\text{SH})_d$ ) et le solide peuvent se résumer par les équilibres suivants (1 à 4) :



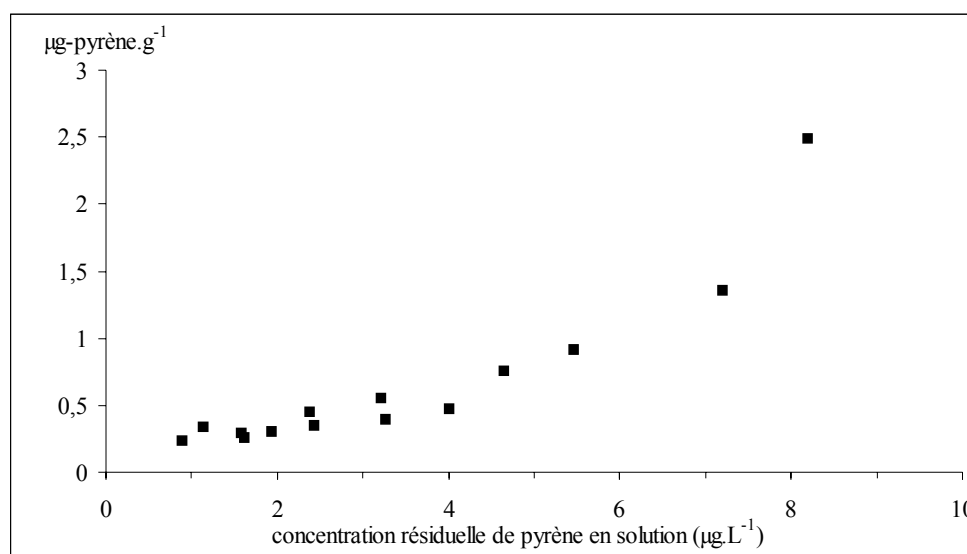
L'équilibre (4) représente globalement les interactions des solutés humiques et aromatiques polycycliques en phase liquide et avec le solide. La nature et la concentration de composés humiques en solution peut ainsi influencer la thermodynamique ou la cinétique de désorption des HAP du solide (SCHMITT et al., 1999).

Il n'existe qu'un nombre limité de travaux prenant en compte la complexité globale des interactions AH-solide-HAP (BRUNK et al., 1997 ; JONES et TILLER, 1999). Notre principal objectif est d'apporter une contribution à l'étude des équilibres (1 à 4) par la modélisation des phénomènes d'adsorption des AH et des HAP sur les solides argileux et par la quantification de l'influence des composés humiques dissous sur la désorption des HAP. Pour cela, nous avons utilisé :

- le pyrène, HAP souvent considéré comme sonde de fluorescence et possédant une forte capacité de liaison avec les acides humiques (PERMINOVA et al., 1999, PEURAVUORI, 2001),
- un acide humique (AH) disponible commercialement et de fort poids moléculaire facilitant son adsorption sur le solide et dont l'aromaticité élevée favorise la capacité de liaison avec les HAP,
- la kaolinite, minéral argileux présent dans les écosystèmes aquatiques et dont les dimensions particulières correspondent à celles rencontrées dans certaines eaux de surface,
- des conditions de pH (6,5) et force ionique ( $10^{-2}$  M) représentatives de celles d'une eau naturelle superficielle.

### 3.1.1.1 Adsorption du pyrène sur la kaolinite

L'adsorption du pyrène sur la kaolinite est représentée par l'isotherme de la **figure 3.1**. Les tests effectués (annexe 3) montrent qu'il est possible d'adsorber efficacement le pyrène sur la kaolinite hydratée. La première partie de l'isotherme peut s'interpréter comme l'adsorption de monomère de pyrène sur les groupes siloxane hydrophobes de l'argile. L'augmentation brutale de l'adsorption peut correspondre à la formation de microcristaux en surface du solide, comme LABBE et REVERDY (1988) ont pu l'observer sur la laponite hydratée.

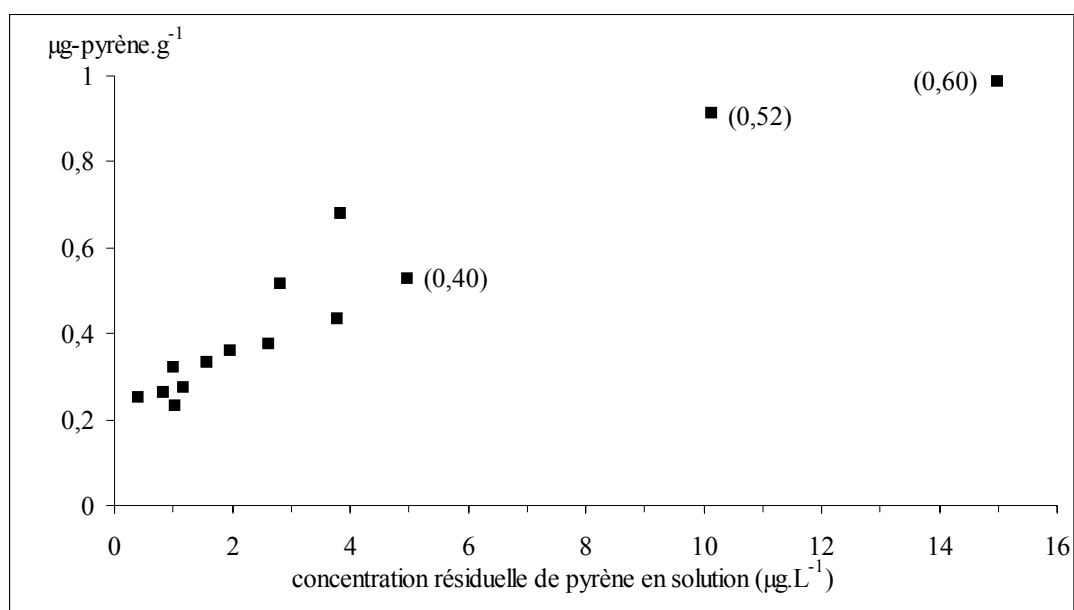


**Figure 3.1 :** Isotherme d'adsorption du pyrène sur la kaolinite – pH 6,5 - I 10<sup>-2</sup> M (NaNO<sub>3</sub>)

Cette allure atypique de l'isotherme peut s'apparenter à celle des isothermes d'adsorption des détergents non ioniques sur la kaolinite (KO et al., 1998). L'isotherme d'adsorption du pyrène sur la montmorillonite dans l'eau pure possède un profil similaire (CLEMENS et al., 1994). Pour une concentration résiduelle de pyrène en solution de 40 nmol.L<sup>-1</sup>, la quantité de pyrène adsorbé sur la kaolinite (7 nmol.g<sup>-1</sup>) est environ vingt fois inférieure à celle fixée sur la montmorillonite (150 nmol.g<sup>-1</sup>). Cette différence s'explique par l'impossibilité de pénétration de tout soluté dans l'espace interfoliaire de la kaolinite (KRAEPIEL et al., 1998).

Les colloïdes naturels sont dans la majorité des cas revêtus d'un film de substances humiques (ZHOU et al., 1994). Cette gangue organique est alors susceptible de modifier les phénomènes de sorption des HAP sur le solide. Des essais de sorption du pyrène ont été menés à pH et force ionique identiques, en solution aqueuse dépourvue d'AH, sur de la kaolinite préalablement mise en contact avec une solution aqueuse d'acide humique (selon le protocole

décrit en annexe 3). La **figure 3.2** présente l'isotherme d'adsorption du pyrène sur la kaolinite recouverte d'une quantité croissante d'acide humique (le rapport AH/K, exprimé en mg-C/g de kaolinite, est indiqué pour quelques points expérimentaux). La quantité de pyrène initialement en solution est identique pour tous les essais ( $25 \mu\text{g.L}^{-1}$ ).

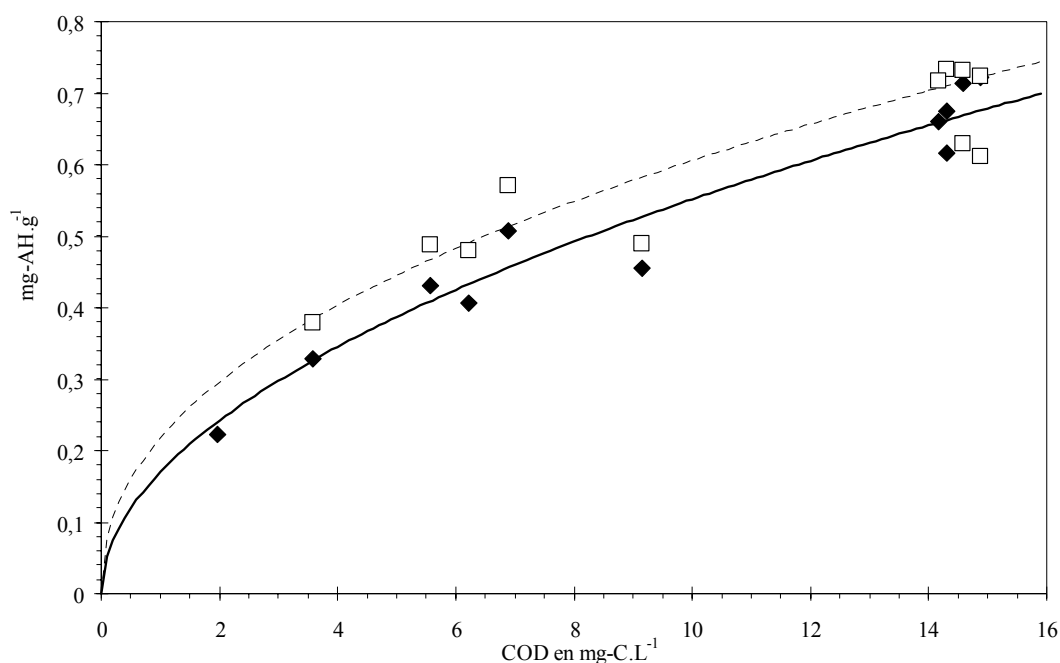


**Figure 3.2 :** Isotherme d'adsorption du pyrène sur la kaolinite recouverte d'acide humique (rapport massique AH/kaolinite en mg-C.g<sup>-1</sup>) – pH 6,5 -  $10^{-2}$  M (NaNO<sub>3</sub>)

Lorsque la surface de la kaolinite est recouverte de composés humiques, sa capacité à fixer le pyrène est fortement modifiée. L'adsorption se modélise par une loi de Freundlich  $Q = 0,30 C^{0,50}$  (avec Q en  $\mu\text{g-pyr.g}^{-1}$  kaolinite et C en  $\mu\text{g-pyr.L}^{-1}$ ). Les quantités de pyrène adsorbé diffèrent de celles fixées sur la kaolinite pure à partir d'un rapport AH/K supérieur à 0,40. Les molécules d'acide humique à la surface de l'argile semblent alors perturber la formation de microcristaux de pyrène. Le mécanisme de fixation du pyrène sur le solide ne semble pas être compétitif à l'adsorption de l'AH : des mesures d'absorbance UV à 280 nm n'ont pas mis en évidence la désorption des molécules humiques. Comme l'ont déjà constaté ZHOU et al. (1994), les AH jouent un rôle majeur dans le contrôle des équilibres d'adsorption des POH sur les particules en suspension.

### 3.1.1.2 Adsorption de l'acide humique sur la kaolinite

Les arêtes de la surface des particules de kaolinite peuvent réagir avec les fonctions carboxyliques déprotonnées de l'acide humique selon un mécanisme d'échange de ligand entre le groupe  $\text{OH}_2^+$  de l'argile et  $\text{COO}^-$  de l'AH (JONES et TILLER, 1999). Lors de nos expérimentations (annexe 3), le pH de la solution colloïdale de kaolinite et d'acide humique varie au maximum de 6,5 à 6,8. Cette variation du pH, qui diminue avec la quantité d'acide humique adsorbé sur la kaolinite, nous permet de supposer un mécanisme de chimio-sorption déjà proposé par d'autres auteurs au vu de l'endothermie de la réaction d'adsorption de certains acides humiques sur l'argile (ZHOU et al., 1994). La **figure 3.3** représente l'isotherme d'adsorption de l'acide humique sur la kaolinite à 20°C. L'adsorption suit une loi de Freundlich  $Q = 0,79 C^{0,526}$  (avec Q en mg-C/g kaolinite sèche et C en mg-C.L<sup>-1</sup>).



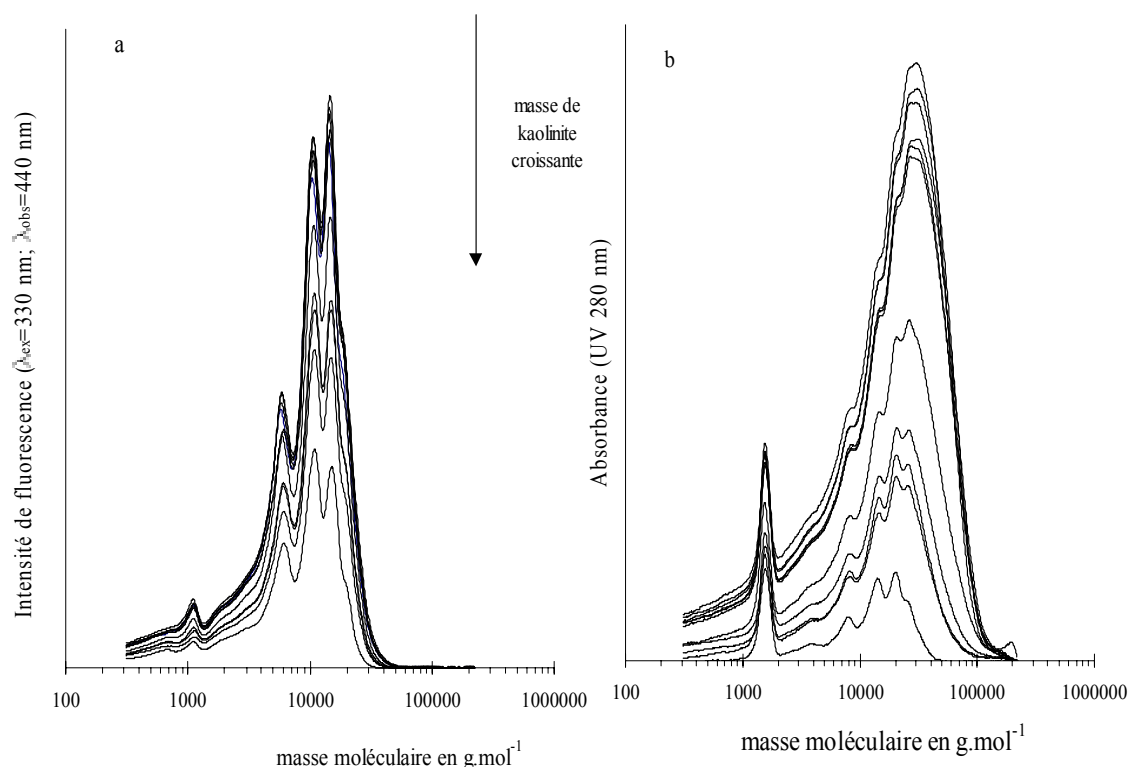
**Figure 3.3** : Isotherme d'adsorption des AH Aldrich sur la kaolinite à 20°C  
 ( $C_0 = 50 \text{ mg-AH.L}^{-1} = 16,2 \text{ mg-C.L}^{-1}$ ) - pH 6,5 -  $10^{-2} \text{ M (NaNO}_3)$   
 -- CES détection UV280nm ♦— COD

Les quantités maximales d'AH adsorbées sur la kaolinite sont inférieures à celles obtenues par JONES et TILLER (0,2 mg-C/g contre 4,8 mg-C/g) en raison des conditions de pH et force ionique différentes (6,5 et  $10^{-2} \text{ M}$  dans cette étude contre 4,0 et  $10^{-3} \text{ M}$  dans l'étude citée en

référence) et de la nature différente de l'AH (l'AH utilisé par Jones et Tiller est extrait de sol). A pH acide et force ionique faible, la protonation des AH réduit les forces de répulsion électrostatique entre la molécule organique et la surface chargée de la kaolinite (pH du point de charge nulle = 4,6). A pH voisin de la neutralité, la surface du minéral est chargée négativement, de même que la molécule humique, augmentant ainsi la répulsion électrostatique (SPECHT et al., 2000). ZHOU et al. (1994) ont pu fixer 7 milligrammes d'AH Aldrich par gramme de vermiculite à pH 6,5. Les surfaces spécifiques des deux argiles, déterminées par adsorption de N<sub>2</sub> par méthode BET sur le solide déshydraté, sont respectivement de 7,1 m<sup>2</sup>.g<sup>-1</sup> pour la vermiculite et 15,0 m<sup>2</sup>.g<sup>-1</sup> pour la kaolinite. La quantité d'AH fixée sur la kaolinite en suspension est toutefois inférieure d'un facteur 10 à celle fixée sur la vermiculite. Ceci peut s'expliquer par la modification de la surface d'adsorption disponible après hydratation et gonflement des particules argileuses : la vermiculite, du groupe des montmorillonoïdes, est capable de fixer des composés organiques polaires entre les feuillets argileux alors que ce mécanisme d'intercalation est interdit par la structure de la kaolinite (VAN OLPHEN, 1977).

L'analyse en CESHP (annexe 3) du surnageant de centrifugation révèle un fractionnement en poids moléculaire des acides humiques lors de l'adsorption sur le solide argileux. L'évolution des chromatogrammes en fonction de la quantité de kaolinite en contact avec la solution est présentée sur la **figure 3.4**.

La diminution disymétrique du chromatogramme avec détection UV, plus élevée pour les composés humiques de poids moléculaire important, en fonction de l'augmentation de la quantité de kaolinite en suspension permet de supposer l'adsorption préférentielle de ces molécules sur les colloïdes argileux. Les fractions humiques de poids moléculaires supérieures à 70000 Da sont adsorbées prioritairement. Ces fractions concernent des molécules (ou des agrégats moléculaires) d'acide humique peu fluorescentes ou dont la fluorescence est éteinte par réabsorption intramoléculaire du rayonnement. En effet, le chromatogramme avec détection de fluorescence de l'acide humique initial révèle uniquement des fractions de poids moléculaire inférieur à 50 000 Da.



**Figure 3.4 :** Signal de fluorescence (a) et d'absorbance (b) des chromatogrammes d'exclusion stérique de la fraction d'acide humique non adsorbé sur la kaolinite - pH 6,5 -  $10^{-2}$  M ( $\text{NaNO}_3$ ) – Concentration initiale en AH = 50 mg.L<sup>-1</sup>  
<sup>1</sup> Volume de solution = 25 mL Masse de Kaolinite = 0,2 à 2,5 g.

### 3.1.1.3 Interaction du pyrène avec l'acide humique

L'interaction en solution du pyrène avec l'acide humique est étudiée par la méthode d'extinction de fluorescence (annexe 3). Dans les conditions expérimentales de faible concentration en  $\text{O}_2$  dissous et court temps d'irradiation de l'échantillon, il est possible de considérer que le coefficient directeur de la fonction linéaire de Stern-Volmer, représentant la décroissance de la fluorescence du pyrène en fonction de la concentration d'AH, correspond au coefficient de partage  $K_{oc}$  du pyrène entre l'eau et l'acide humique :

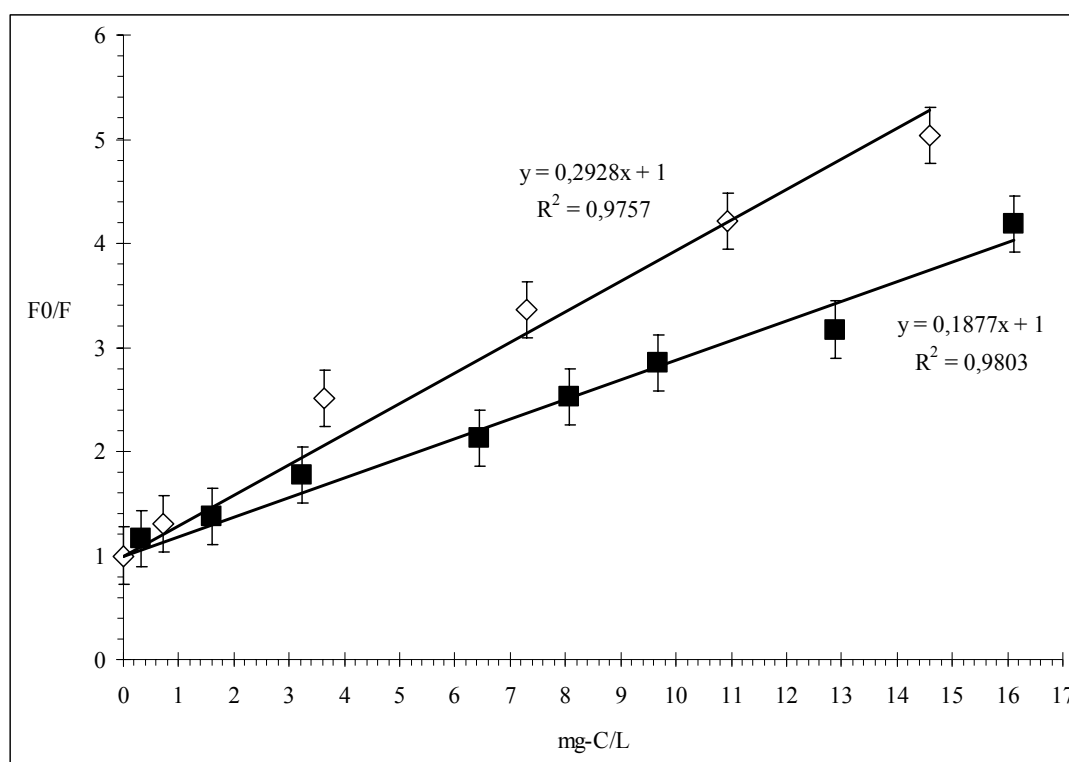
$$\frac{F_0}{F} = 1 + K_{oc}[\text{COD}] = \frac{S_w^*}{S_w}$$

où  $F_0$  et  $F$  représentent respectivement les intensités de fluorescence du pyrène en absence et en présence de l'inhibiteur de fluorescence AH à différentes concentrations,  $[\text{COD}]$  la concentration

d'AH en  $\text{kg}\cdot\text{C}\cdot\text{L}^{-1}$ ,  $S_w$  et  $S_w^*$  les solubilités respectives du pyrène (en  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ) dans l'eau pure et dans une solution d'AH.

Les relations linéaires de Stern-Volmer de l'extinction de fluorescence du pyrène par l'acide humique de la solution mère et par la fraction d'acide humique non adsorbée sur la kaolinite sont représentés sur la **figure 3.5**. Les points correspondent pour chaque concentration de carbone organique dissous aux valeurs moyennes de trois essais et les barres d'erreur à l'écart-type.

Les pentes des droites obtenues permettent le calcul des valeurs de  $K_{1oc}$  de la solution mère d'AH ( $1,86 \cdot 10^5$ ) et  $K_{2oc}$  des fractions humiques non adsorbées ( $2,95 \cdot 10^5$ ). La valeur  $K_{1oc}$  est comparable à celle précédemment publiée par PERMINOVA et al. ( $2,3 \pm 0,3 \cdot 10^5$ ) pour l'acide humique Aldrich utilisé sans purification préalable.



**Figure 3.5** : Tracé de Stern-Volmer de l'extinction de fluorescence du pyrène par l'acide humique Aldrich (■) et l'acide humique fractionné lors de l'adsorption sur la kaolinite (◆)

La valeur de  $K_{2oc}$  obtenue pour la fraction non adsorbée des AH est en contradiction avec la diminution de poids moléculaire observée lors de l'adsorption des fractions sur l'argile. Elle

peut soit traduire une meilleure accessibilité des sites hydrophobes du soluté humique pour le pyrène, soit une meilleure efficacité d'extinction de la fluorescence de l'HAP.

#### *3.1.1.4 Transfert dans l'eau du pyrène adsorbé sur les particules*

La capacité des acides humiques à complexer le pyrène permet de supposer que leur nature et leur concentration en solution gouvernent les mécanismes de désorption des HAP des particules argileuses. La solubilisation du pyrène fixé sur la kaolinite a été évaluée par mise en contact de l'argile récupérée par centrifugation en équilibre d'adsorption avec les AH et le pyrène.

Un volume de 25 mL d'eau ou d'une solution à 50 mg-AH.L<sup>-1</sup> est mis au contact de l'argile sans agitation, durant 24 heures, à pH 6,5 et force ionique 10<sup>-2</sup> M. Quatorze essais ont été réalisés pour des quantités d'AH fixées et des masses de pyrène adsorbées variant respectivement de 0,3 à 0,7 mg-C.g<sup>-1</sup> et de 0,2 et 1,0 µg-pyr.g<sup>-1</sup>. La masse de pyrène remise en solution n'est affectée ni par le film organique à la surface de la kaolinite, ni par la quantité de pyrène initialement adsorbée. De plus, les quantités de pyrène « re-solubilisées » dans l'eau pure (12 ng en moyenne, avec un écart-type de 9 ng) sont comparables à celles mesurées dans la solution d'AH (65 ng en moyenne, avec un écart-type de 26 ng). Ces quantités ne représentent qu'une faible fraction de la masse initialement adsorbée sur la kaolinite (respectivement 2 et 13%). Les concentrations obtenues (2,4 nM et 12,9 nM) restent très inférieures à la limite de solubilité du pyrène dans l'eau pure (802 nM).

SCHMITT et al. (1999) ont précédemment démontré que la cinétique de désorption du pyrène d'une phase solide quartz n'est pas influencée par la présence de matière organique naturelle (extraite de lac marécageux ou de sol). Les résultats obtenus dans cette étude montrent que les acides humiques n'ont également qu'une faible incidence sur la quantité de pyrène désorbée d'une phase solide argileuse.

### 3.1.2 Répartition du pyrène dans les sédiments du Lac d'Aiguebelette

#### *3.1.2.1 Répartition du pyrène dans le cas des concentrations inférieures à la solubilité aqueuse*

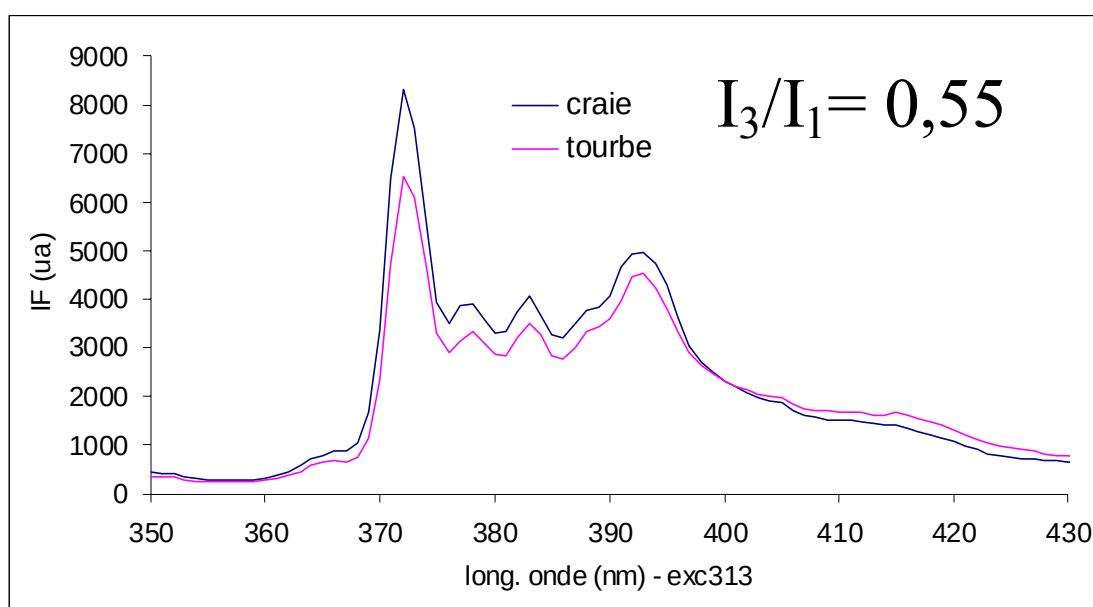


Afin de déterminer le comportement du pyrène vis-à-vis des deux sédiments sélectionnés dans le cadre de cette étude, le solide « brut » a été mis en contact avec des solutions aqueuses de pyrène (à concentration inférieure à la solubilité de cet HAP dans l'eau pure).

La solution aqueuse de pyrène permet la mise en suspension du solide. Le temps de contact entre particules et phase aqueuse est fixé à 24 heures, à température de 20°C, à l'obscurité afin de prévenir d'éventuelles réactions photochimiques.

Des solutions de pyrène dans l'eau UHQ (50 mL à 150 et 118 µg/L) ont été utilisées pour la mise en suspension de 100 mg de sédiment crayeux et de sédiment tourbeux respectivement. La masse de pyrène adsorbée (déterminée par bilan de matière après dosage dans la phase liquide) est égale à 33 µg/g de craie et 16 µg/g de tourbe.

L'enregistrement du spectre de fluorescence des deux phases liquides (excitation à 313 nm – observation de 350 à 430 nm) montre que les rapports d'intensité des deux bandes de fluorescence du pyrène (I et III, à 372 et 384 nm) sont conformes à celui de la molécule de pyrène environné de molécules d'eau ( $I_3/I_1=0,55$ ). La matière organique humique constituant le solide (ou fixé sur celui-ci) n'a donc pas été remise en solution lors du contact avec le solvant (**Fig. 3.6**).



**Figure 3.6 :** Spectres de fluorescence du pyrène après contact entre la solution et le sédiment

### 3.1.2.2 Répartition du pyrène pour des niveaux de contamination 2, 20 et 200 ppm

Afin d'évaluer la biodisponibilité du pyrène, le solide brut a été contaminé en employant des niveaux de concentration plus élevée en pyrène. La répartition du pyrène dans les différentes phases des sédiments prélevés dans le Lac d'Aiguebelette a été quantifiée en distinguant trois fractions : les particules du sédiment (constitué de la phase solide décantée en 2 heures dans les flacons), la suspension colloïdale (constituée de l'eau surnageante et des particules fines non décantées en deux heures) et la solution aqueuse vraie (correspondant à la suspension colloïdale filtrée à 0,45 µm).

Les résultats présentés dans les tableaux ci-dessous montrent que la majorité du pyrène, comme attendu, est fixé sur les particules solides du sédiment, quelle que soit le niveau de contamination. Le pyrène solvato par l'eau représente des concentrations fortement inférieures au maximum de solubilité. La concentration en HAP dans la solution colloïdale devient importante pour les deux types d'échantillon lorsque le niveau de contamination est élevé. On peut alors vraisemblablement supposer que les sites des particules du solide accessibles au pyrène sont tous occupés ; un équilibre dynamique existe avec les sites disponibles sur les particules colloïdales.

Ces résultats laissent donc supposer une fixation préférentielle du pyrène sur le solide décantable. Le pyrène ne se fixerait sur les colloïdes en suspension qu'après saturation des sites accessibles sur le sédiment.

| Contamination à 2 ppm | particules du sédiment<br>(µg/kg poids sec) | Suspension colloïdale<br>(µg/L) | Solution aqueuse vraie<br>(µg/L) |
|-----------------------|---------------------------------------------|---------------------------------|----------------------------------|
| Sédiment tourbeux     | 380                                         | 9                               | 1                                |
| Sédiment crayeux      | 1000                                        | 10                              | 6                                |

| Contamination à 20 ppm | particules du sédiment<br>(µg/kg poids sec) | Suspension colloïdale<br>(µg/L) | Solution aqueuse vraie<br>(µg/L) |
|------------------------|---------------------------------------------|---------------------------------|----------------------------------|
| Sédiment tourbeux      | 4650                                        | 10                              | 2                                |
| Sédiment crayeux       | 5910                                        | 120                             | 19                               |

| Contamination à 100 ppm | particules du sédiment<br>(µg/kg poids sec) | Suspension colloïdale<br>(µg/L) | Solution aqueuse vraie<br>(µg/L) |
|-------------------------|---------------------------------------------|---------------------------------|----------------------------------|
| Sédiment tourbeux       | 119 000                                     | 850                             | 2                                |
| Sédiment crayeux        | 130 000                                     | 264                             | 12                               |

### 3.2. Photo-oxydation du pyrène

L'étude du devenir du pyrène dans l'environnement sous irradiation solaire est un paramètre important à maîtriser. En effet, les photo-transformations représentent l'une des principales voies de dégradation abiotique des polluants organiques en phase aqueuse et en phase adsorbée à la surface d'un support solide. Nous avons dans ce travail étudié la photo-transformation du pyrène dans les différents compartiments de l'environnement où il est susceptible de s'accumuler :

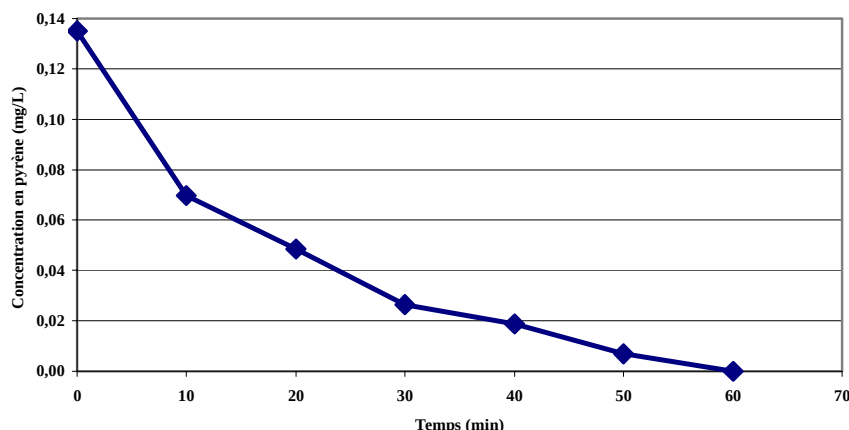
- en phase aqueuse, avec une concentration en pyrène égale à sa limite de solubilité ( $0,135 \text{ mgL}^{-1}$ ).
- sur des supports solides modèles, en phase adsorbée sèche, à différentes concentrations : 20 ppm et 10 000 ppm de pyrène.
- sur deux types de sédiments du Lac d'Aiguebelette, crayeux et tourbeux.
- sur supports solides modèles et les sédiments en présence d'une colonne d'eau, avec les mêmes taux de recouvrement.

A partir d'études cinétiques, nous avons pu déterminer les durées de demi-vie du Pyrène sur les différents supports solides en présence et en absence d'une colonne d'eau. Un grand nombre de photo-produits formés lors de l'irradiation du pyrène ont pu être identifiés, permettant de proposer un mécanisme de photo-dégradation du pyrène.

Du point de vue expérimental, les cinétiques de dégradation du Pyrène ont été réalisées en enceinte de simulation d'irradiation solaire, Suntest CPS+ ATLAS, avec une lampe à arc xénon simulant le rayonnement solaire ( $290 \text{ nm} < \lambda < 800 \text{ nm}$ ). L'énergie d'irradiation est de  $765 \text{ W.m}^{-2}$  et la température à l'intérieur de l'enceinte de  $35 \pm 5 \text{ }^{\circ}\text{C}$ . La correspondance entre le temps d'irradiation en enceinte et le temps d'irradiation solaire réel en Europe centrale est : 4 h d'enceinte = 45 h d'ensoleillement.

#### 3.2.1. Devenir photochimique du pyrène en solution aqueuse

Une solution aqueuse saturée de pyrène est préparée dans l'eau désionisée à la concentration de  $0,135 \text{ mg.L}^{-1}$  soit  $6,7.10^{-7} \text{ mol.L}^{-1}$ . Comme on peut le constater sur la **figure 3.7**, le pyrène disparaît rapidement sous irradiation lorsqu'il est présent en solution.

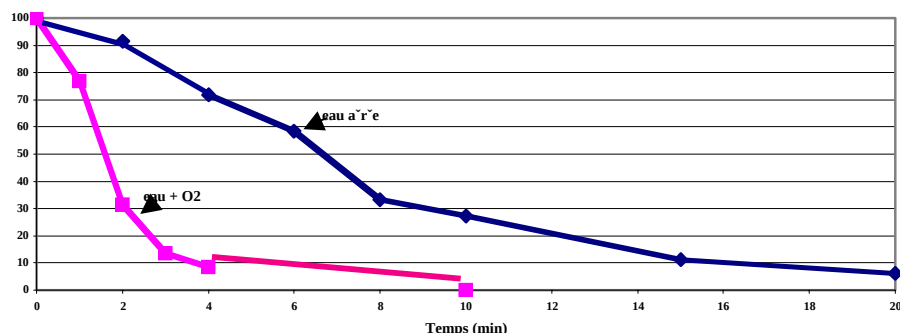


**Figure 3.7 :** Cinétique de dégradation du pyrène dans l'eau (200 mL) sous irradiation solaire.

La cinétique de photo-dégradation du pyrène dans l'eau étant une cinétique d'ordre 1, il est possible de calculer la constante de vitesse  $k$  de photo-dégradation du pyrène en solution aqueuse par le calcul du coefficient directeur de la droite  $\ln(C/C_0) = -k t$ . On obtient alors  $k = 0,055 \text{ min}^{-1}$ . Le temps de demi-vie du pyrène en solution dans l'eau peut également être estimé à :  $\tau_{1/2} = \ln 2 / k = 12,6 \text{ min}$  en enceinte d'irradiation soit 2,4 h d'ensoleillement moyen (Europe centrale). La photolyse directe du pyrène dans l'eau est donc relativement rapide sous irradiation solaire, comparée à la demi-vie de 41 min publiée précédemment (Smith et al 1979 ; Zepp et al 1979), mais les auteurs n'ont toutefois pas précisé l'énergie de la lampe.

Afin d'évaluer l'influence de l'oxygène sur la dégradation du pyrène, des expériences complémentaires ont été menées à 254 nm dans un réacteur fermé. L'oxygène est en effet un élément essentiel dans de nombreux processus de photo-dégradation direct. La **figure 3.8** compare la photo-dégradation du pyrène entre une atmosphère aérée et oxygénée.

Il apparaît donc qu'en solution aqueuse, la photo-dégradation du pyrène est plus rapide sous oxygène pur que sous air, ce qui confirme l'importance de l'oxygène dans le mécanisme de photo-oxydation.



**Figure 3.8** : Photodégradation du Pyrène à deux pressions partielles d'oxygène différentes

### 3.2.2. Devenir photochimique du pyrène sur supports minéraux modèles

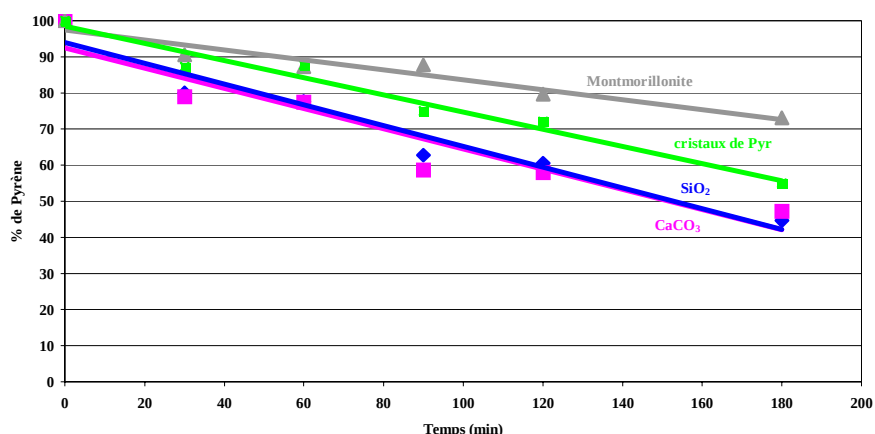
#### 3.2.2.1 Préparation et caractérisation des échantillons

Dans un premier temps, avant de travailler sur les sédiments crayeux et tourbeux du Lac d'Aiguebelette, nous avons travaillé sur des supports minéraux modèles plus simples  $\text{SiO}_2$ ,  $\text{CaCO}_3$ , Montmorillonite qui ont été sélectionnés pour leur abondance et leur représentativité dans l'environnement (Sparks 1995). La préparation des échantillons est décrite en annexe 4. L'état d'adsorption du pyrène sur les différents supports solide est caractérisé par spectrofluorimétrie (Perkin-Elmer LS-5).

A la surface des supports solides, le pyrène forme des agrégats caractérisés par une bande d'émission d'excimère centrée vers 480 nm, avec un léger déplacement de longueur d'onde selon le support étudié. Cette émission est bien distincte de l'émission moléculaire à 374 et 389 nm obtenue en solution dans l'eau à  $2 \cdot 10^{-7} \text{ mol.L}^{-1}$ . Dès que l'on passe à un rapport massique de 200 et par conséquent 20 ppm, le Pyrène se trouve majoritairement sous forme moléculaire. Il a donc peu tendance à former des microcristaux.

#### 3.2.2.2 Photo-dégradation du pyrène sur phase solide sèche

Les cinétiques de dégradation données ci-dessous sont comparées à celle obtenue lors de l'irradiation des cristaux de pyrène seuls, afin de déterminer l'influence du support sur la photo-dégradation du pyrène (**Fig. 3.9**).



**Figure 3.9** : Cinétiques de dégradation du pyrène adsorbé sur supports secs contaminés à 10 000 ppm et des cristaux de pyrène.

Après 4 heures d'irradiation, il s'est développé une coloration brune sur la silice, jaune clair sur la calcite (**Figure 3.10**) et gris-vert sur la montmorillonite (non photographié), qui montre clairement qu'un processus de photo-transformation du pyrène est intervenu. Sur montmorillonite, le pyrène se dégrade 2 fois moins vite que pour les deux autres supports. Ceci peut s'expliquer par un phénomène de compétition d'absorption entre le pyrène et l'argile qui tous deux absorbent la lumière solaire. L'argile en recouvrant le pyrène joue en fait un rôle de filtre interne.



**Figure 3.10** : Pyrène sur silice (haut) et Pyrène sur calcite (bas) de  $t = 0$  à 240 min de gauche à droite.

Toutes les cinétiques de photo-dégradation du pyrène sur support modèle sec sont d'ordre 0 apparent. Les coefficients directeurs des droites  $C - C_0 = -k_1t$  obtenues (**Tableau 3.1**) correspondent aux constantes de vitesse apparentes de photo-dégradation du pyrène.

Comparée à la photodégradation des cristaux de pyrène seuls, l'adsorption du pyrène sur Montmorillonite entraîne une diminution importante de la vitesse de disparition du pyrène, alors que les résultats obtenus sur SiO<sub>2</sub> et CaCO<sub>3</sub> (**Tableau 3.1**) présentent une dégradation plus rapide. Ces résultats peuvent être liés à l'intensité de la lumière diffusée à la surface du solide :

SiO<sub>2</sub> et CaCO<sub>3</sub> présentent une forte diffusion de lumière (supports blancs), tandis que la Montmorillonite diffuse plus faiblement la lumière (support gris). Les résultats des intensités de diffusion de la lumière mesurées par spectrométrie de fluorescence à 350 nm sont présentées dans le tableau ci-dessous.

**Tableau 3.1** : Constantes de vitesse de photodégradation du pyrène sur supports secs et humides, et intensités de lumière diffusée à la surface du solide.

| Support solide     | constante de vitesse<br>$k_1$<br>support sec<br>(mol.g <sup>-1</sup> .min <sup>-1</sup> ) | constante de vitesse $k_2$<br>support dans l'eau<br>(mol.g <sup>-1</sup> .min <sup>-1</sup> ) | $k_1/k_2$ | $I_{em.}$ de lumière diffusée (a.u)<br>support sec<br>$\lambda_{exc.} = 350 \text{ nm}, \lambda_{em.} = 350 \text{ nm}$ |
|--------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| SiO <sub>2</sub>   | $1,4.10^{-7}$                                                                             | $4,3.10^{-8}$                                                                                 | 3,3       | 636                                                                                                                     |
| CaCO <sub>3</sub>  | $1,4.10^{-7}$                                                                             | $4,3.10^{-8}$                                                                                 | 3,3       | 688                                                                                                                     |
| Montmorillonite    | $0,7.10^{-7}$                                                                             | $1,9.10^{-9}$                                                                                 | 36,8      | 186                                                                                                                     |
| Cristaux de pyrène | $1,0.10^{-7}$                                                                             | -                                                                                             | -         | -                                                                                                                       |

### 3.2.2.3 Photo-dégradation du pyrène sur phase solide, en présence d'une colonne d'eau

Aux préparations sur supports solides précédentes, on ajoute alors 50 ml d'eau désionisée constituant 3 cm de colonne d'eau au dessus du support. Les échantillons sont recouverts d'un film polymère transparent au rayonnement solaire empêchant toute évaporation du liquide. Avant irradiation, les échantillons sont placés à l'obscurité pendant 2 h, jusqu'à ce que l'équilibre de partition soit atteint entre le pyrène présent dans phase aqueuse et la phase solide.

Le devenir du pyrène est alors étudié dans les deux compartiments. Adsorbé sur le support, la cinétique de dégradation du pyrène suit là encore une loi d'ordre zéro, comme observé sur support sec. Néanmoins, les constantes de vitesse  $k_2$  sont beaucoup moins rapides comme indiquées dans le tableau 3.1, ci-dessus.

Durant la période d'équilibre, le pyrène se solubilise en phase aqueuse jusqu'à saturation. Lors de l'irradiation, le pyrène se dégrade avec une cinétique d'ordre 1 comme vu initialement (**figure 3.7**). Dans la colonne d'eau au-dessus des trois supports étudiés, les constantes cinétiques  $k'$  mesurées sont plus faibles que celle obtenue dans l'eau seule (**Tableau 3.2**).

**Tableau 3.2** : Comparaison des constantes de vitesse de photolyse du pyrène dans l'eau et dans les colonnes d'eau au-dessus des supports.

|                                   | Constante de photolyse $k'$ du Pyrène ( $\text{min}^{-1}$ ) | Turbidité (FAU) |
|-----------------------------------|-------------------------------------------------------------|-----------------|
| Eau                               | 0,055                                                       | 0               |
| Colonne d'eau sur $\text{SiO}_2$  | 0,014                                                       | 2               |
| Colonne d'eau sur $\text{CaCO}_3$ | 0,009                                                       | 54              |
| Colonne d'eau sur Montmorillonite | 0,008                                                       | 50              |

La diminution des constantes de vitesse de photolyse du pyrène dans l'eau est fonction de la turbidité (mesurée par spectrophotométrie) de la colonne d'eau au-dessus du support.

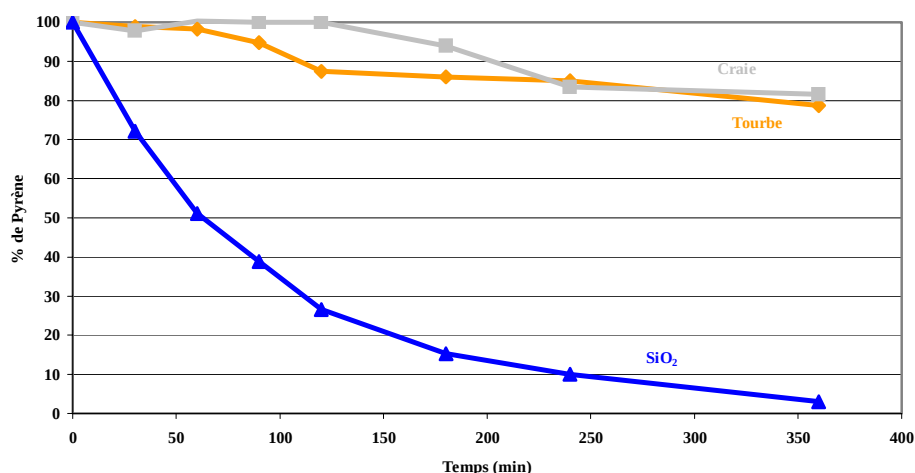
On remarque cependant qu'après 100 min d'irradiation, il persiste toujours une concentration résiduelle de pyrène en solution, d'environ  $0,02 \text{ mg.L}^{-1}$ . Cette observation peut-être interprétée comme étant le résultat d'un équilibre entre la vitesse de désorption/solubilisation du pyrène du support et la vitesse de photodégradation du pyrène.

En présence d'eau, la diminution des constantes de vitesse du pyrène sur les supports solides peut être attribuée à une plus faible concentration en oxygène que dans l'air (environ 36 fois moins). L'oxygène  $\text{O}_2$  joue donc un rôle important dans le processus de dégradation du pyrène. Le point positif à souligner est que la photolyse du Pyrène a lieu à la fois directement dans l'eau et sur supports solides immergés. Cependant, la hauteur de la colonne d'eau pourra limiter la photolyse du Pyrène dans le cas de l'irradiation de supports solides pour lesquels la turbidité de la colonne d'eau sera importante, ce qui est le cas pour le Lac d'Aiguebelette. Les sédiments ne seront alors plus irradiés par la lumière solaire et seul le Pyrène solubilisé dans l'eau et/ou adsorbé sur la matière en suspension sera sujet à la photolyse.

#### 3.2.2.4 Photo-dégradation du pyrène adsorbé sur les sédiments

La même étude a été réalisée sur les sédiments tourbeux et crayeux du Lac d'Aiguebelette. Les sédiments ont été contaminés à 20 ppm pour se rapprocher le plus possible des conditions vraisemblables de pollution environnementale. En parallèle, une expérience a été réalisée avec la silice (20 ppm), l'un des trois supports modèles étudiés précédemment (**Fig. 3.11**).





**Figure 3.11** : Photolyse du pyrène adsorbé sur sédiments et silice (20 ppm), recouvert d'une colonne d'eau de 3 cm.

Contrairement à la cinétique de photo-dégradation d'ordre zéro obtenue sur silice pour une concentration de pyrène de 10 000 ppm, on observe à 20 ppm une cinétique de photo-transformation du pyrène du 1<sup>er</sup> ordre, semblable à celle obtenue en solution aqueuse. Sur les sédiments, la dégradation du pyrène est plus lente que sur les supports modèles calcite et montmorillonite, mais toujours d'ordre zéro.

Il semble donc que pour la silice uniquement, aux faibles concentrations en pyrène sur le support solide, on ait un comportement similaire à celui d'une solution de pyrène « diluée », avec donc aucun effet d'écran dû à la présence de micro-cristaux comme observé à 10 000 ppm. Le spectre de fluorescence du pyrène adsorbé sur silice à 200 ppm confirme déjà que c'est bien la forme moléculaire du Pyrène qui prédomine, équivalent au pyrène en solution.

Sur les sédiments crayeux et tourbeux, la baisse de la concentration en pyrène n'intervient pas sur la cinétique de photolyse du pyrène à cause de la très forte turbidité des sédiments qui est donc le facteur limitant de la photo-dégradation (**Tableau 3.3**).

Sur les sédiments et sur silice en absence d'eau, les cinétiques conservent la même allure, mais sont légèrement plus rapides comme l'indique les données du tableau 3.3.

**Tableau 3.3 :** Constantes de vitesse de photolyse du pyrène (20 ppm) sur sédiments et sur silice, recouverts ou non d'une colonne d'eau.

| Support                           | Constante de vitesse de photo-dégradation du pyrène | Turbidité (FAU) |
|-----------------------------------|-----------------------------------------------------|-----------------|
| Sédiment tourbeux + colonne d'eau | $5,5.10^{-11} \text{ mol.g}^{-1}\text{min}^{-1}$    | 133             |
| Sédiment tourbeux sec             | $6,6.10^{-11} \text{ mol.g}^{-1}\text{min}^{-1}$    | -               |
| Sédiments crayeux + colonne d'eau | $5,5.10^{-11} \text{ mol.g}^{-1}\text{min}^{-1}$    | 78              |
| Sédiments crayeux sec             | $6,6.10^{-11} \text{ mol.g}^{-1}\text{min}^{-1}$    | -               |
| Silice + colonne d'eau            | $9,6.10^{-3} \text{ min}^{-1}$                      | 2               |
| Silice sèche                      | $9,6.10^{-3} \text{ min}^{-1}$                      | -               |

### 3.2.2.5 Bilan sur l'évaluation des durées de demi-vie du pyrène

Le tableau ci-dessous compile les temps de demi-vie du pyrène que l'on peut estimer à partir des études cinétiques précédentes, pour une puissance de lampe de  $765 \text{ W.m}^{-2}$  correspondant à un nombre de photon émis de  $2,4.10^{21} \text{ photon.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$  ou encore une actinométrie de  $I_0=4.10^{-3} \text{ Einstein.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ .

**Tableau 3.4:** Temps de demi-vie du pyrène adsorbé sur supports solides recouverts ou non d'une colonne d'eau de 3 cm.

| Support :         | Concentration en Pyrène (ppm) | $t_{1/2}$ du Pyrène (h) support sec | $t_{1/2}$ du pyrène (h) support + colonne d'eau |
|-------------------|-------------------------------|-------------------------------------|-------------------------------------------------|
| SiO <sub>2</sub>  | 10 000                        | 3                                   | 10                                              |
| SiO <sub>2</sub>  | 20                            | 1                                   | 1                                               |
| CaCO <sub>3</sub> | 10 000                        | 3                                   | 10                                              |
| Montmorillonite   | 10 000                        | 6                                   | 221                                             |
| Sédiment tourbeux | 20                            | 8,5                                 | 15                                              |
| Sédiment crayeux  | 20                            | 8,5                                 | 15                                              |
| Cristaux de Pyr   | -                             | 3                                   | -                                               |
| Pyrène dans l'eau | 0,135                         | -                                   | 0,3                                             |

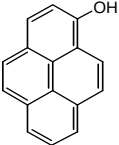
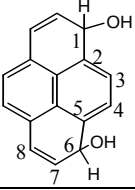
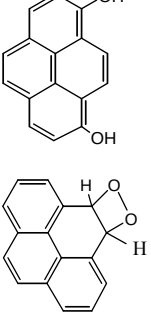
### 3.2.3. Les photo-produits du pyrène formés et le mécanisme de photolyse

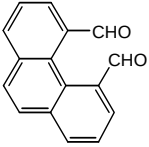
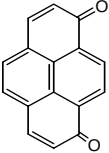
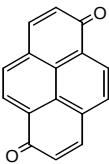
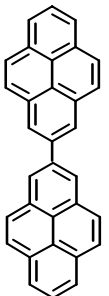
#### 3.2.3.1. Identification des photo-produits

Tous les photo-produits observés sont présents à la fois en phase aqueuse et sur phase solide. Les quantités sont plus importantes sur les supports solides que dans l'eau, où le pyrène n'est présent qu'en limite de solubilité.

En accord avec les études cinétiques précédentes et la couleur brune développée à la surface du support après irradiation solaire, le pyrène est dégradé en plusieurs sous-produits. Les analyses réalisées en HPLC et GC/MS montrent la formation de produits plus polaires que le pyrène, excepté pour un seul produit qui se trouve être moins polaire. Dans le **tableau 3.5**, huit structures de photoproduits sont proposées à partir des spectres de masse et par comparaison avec les données de la littérature, temps de rétention et spectre UV-Visible publiés (L.Launaen et al 1995 ; Y.Mao et al 1994).

**Tableau 3.5 :** Photo-produits du pyrène formés sous irradiation solaire et identifiés par GC/MS et RMN.

| Molécules                                                                           | Pic moléculaire<br>temps de rétention GC/MS | Fragmentation                                            | Appellation                                                                              |
|-------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------|----------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------|
|  | m/z = 218                                   | m/z = 189                                                | 1-hydroxypyrene <sup>a</sup>                                                             |
|  | m/z = 236                                   | m/z = 218<br>m/z = 200                                   | 1,6 et/ou 1,8-dihydro dihydroxy<br>pyrène                                                |
|  | m/z = 234<br><br>m/z = 234<br><br>m/z = 234 | m/z = 205<br>m/z = 177<br><br><br>m/z = 205<br>m/z = 176 | 1,6- et/ou 1,8-dihydroxypyrene<br><br>3,4-dioxétane pyrène<br><br>2,2'-biformyltriphenyl |

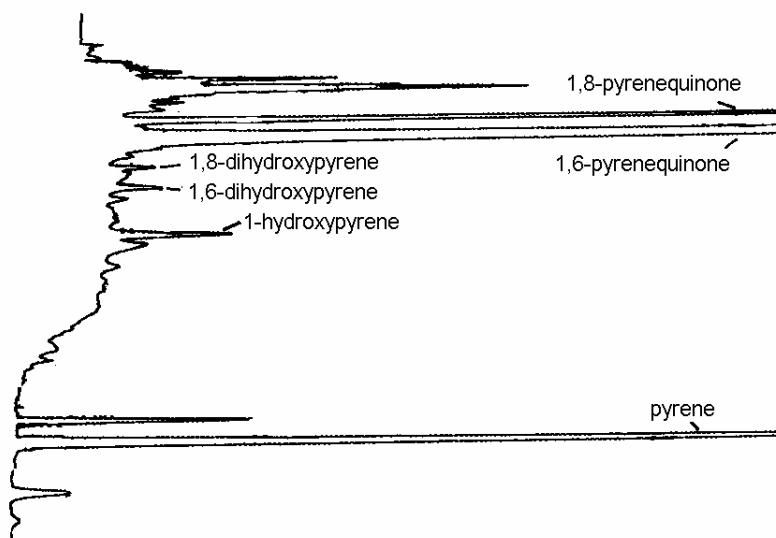
|                                                                                    |           |                     |                                             |
|------------------------------------------------------------------------------------|-----------|---------------------|---------------------------------------------|
|   |           |                     |                                             |
|   | m/z = 232 | m/z = 189           | 1,6- pyrènedione<br><i>confirmé par RMN</i> |
|   | m/z = 232 | m/z = 189           | 1,8-pyrènedione                             |
|  | m/z = 402 | m/z = 356, 327, 291 | 1,1'-bipyrène                               |

*a* confirmé par comparaison avec un standard en HPLC.

*b* confirmé par RMN, cf annexe 4.

Un exemple type d'attribution des pics apparaissant sur les chromatogrammes HPLC est donné sur la **figure 3.12**. Seul le 1-hydroxypyrene, produit primaire, a pu être identifié à l'aide d'un standard commercial.

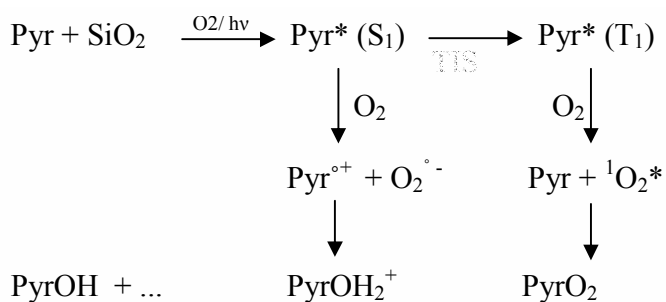
La confirmation des structures présentées doit cependant être poursuivie, notamment pour ce qui est des produits polaires qui sont difficiles à identifier. Le 1,1'-bipyrène, dimère du pyrène, qui n'est pas un composé issu d'un processus de photooxydation mettant en jeu O<sub>2</sub>, a été observé sous irradiation uniquement en présence d'argile, qui semble favoriser la formation de ce composé par recombinaison radicalaire.



**Figure 3.12 :** Séparation des photo-produits par HPLC.

### 3.2.3.2 Mécanisme de photo-dégradation du pyrène

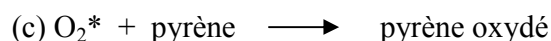
Deux mécanismes d'oxydation photochimique du pyrène par l'oxygène de l'air sont possibles selon la figure 3.13. Le premier suppose une réaction du pyrène avec l'oxygène singulet  $^1\text{O}_2^*$ , et, le second ferait intervenir le radical cation du pyrène suite à un transfert de charge entre le pyrène et l'oxygène [ $\text{Pyr}^{\circ+}$ ,  $\text{O}_2^{\circ-}$ ] (Barbas et al. 1996, Reyes et al 2000).



**Figure 3.13 :** Mécanisme possible de photo-dégradation du pyrène.

### 3.2.3.2.1. Influence de l'oxygène singulet sur la photo-transformation du pyrène

Afin de tester si l'oxygène singulet  $O_2 (^1\square_g)$  est impliqué dans le processus de dégradation, le pyrène est irradié en présence de rose de Bengale (RB) entre 450 et 570 nm. Le RB connu comme photosensibilisateur produisant de l'oxygène singulet, a été coadsorbé avec le pyrène sur le support. Un film polymère a permis de filtrer les longueurs d'ondes inférieure à 400 nm, et d'irradier le RB sans toucher le pyrène selon les réactions (a-b). Dans l'étape finale (c), le pyrène est oxydé.



Les résultats de cette expérience présentés dans le **tableau 3.6**, montrent un rendement de photodégradation relativement faible du pyrène en présence de RB. L'oxygène singulet ne joue donc pas un rôle significatif lors de la photo-transformation du pyrène.

**Tableau 3.6 :** Pyrène résiduel après 4 h d'irradiation ( $SiO_2$  à 10 000 ppm pyrène).

| Pyrène en présence de : | $SiO_2$ | $SiO_2$ + rose Bengale | $SiO_2$ + $HgCl_2$ |
|-------------------------|---------|------------------------|--------------------|
| Pyrène résiduel :       | 60 %    | 93 %                   | 9,2 %              |

### 3.2.3.2.2. Détermination de l'état excité responsable de la photo-réactivité du pyrène

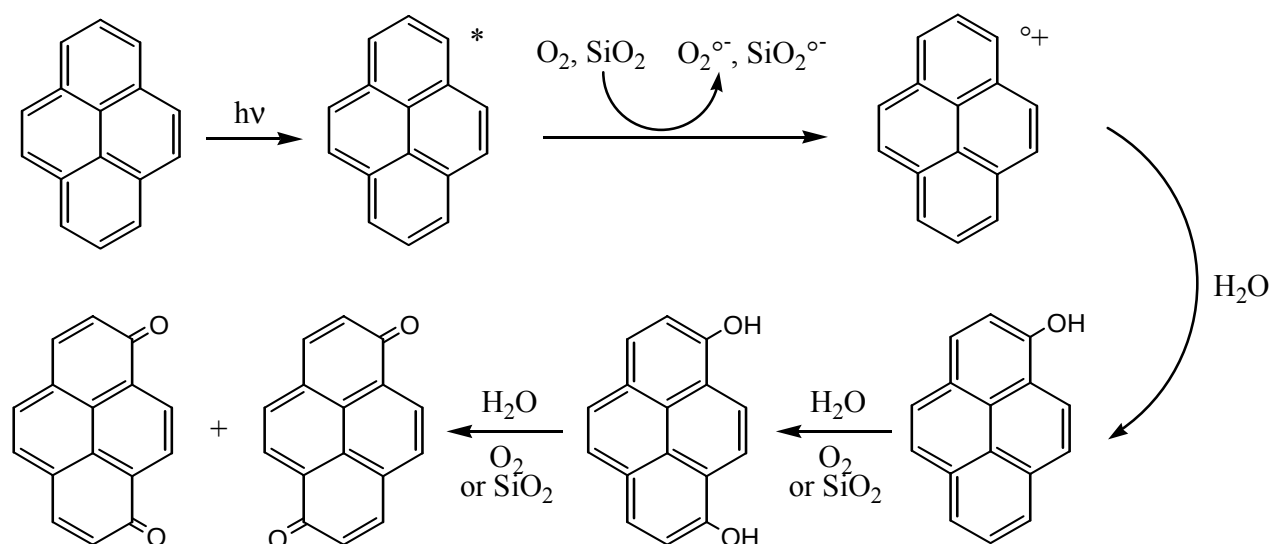
L'augmentation de la vitesse de photodégradation du pyrène en présence de  $HgCl_2$ , un quencher du transfert intersystème du pyrène  $S_1 \rightarrow T_1$  (Sigman et al 1998), montre que le pyrène est plus facilement dégradé lorsque seul l'état singulet  $S_1$  intervient. L'état triplet  $T_1$  du Pyrène qui réagit avec l'oxygène moléculaire pour donner de l'oxygène singulet et des produits oxydés est donc bloqué.

Ainsi, le processus de phototransformation met principalement en jeu l'état  $S_1$  du pyrène.

### 3.2.3.2.3. Mécanisme de photo-transformation du pyrène

En accord avec la littérature, nous avons montré, grâce à une collaboration avec le Pr. Sarakha de l'Université Blaise Pascal, que c'est bien le radical cation du pyrène  $\text{Pyr}^{\circ+}$  qui est la première espèce formée dans le mécanisme de photooxydation du pyrène en solution, à la surface de la silice et probablement à la surface des sédiments (Sigman et al 1998 ; Shallow 1991). La forte absorption de ces derniers à la longueur d'onde du Laser, n'a cependant pas permis de caractériser la présence du radical cation.

Le pyrène se dégrade par un mécanisme mettant en jeu un transfert d'électron entre le pyrène et  $\text{O}_2$  et/ou entre le pyrène et le support (Thomas et al 1988 ; David et al 1993) conduisant à la formation de  $\text{Pyr}^{\circ+}$  et de  $\text{O}_2^{\circ-}$  selon le schéma suivant (**Fig. 3. 14**).



**Figure 3.14** : Mécanisme de photodégradation du pyrène adsorbé sur  $\text{SiO}_2$ .

Les principaux produits primaires formés sont des produits mono et dihydroxylés (en position 1,6- ; 1,8- ; et/ou 3,4-). Les photo-produits secondaires obtenus sont des composés carbonylés 1,6 ; 1,8 et/ou 3,4-pyrènedione.

### 3.3. Conclusions

#### Spéciation du pyrène

Le pyrène s'adsorbe efficacement sur la kaolinite à pH 6 et force ionique  $10^{-2}$ M. La quantité maximale adsorbée n'a pu être atteinte expérimentalement, un phénomène de cristallisation de l'HAP en surface des sites hydrophobes de l'argile peut expliquer ce mécanisme. La présence de substances humiques adsorbées dans les mêmes conditions de pH et de force ionique limite les interactions du pyrène avec le solide : le phénomène peut alors être modélisé par une isotherme de Freundlich ( $K'_F$  0,30 et  $n'_F$  2,00).

Les fonctions carboxyliques du matériel humique dissous, représentant plus de la moitié des fonctions acides, sont déprotonnées dans les conditions d'essai. Malgré la charge négative de surface à ce pH, la kaolinite fixe une quantité d'acide humique proche de  $0,2 \text{ mg C.g}^{-1}$ . Le phénomène peut être modélisé par une loi de Freundlich de paramètres  $K_F$  0,79 et  $n_F$  1,90. L'adsorption sur la kaolinite entraîne un fractionnement de l'acide humique, démontré par des variations importantes de la forme des chromatogrammes d'exclusion stérique de la fraction solubilisée. Les composés de poids moléculaire élevé, qui absorbent à 280 nm mais qui fluorescent faiblement, sont fixés préférentiellement.

Les valeurs de  $\log K_{oc}$  obtenues par tracé de la relation de Stern-Volmer varient de 5,27 pour l'acide humique initial à 5,47 pour la fraction d'AH non adsorbée sur la kaolinite, traduisant une capacité de liaison avec le pyrène plus importante de la fraction humique non adsorbée par rapport à l'acide humique initial. Cette augmentation peut toutefois n'être due qu'à une meilleure efficacité d'extinction de la fluorescence du pyrène par les composés humiques non adsorbés.

La solubilisation du pyrène fixé sur les particules de kaolinite à l'aide d'une solution aqueuse contenant  $50 \text{ mg.L}^{-1}$  d'acide humique dissous (pH 6,5 et  $I$   $10^{-2}$  M) est faible et comparable à celle obtenue avec l'eau pure. Le rôle de l'AH dans le transfert du pyrène du sédiment à la phase aqueuse apparaît donc relativement peu important. Des essais mettant en oeuvre des solides prélevés dans un écosystème aquatique et des substances humiques extraites d'eaux naturelles sont à réaliser pour compléter ces résultats.

Pour les sédiments « naturels » utilisés dans cette étude, le pyrène se fixe efficacement sur les particules solides décantables. La quantité adsorbée est supérieure sur le sédiment crayeux, quel que soit le niveau de contamination initiale de l'échantillon. Les concentrations du pyrène dissous



dans l'eau sont toujours extrêmement faibles (et très inférieures à la limite de solubilité dans l'eau pure).

#### Devenir photochimique du pyrène

Ce travail a permis de montrer que le Pyrène se photo-transforme à la surface des différents supports modèles et sédiments étudiés et ceci à la fois en phase sèche et humide. La vitesse de dégradation est plus rapide à l'air qu'en présence d'une colonne d'eau et dépend directement de la couleur du support et de l'intensité de lumière diffusée par celui-ci. On observe une dégradation plus rapide du pyrène sur les supports blancs qui diffusent le mieux la lumière. En présence d'une colonne d'eau, la concentration de O<sub>2</sub> diminue à la surface du support solide et la vitesse de dégradation du pyrène est plus lente. Le mécanisme primaire de la photo-oxydation fait intervenir un radical cation du pyrène via son état excité singulet par transfert électronique avec l'oxygène et probablement le support solide.

Au vu de ces résultats, l'intensité de la lumière solaire et la concentration du milieu en oxygène sont des paramètres importants dans le processus de dégradation abiotique du pyrène dans l'environnement.

## 4. EFFETS DU PYRENE ET DE SES PRODUITS D'OXYDATION SUR DES ORGANISMES SUPERIEURS DE REFERENCE

### 4.1. Effets du pyrène lors de tests monospécifiques sur organismes de référence

#### 4.1.1. Objectifs des tests monospécifiques

Préalablement à la mise en œuvre de bioessais sur microcosmes de laboratoire, une évaluation de la toxicité du pyrène sur chacun des organismes du microcosme s'avère nécessaire, pour d'une part choisir au mieux la gamme de concentrations (ou la concentration) à étudier en microcosmes, et d'autre part disposer de données permettant d'aider à l'interprétation des résultats qui seront obtenus en microcosmes.

Deux types de tests monospécifiques ont donc été mis en œuvre selon le type d'organisme considéré : des tests en phase aqueuse (algues, daphnies, lentilles d'eau) et des tests en présence de sédiments (amphipodes, chironomes). Différents paramètres ont été étudiés tels que la durée d'exposition au toxique, l'influence de l'intensité lumineuse, la partition du pyrène dans les différentes matrices (eau, sédiments) ou bien encore la bioaccumulation du pyrène par les amphipodes. Les matériels et méthodes sont rappelés en annexe.

#### 4.1.2. Résultats des tests de toxicité du pyrène en phase aqueuse sur daphnies, microalgues, lentilles d'eau et amphipodes

Les tests en phase aqueuse ont permis de caractériser la toxicité du pyrène pour des organismes qui sont en contact direct avec le contaminant. Pour les tests sur daphnies *Daphnia magna* (**tableau 4.1**), il apparaît dans un premier temps que la toxicité du pyrène augmente avec la dose à laquelle ces organismes sont exposés, résultat attendu. L'analyse statistique des résultats montre par ailleurs, pour les tests daphnies, une plus grande toxicité du pyrène à 48h qu'à 24h ( $p < 0.05$ ), autre résultat logique. Après 24h d'exposition au pyrène, l'intensité lumineuse n'influe pas sur la toxicité du pyrène, ce qui n'est pas le cas après 48h d'exposition ( $p < 0.05$ ). Néanmoins, la phototoxicité du pyrène semble moins élevée que pour le fluoranthène, HAP pour lequel la toxicité est plus que multipliée par trois entre des conditions d'obscurité et une intensité lumineuse de 1500 lux (Clément *et al.*, 2000). Il convient de préciser que le terme « phototoxicité » est utilisé ici dans des conditions particulières de lumière fluorescente contenant en principe peu de longueurs d'onde réactives et avec une irradiance assez faible puisqu'il faut

comparer l'intensité de 1500 lux utilisée ici aux 100000 lux mesurés classiquement en plein soleil à midi en été. Malgré la faible quantité d'UV (10% du rayonnement total, soit 54  $\mu\text{W}/\text{cm}^2$  dans le domaine 220-385 nm selon Clément *et al.*, 2000), on note quand même une certaine phototoxicité.

**Tableau 4.1** : Valeurs des  $\text{CE}_{50}$  moyennes des tests sur daphnies *Daphnia magna*

| Conditions | Nombre de tests | $\text{CE}_{50}$ -24h ( $\mu\text{g}/\text{L}$ ) | $\text{CE}_{50}$ -48h ( $\mu\text{g}/\text{L}$ ) |
|------------|-----------------|--------------------------------------------------|--------------------------------------------------|
| Obscurité  | 3               | $167.25 \pm 1.59$                                | $67.94 \pm 7.90$                                 |
| 1500 Lux   | 2               | $138.85 \pm 20.42$                               | $74.05 \pm 1.89$                                 |
| 2500 Lux   | 3               | $105.35 \pm 32.74$                               | $47.72 \pm 24.67$                                |
| 6000 Lux   | 3               | $161.22 \pm 16.17$                               | $44.45 \pm 2.59$                                 |

Bien que les résultats ne soient pas statistiquement exploitables, la toxicité du pyrène envers l'amphipode *Hyaella azteca* (**tableau 4.2**) semble être fonction de la durée d'exposition et de l'intensité lumineuse, notamment après 48h d'exposition. En effet, la  $\text{CE}_{50}$ -48h est plus que divisée par deux entre les conditions d'obscurité et une intensité lumineuse de 6000 lux. L'augmentation de la toxicité du pyrène avec l'intensité lumineuse confirme le caractère phototoxique de cet HAP. De plus, l'évolution soulignée de cette même toxicité en fonction du temps d'exposition peut indiquer un phénomène de bioaccumulation du pyrène par les organismes au cours de l'essai.

**Tableau 4.2** : Valeurs des  $\text{CE}_{50}$  des tests en phase aqueuse sur amphipodes *Hyaella azteca*

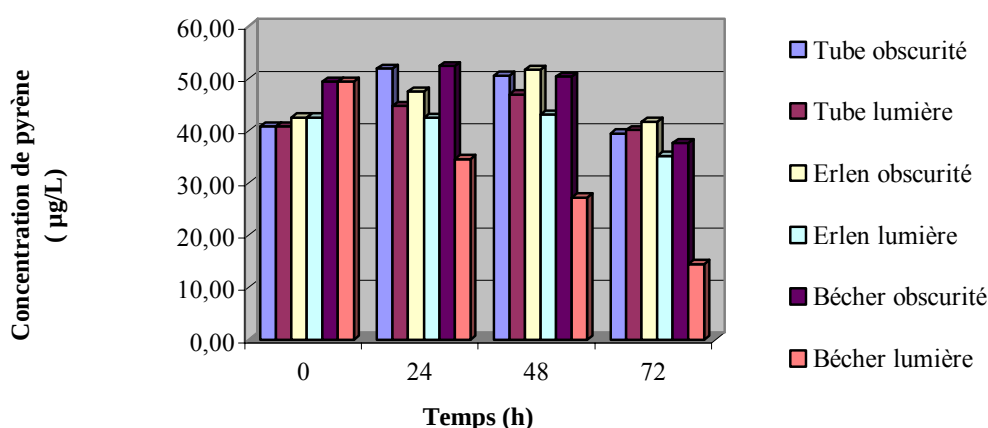
| Conditions | $\text{CE}_{50}$ 24h ( $\mu\text{g}/\text{L}$ ) | $\text{CE}_{50}$ 48h ( $\mu\text{g}/\text{L}$ ) |
|------------|-------------------------------------------------|-------------------------------------------------|
| Obscurité  | 81.48                                           | 62.56                                           |
| 1500 lux   | 79.62                                           | 41.08                                           |
| 3500 lux   | 134.16                                          | 41.23                                           |
| 6000 lux   | 77.17                                           | 25.87                                           |

A noter que Vindimian *et al.* (2000) rapportent, pour des organismes de type amphipode, un seuil d'effet biologique significatif de 1200  $\mu\text{g}/\text{L}$  pour le pyrène. Bien qu'ils ne précisent pas la source de cette valeur, le fait de se trouver bien au-delà de la limite de solubilité du pyrène amène à s'interroger sur les conditions dans lesquelles l'essai correspondant a été réalisé, à moins qu'il ne s'agisse d'une valeur extrapolée.

Le test sur algues démontre une toxicité aiguë du pyrène pour *Pseudokirchneriella subcapitata*. En effet, l'inhibition de la croissance algale est très importante puisque la  $\text{CE}_{50}$  est inférieure à 10  $\mu\text{g}/\text{L}$ .

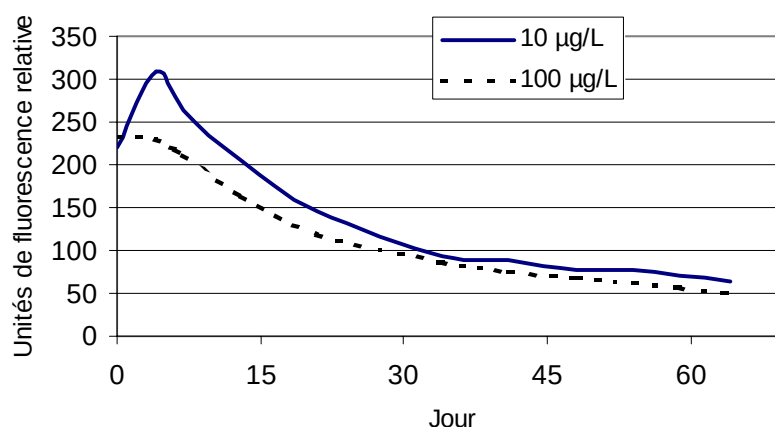
Le test sur lentilles *Lemna minor*, du fait de la croissance insuffisante des lentilles dans les témoins, aurait dû logiquement être dupliqué. Toutefois, on remarque qu'il n'y a aucun effet du pyrène, ni sur la croissance ni sur le poids sec moyen des lentilles en fin de test, et ce pour toutes les concentrations étudiées. Des études menées sur une autre espèce (*Lemna gibba*) donnent une  $CE_{50-8-jours}$  supérieure à 8000  $\mu\text{g/L}$  (Huang *et al.*, 1995) et une concentration sans effet observé sur la croissance de 500  $\mu\text{g/L}$  (Ren *et al.*, 1994).

La question de la stabilité du pyrène au cours des différents essais réalisés se pose. En effet, il se peut que le pyrène soit partiellement adsorbé sur les parois en verre des flacons ou partiellement dégradé à la lumière, ce qui pourrait conduire à une moindre toxicité. Une partie du pyrène pourrait aussi s'évaporer au contact de l'air ambiant. Pour cela, nous avons réalisé des mesures pour connaître l'évolution de la teneur du milieu en pyrène dans les différents récipients qui contiennent les solutions à tester. Les résultats (**figure 4.1**) montrent une tendance à la baisse, qu'il s'agisse des récipients laissés à l'obscurité ou de ceux laissés à la lumière. Par ailleurs, l'effet de la lumière est clairement mis en évidence dans les récipients où la surface de plan d'eau éclairée directement est maximale (bêchers). Lorsqu'une paroi de verre s'interpose entre la lumière et le pyrène la photo-dégradation est bien moindre, probablement du fait du rôle protecteur du verre vis-à-vis des UV. Un autre essai a été mené pour évaluer l'importance de l'adsorption du pyrène sur les parois des bêchers de 2 L utilisés dans les essais en microcosmes.



**Figure 4.1.** Evolution du pyrène en phase aqueuse exposé ou non à la lumière dans différents types de récipients

Les résultats (**figure 4.2**) montrent que les teneurs en pyrène diminuent de 58 à 63% en 34 jours. Seule l'adsorption intervient puisque les récipients sont couverts (pas d'évaporation qui de toutes façons conduirait à concentrer le pyrène) et placés à l'obscurité. La stabilité de solutions aqueuses de pyrène dans différents milieux (dont le milieu du test daphnies) avait été évaluée en parallèle à l'étude de Vindimian *et al.* (2000). Les concentrations dans les solutions de l'essai daphnies se maintiennent sur 24h mais chutent après.



**Figure 4.2.** Evolution du pyrène en phase aqueuse dans les récipients de 2 L utilisés dans les essais en microcosmes (systèmes à l'abri de la lumière, teneurs initiales : 10 et 100 µg/L)

#### 4.1.3. Résultats des tests en sédiments sur *Chironomus riparius* et *Hyalella azteca*

##### 4.1.3.1. Rendements de dopage et évolution/partition du pyrène au cours d'un test en sédiment

A partir des analyses de pyrène réalisées sur les sédiments dopés et mis sous eau 3 à 4 jours à l'occasion du test sur amphipodes, il est possible de se faire une idée du rendement de dopage (**tableau 4.3**). Il s'agit en fait d'une approximation puisque la détermination du rendement de dopage réel aurait demandé d'effectuer des prélèvements juste après dopage. Si l'on exclut deux valeurs « anormales », on retrouve de 74 à 98 % des teneurs nominales pour les deux sédiments. Les valeurs de 4.86 mg/kg frais pour la craie et de 11.54 mg/kg frais pour la tourbe semblent respectivement trop élevée et trop faible par rapport aux teneur nominales respectives de 2 mg/kg et 20 mg/kg, résultat peut-être lié à des problèmes d'échantillonnage ou analytiques.

**Tableau 4.3 :** Rendements de dopage approximatifs des sédiments et teneurs réelles en pyrène des sédiments contaminés.

|        | Teneur nominale<br>mg/kg frais | Teneur mesurée J0<br>mg/kg frais | Rendement de dopage<br>% |
|--------|--------------------------------|----------------------------------|--------------------------|
| Craie  | 2                              | 4.86                             | 243.00%                  |
|        | 20                             | 15.14                            | 75.70%                   |
|        | 200                            | 175.3                            | 87.65%                   |
| Tourbe | 2                              | 1.47                             | 73.50%                   |
|        | 20                             | 11.54                            | 57.70%                   |
|        | 200                            | 194.56                           | 97.28%                   |

(\*) : avec une teneur en eau de 38 % pour la craie et de 82.7 % pour la tourbe sur les échantillons en début de test.

Les résultats exprimés par rapport au poids sec du sédiment (**tableau 4.4**) montrent que la tourbe est généralement plus contaminée que la craie, ce qui est normal puisque la tourbe humide contient beaucoup plus d'eau que la craie. Compte tenu de l'absence de réplication des mesures, il est difficile de commenter l'évolution des teneurs dans les sédiments, la plupart des résultats disponibles semblent montrer une relative stabilité, particulièrement pour la tourbe.

**Tableau 4.4.** Teneurs en pyrène mesurées en mg/kg sec dans les deux sédiments à J0 et J14, pour les teneurs nominales de 2, 20 et 200 mg/kg frais.

| mg/kg frais | Craie J0 | Tourbe J0 | Craie J14 | Tourbe J14 |
|-------------|----------|-----------|-----------|------------|
| 2           | 7,84     | 8,50      | 1,40      | 6,30       |
| 20          | 24,42    | 66,71     | 20,90     | 62,45      |
| 200         | 282,74   | 1124,62   | 173,20    | 938,41     |

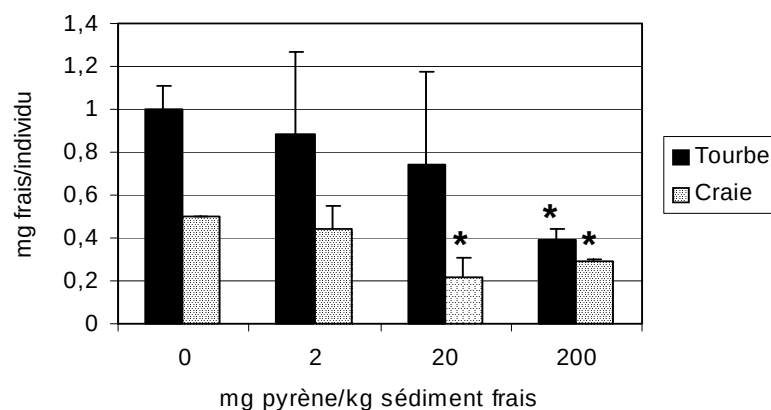
#### 4.1.3.2. Résultats des tests de toxicité monospécifiques en sédiments

L'analyse du test sur chironomes montre que le pyrène n'a aucun effet significatif sur la croissance et la survie des larves sur la durée du test (10 jours). A noter que les seuils de toxicité (plus faibles concentrations dans le sédiment avec effet biologique significatif) rapportés par Vindimian *et al.* (2000) pour divers organismes du sédiment varient pour le pyrène entre 0.053 mg/kg et 59 mg/kg (bien que cela ne soit pas précisé on peut supposer qu'il s'agit de mg/kg de sédiment sec). Il est remarquable qu'à la plus forte concentration testée dans notre étude (200 mg/kg frais en nominal soit en teneurs mesurées 283 mg/kg sec pour la craie et 1125 mg/kg sec pour la tourbe) on n'ait pas mis en évidence d'effet sur un critère subléthal tel que la croissance

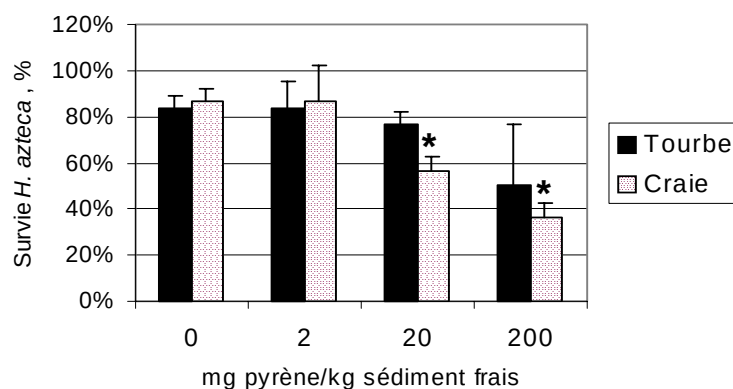
des chironomes. Il est vrai que d'autres invertébrés d'eau douce comme *Lumbriculus variegatus* (Kukkonen et Landrum, 1994) ou marins comme *Rhepoxynius abronius* (Swartz *et al.*, 1997) n'ont pas non plus montré une grande sensibilité au pyrène, avec respectivement un effet de 83% sur la survie 10 jours de *Lumbriculus variegatus* à 269 mg/kg et une CL50-10 jours de 84.3 mg/kg pour *Rhepoxynius abronius*.

Le test sur l'amphipode *Hyalella azteca* a fourni des résultats différents. La croissance des organismes dans la craie n'est pas très bonne. Cette faible croissance peut être mise en relation avec les teneurs relativement élevées en  $\text{NH}_4^+$  des eaux surnageantes et des eaux interstitielles qui augmentent en cours d'essai probablement du fait de l'apport de nourriture. *Hyalella azteca* est sensible à l'ammoniaque total, indépendamment du pH, avec des CL50-96 h de l'ordre de 20 mg N/L (Borgmann, 1994). Dans notre essai, les teneurs élevées dans les eaux interstitielles de la craie (de 8 à 11 mg  $\text{NH}_4^+$ /L en fin d'essai) mais aussi, dans une moindre mesure, dans celles de la tourbe (3 à 4 mg  $\text{NH}_4^+$ /L), peuvent expliquer la faible croissance des amphipodes. Si l'on fait abstraction d'une valeur d'ammoniaque dans l'eau interstitielle de la tourbe à 200  $\mu\text{g/g}$  (0.14 mg/L contre 3 à 4 mg/L pour les autres traitements), on obtient une corrélation inverse significative entre la teneur en ammoniaque des eaux interstitielles en fin d'essai et le poids frais des amphipodes, qui décroît lorsque  $\text{NH}_4^+$  augmente, mais cela n'explique pas le poids frais significativement diminué à 20 et 200 mg/kg dans la craie (**figure 4.3**). Cette augmentation des teneurs en ammoniaque et les problèmes en découlant auraient probablement pu être limités par un renouvellement de l'eau surnageante. La contamination de la tourbe par le pyrène n'a pas d'effet significatif sur la survie des amphipodes (**figure 4.4**), et n'affecte significativement leur croissance (en poids frais) qu'à 200 mg/kg frais. La survie des témoins est satisfaisante (supérieure à 80 %). Il faut noter au cours du traitement des résultats une variabilité entre réplicats d'une même concentration.

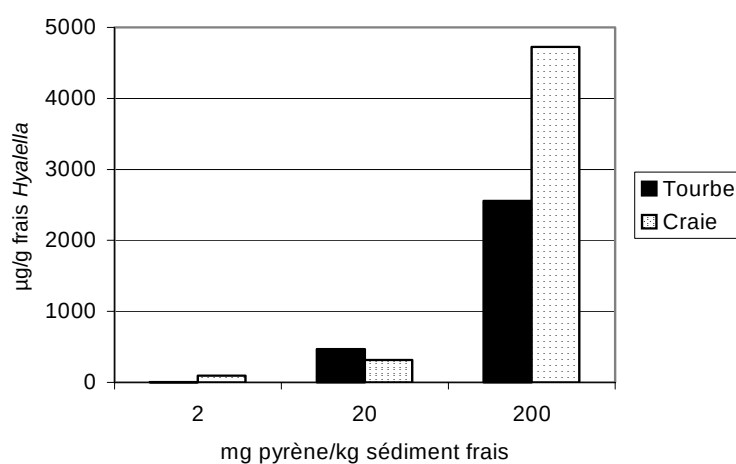
Des mesures de bioaccumulation ont été effectuées sur des amphipodes encore vivants en fin de test. Les résultats (**figure 4.5**) montrent une accumulation croissante du pyrène avec la dose, significative dès 2  $\mu\text{g/g}$  pour la craie et 20  $\mu\text{g/g}$  pour la tourbe. Il semble que la bioaccumulation soit plus importante dans la craie ce qui peut en partie expliquer les effets plus nets sur la survie et la croissance des amphipodes dans la craie.



**Figure 4.3 :** Poids frais de *Hyalella azteca* après 14 jours dans les deux sédiments en présence de pyrène (moyenne sur 3 réplicats  $\pm$  barres d'écart-type ; \* effet significatif,  $p < 0.05$ )



**Figure 4.4 :** Survie de *Hyalella azteca* 14 jours dans les deux sédiments en présence de pyrène (moyenne sur 3 réplicats  $\pm$  barres d'écart-type ; \* effet significatif,  $p < 0.05$ )



**Figure 4.5:** Bioaccumulation du pyrène par *H. azteca* en fin de test (14 jours).



Pour mieux comprendre la toxicité du pyrène vis-à-vis d'organismes en présence de sédiments, il est important de bien comprendre la partition du pyrène entre les différents compartiments (sédiment, eau interstitielle et eau surnageante). Pour cela, l'analyse du coefficient de partage ( $K_{oc}$ ) et des teneurs en pyrène des eaux est essentielle. A partir des résultats de dosage du pyrène dans les sédiments entiers et dans les eaux interstitielles, il est possible de calculer des coefficients de partage eau/carbone organique du sédiment ( $K_{oc}$  apparents) selon la formule suivante issue de la théorie du partage à l'équilibre (Di Toro *et al.*, 1991) :

$$K_p = C_s / C_d = f_{oc} * K_{oc}$$

où  $K_p$  = coefficient de partage du composé hydrophobe entre l'eau interstitielle et les particules du sédiment (en L/kg de carbone),

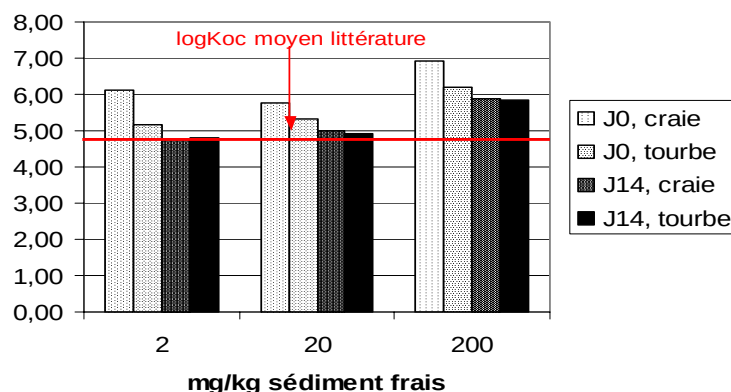
$C_s$  = concentration dans la phase particulaire  $C_s$  (en  $\mu\text{g/kg}$  de sédiment sec)

$C_d$  = concentration du composé dissous dans l'eau interstitielle (en  $\mu\text{g/L}$ )

$f_{oc}$  = fraction en carbone organique du sédiment (en kg de carbone/ kg de sédiment)

$K_{oc}$  = coefficient de partage du composé entre l'eau interstitielle et le carbone organique du sédiment (en L/kg de carbone)

En écrivant que  $K_{oc} = C_s / (C_d * f_{oc}) = (C_s/f_{oc})/C_d$ , on exprime le fait que  $K_{oc}$  est le rapport entre la concentration dans le sédiment normalisée par rapport au CO (soit  $C_s/f_{oc}$  c'est-à-dire la teneur exprimée par rapport à la quantité de carbone) et la concentration dans l'eau interstitielle.



**Figure 4.6 :** Valeurs de  $\log(K_{oc})$  apparents du pyrène au cours du test *Hyalella azteca* à J0 et J14

Les valeurs de  $K_{oc}$  calculées (**figure 4.6**) sont proches des valeurs moyennes trouvées dans la littérature (entre 3.11 et 6.51, ou 4.82 en moyenne selon Irwin *et al.*, 1997). Nos résultats confirment que la majorité du pyrène se trouve adsorbé sur le sédiment. Les teneurs en pyrène des eaux surnageantes restent assez faibles (0.6 µg/L au maximum en fin de test).

**Tableau 4.5.** Doses de pyrène dans les amphipodes en fin d'essai et effets observés sur la survie et la croissance (en gras : effets significatifs)

|        | Doses<br>organismes<br>µmol pyr/g pf | Mortalité<br>14 jours<br>% | Inhibition de croissance<br>% |
|--------|--------------------------------------|----------------------------|-------------------------------|
| Craie  | 0.47                                 | 13 +/- 15.3                | 12                            |
|        | 1.54                                 | <b>43 +/- 5.8</b>          | <b>56</b>                     |
|        | 23.38                                | <b>63 +/- 5.8</b>          | <b>22</b>                     |
| Tourbe | 0.044                                | 17 +/- 11.6                | 12                            |
|        | 2.32                                 | 23 +/- 5.8                 | 25                            |
|        | 12.66                                | 50 +/- 26.5                | <b>61</b>                     |

Par contre, les teneurs dans les eaux interstitielles sont élevées (jusqu'à 19 µg/L pour la craie en fin de test), avec des teneurs toujours plus élevées dans la craie que dans la tourbe. Sachant que les amphipodes ont répondu dans les tests en phase aqueuse sur 48 h à partir de 20 µg/L, les teneurs mesurées dans les eaux interstitielles peuvent expliquer une grande partie de la toxicité observée au cours des essais en sédiment sur 14 jours. Si l'on compare données de mortalité de *Hyaella azteca* et doses de pyrène mesurées en fin de test dans les organismes (**tableau 4.5**), on constate, pour le sédiment craie, que les doses entraînant des effets sont du même ordre de grandeur que la dose interne nécessaire pour entraîner 50% de mortalité chez *Diporeia* spp., soit 6 µmol/g poids frais d'organisme, qui est aussi la dose nécessaire pour observer des effets narcotiques (modifications et transformations physiques de la membrane phospholipidique par adsorption de composés hydrophobes (apolaires)) sur une variété d'organismes (Landrum *et al.*, 1992, 1994). Dans le sédiment tourbeux, les résultats de mortalité ne sont pas significatifs (grande variabilité), par contre on a bien un effet sur la croissance pour une dose interne de 12.66 µmol/g.

Les écarts observés entre la craie et la tourbe peuvent également expliquer en partie la plus nette bioaccumulation du pyrène dans la craie que dans la tourbe, puisqu'une plus grande partie du pyrène est retrouvée dans les eaux interstitielles du sédiment crayeux. On peut également remarquer une différence au début du test des valeurs de  $K_{oc}$  avec celles rencontrées en fin de test pour les deux sédiments. Cela signifie probablement que l'équilibre de partition du pyrène n'était pas atteint en début de test.

Le **tableau 4.6** résume les paramètres à prendre en compte pour interpréter les effets observés (toxicité et bioaccumulation) et discuter sur les différences obtenues entre les deux sédiments. Au vu de ces résultats, il n'est pas possible d'expliquer la mortalité observée en fonction uniquement de la teneur en pyrène exprimée en mg/kg de sédiment sec. En effet, alors qu'à 65 mg/kg sec on n'a aucun effet sur la survie et la croissance de *Hyallela azteca* dans la tourbe, on a déjà plus de 40% de mortalité et plus de 50% d'inhibition de la croissance à 23 mg/kg sec dans la craie. En se basant sur la teneur normalisée par rapport au carbone organique on obtient des résultats un peu plus cohérents d'un sédiment à l'autre puisque jusqu'à 310 mg/kg CO dans la tourbe et 350 mg/kg CO dans la craie on n'a pas d'effet et que les premiers effets sont obtenus pour 5100 mg/kg CO en moyenne dans la tourbe et 1700 mg/kg CO dans la craie. Si l'on se base sur la teneur en pyrène en fin de test dans les eaux interstitielles, on obtient de meilleures relations de type dose-effet en prenant en compte la survie tous sédiments confondus et la croissance dans chaque sédiment.

**Tableau 4.6.** Synthèse des paramètres d'exposition et des effets au cours du test sur *Hyalella azteca* (lorsque deux valeurs sont indiquées il s'agit des résultats à J0 (à gauche) et à J14 (à droite) ; EI : eau interstitielle ; ES : eau surnageante ; bioacc. : bioaccumulation ; pyr : pyrène ; nd : non déterminé ; en gras : effets significatifs)

| Teneur en pyrène |           |             |            |           | NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> |         | COT         |             | Survie          | Poids frais         | Teneur pyr |
|------------------|-----------|-------------|------------|-----------|------------------------------|---------|-------------|-------------|-----------------|---------------------|------------|
| sédiment         |           |             | EI         | ES        | EI                           | ES      | EI          | ES          | 14 jours        | 14 jours            | bioacc.    |
| mg/kg frais      | mg/kg sec | mg/kg CO    | µg/L       | µg/L      | mg/L                         | mg/L    | mg/L        | mg/L        | %               | mg/individu         | µg/g frais |
| Tourbe           |           |             |            |           |                              |         |             |             |                 |                     |            |
| 0                | /         | /           | /          | /         | 2.06-3.66                    | nd-2.93 | 87.41-33.95 | 17.66-11.23 | 83 ± 5.8        | 1.00 ± 0.11         | /          |
| 2                | 8.5-6.3   | 41-30       | 0.29-0.52  | 0.15-0.15 | 0.20-3.02                    | nd-2.42 | 9.85-nd     | 8.42-11.49  | 83 ± 11.6       | 0.88 ± 0.39         | 8.93       |
| 20               | 66.7-62.5 | 319-299     | 1.56-3.92  | 0.35-0.21 | 0.23-4.39                    | nd-3.52 | 8.51-nd     | 7.06-11.93  | 77 ± 5.8        | 0.75 ± 0.43         | 469.63     |
| 200              | 1125-938  | 5381-4490   | 3.29-7.28  | 0.58-0.28 | 0.24-0.14                    | nd-0.11 | 10.18-nd    | 6.79-11.44  | 50 ± 26.5       | <b>0.39 ± 0.06</b>  | 2556.85    |
| Craie            |           |             |            |           |                              |         |             |             |                 |                     |            |
| 0                | /         | /           | /          | /         | 7.29-9.14                    | nd-6.28 | 88.51-53.84 | 47.38-9.88  | 87 ± 5.8        | 0.50 ± 0.005        | /          |
| 2                | 7.8-1.4   | 603-108     | 0.47-1.98  | 0.16-0.12 | 0.71-7.96                    | nd-5.47 | 9.42-nd     | 13.31-9.78  | 87 ± 15.3       | 0.44 ± 0.11         | 94.99      |
| 20               | 24.4-20.9 | 1878-1607   | 3.37-16.56 | 0.44-0.19 | 0.61-8.85                    | nd-6.08 | 9.46-nd     | 5.13-9.88   | <b>57 ± 5.8</b> | <b>0.22 ± 0.09</b>  | 311.87     |
| 200              | 283-173   | 21749-13323 | 2.65-19.14 | 0.53-0.52 | 0.58-10.63                   | nd-7.3  | 8.66-nd     | 5.52-10.5   | <b>37 ± 5.8</b> | <b>0.29 ± 0.006</b> | 4723.20    |

## 4.2. Effets du pyrène sur la croissance des macrophytes

### 4.2.1. Etude de la croissance de *Phragmites australis* en sédiments tourbeux et crayeux

Des essais préliminaires de croissance des roseaux, *Phragmites australis*, ont été menés sur les deux types de sédiments provenant du lac d'Aiguebelette, afin de comparer les capacités relatives de ceux-ci à apporter aux plantes un support et les réserves nutritives adéquates.

#### 4.2.1.1 Conditions expérimentales, origine des plantes et paramètre mesurés

Les plantes ont été cultivées dans des microcosmes en verre de 12 L de contenance avec 1 kg de sédiments surmontés par 2 L d'eau du robinet. Dans chaque microcosme, 4 plants de chaque type étaient disposés ; deux microcosmes répliqués ont été effectués par type de sédiments.

Les microcosmes ont été incubés à une température régulée à 20°C, avec une alternance de 16 h de lumière du jour (10 000 lux) et de 8 h de nuit.

Deux types de plants ont été utilisés :

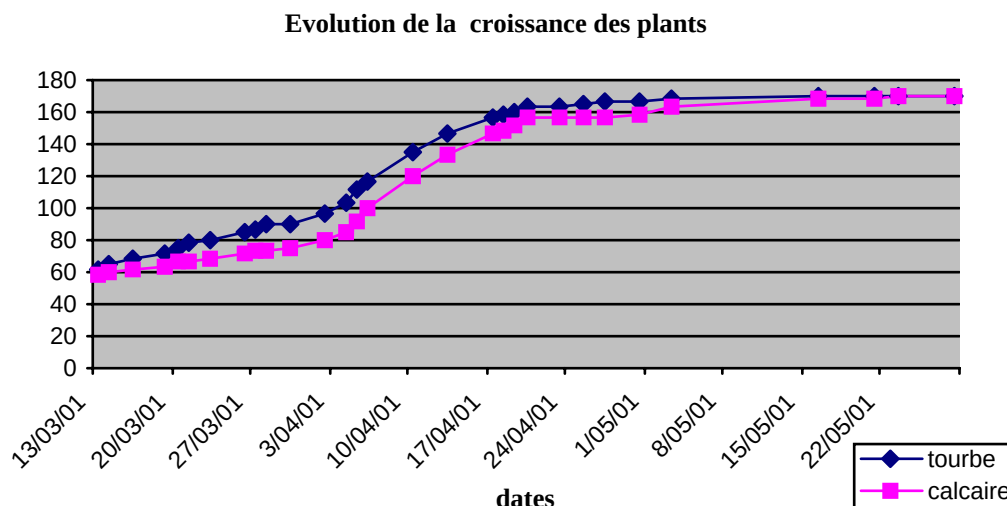
- des plants de *P. australis* issus de semis et ayant 4 feuilles, ayant des caractéristiques homogènes ;
- des boutures provenant de cultures effectuées en conditions extérieures et possédant des caractéristiques morphologiques semblables (taille, longueur de rhizome, nombre de feuilles, etc...).

On notera que les plants de *P. australis* utilisés dans cette étude sont issus de deux origines écologiques. Les plants issus des semis proviennent de clones poussant sur les îles du lac d'Aiguebelette alors que les boutures proviennent de plantes d'une station expérimentale (lit à macrophytes de Curienne, 73). Ces origines différentes ne se sont pas révélées spécifiquement en terme de différences morphologiques. La raison principale de l'utilisation des boutures est la présence d'un tissu racinaire important produisant un « effet rhizosphère » dès le début des expériences.

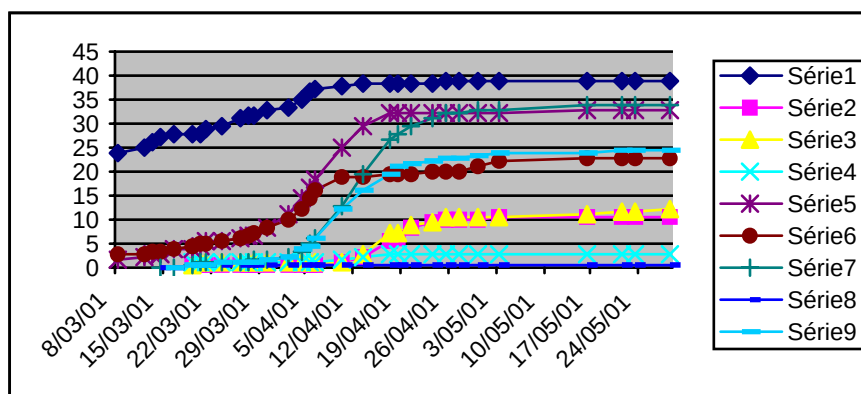
La croissance des plantes a été suivie par description de chaque plant et mesure du cumul de croissance des parties supérieures (longueur cumulée des feuilles). D'autres caractéristiques ont été relevées (couleur des plantes, développement pour les parties visibles des racines, existence de zones sombres ou claires dans les sédiments...).

#### 4.2.1.2 Résultats de croissance

Les courbes de croissance, réalisées au printemps 2001 de janvier à mars, montrent que les deux sédiments fournissent un support équivalent à la culture des roseaux (**Fig. 4.7**). Toutefois, les résultats de croissance sur tourbe sont très variables et dépendent essentiellement de l'enracinement primitif des pieds. Des boutures possédant des tissus racinaires variés donnent des résultats très variables comme le montre la figure suivante. Ces observations nous ont conduit à utiliser, à la fois, des semis et des boutures pour les expériences décrites ci-dessous et au chapitre 5. .



**Figure 4.7:** Croissance comparée des roseaux sur sédiments calcaire et tourbeux



**Figure 4.8:** Variabilité de la croissance de *P. australis* sur tourbe

La croissance des plants de roseaux est plus précoce sur le sédiment tourbeux, mais atteint des valeurs voisines de celle obtenue sur sédiments calcaires au bout de deux mois. Les différences restent significatives (seuil de validité de 2 cm), et peuvent s'expliquer par de plus fortes teneurs en phosphore et en azote minéral des sédiments tourbeux. De plus, la compacité des sédiments calcaires est défavorable à la croissance des racines sur une

durée de trois mois (durée de l'expérimentation) ; le poids moyen des plants sur tourbe était de 3,06 g en deux mois alors qu'il est de 1,29 g sur sédiments calcaires. Les rapports biomasse souterraine/biomasse supérieure (RB) sont les suivants :

RBc = Sédiment calcaire : 0,36

RBt = Sédiment tourbeux : 0,48

Les valeurs de ce rapport des plantes sur tourbe sont plus proche de la réalité (0,52) que pour celle du sédiment calcaire (0,45), mais les valeurs mesurées sur le terrain doivent être considérées comme approximatives compte tenu des difficultés d'obtention de toute la biomasse souterraine.

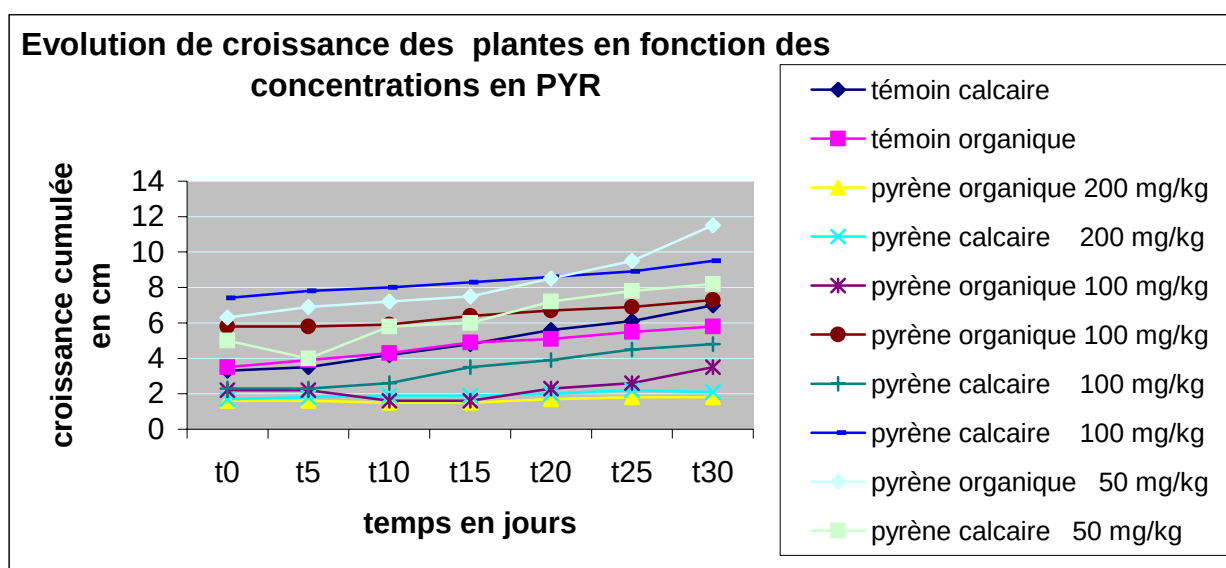
#### 4.2.2. Effet du pyrène sur la croissance des plantes

Des boutures et semis de *P. australis* ont été placés sur les deux types de sédiments en présence de 3 concentrations de pyrène.

Les sédiments ont été contaminés aux concentrations nominales de 50, 100 et 200 ppm, par la méthode dite de « wall-coating » (cf Annexe 6). Les deux dernières concentrations sont volontairement élevées afin d'obtenir des effets de toxicité sur les plantes. Les microcosmes ont été placés dans des enceintes de 12 L contenant 0,5 kg de sédiments, recouvert d'1 L d'eau, puis incubés à 20°C.

Dans une première série d'expériences, on a seulement utilisé des boutures comportant une partie de rhizome obturé à chaque extrémité, un chevelu racinaire abondant et des organes supérieurs bien développés .

On constate un effet négatif très net sur la croissance à 200 ppm de pyrène dans les deux types de sédiments (**Fig.4.9**). Le gain de croissance cumulé en 1 mois n'est que de 0,2 à 0,4cm (précision : 0,2 cm) à 200 ppm, alors qu'il atteint respectivement 3,2 et 2,3 cm à 50 et 100 ppm sur craie, 5,2 et 1,15 cm à 50 et 100 ppm sur tourbe. Dans les témoins sans pyrène les mêmes indices de croissance étaient respectivement de 3,7 et 2,3 cm sur craie et sur tourbe.



**Figur 4.9** Croissance des roseaux sur sédiments contaminés par du pyrène

#### 4.3 Biodégradabilité du pyrène photo-oxdé par les bactéries

Il s'agissait de savoir si la photo-oxdation du pyrène avait un effet sur la croissance et/ou la biodégradation par la souche de *Mycobacterium* 6PY1 que nous étudions.

Un essai préliminaire a été réalisé sur un échantillon de pyrène photo irradié à sec qui a été dissout à 1 g/L dans 15 mL d'huile de silicone. L'échantillon a ensuite été réparti dans 2 cultures : (i) une culture de 5 ml contenant du benzoate pour substrat, pour savoir si les produits de photo-oxdation ont un effet inhibiteur sur la croissance

(ii) une culture de 10 ml sans aucune source de carbone que le pyrène irradié.

Des cultures contrôles ont été menées en parallèle avec du pyrène non irradié.

Les résultats ont montré que la photo-oxdation du pyrène n'a que très peu d'effets sur la croissance. La dégradation du pyrène traité par irradiation est totale et n'est pas très différente de celle du pyrène contrôle au plan cinétique.

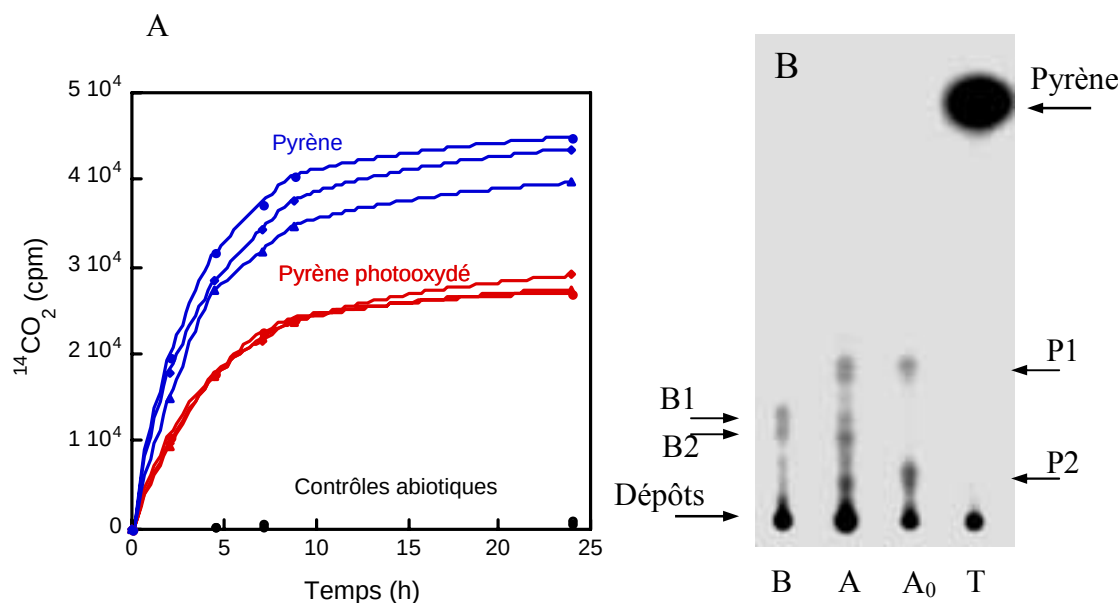
L'expérience a été renouvelée en utilisant le  $^{14}\text{C}$ -pyrène comme substrat. Pour cela, le pyrène marqué a été dissout au préalable dans le milieu de culture à raison de 40  $\mu\text{Ci}$  par litre soit 0,145 mg/L. Après quoi, la moitié de la solution a été photo-irradiée (lot A), le reste servant aux tests de contrôle (lot B). La solution a ensuite été répartie dans des fioles de 25 mL bouchées comportant un piège à  $\text{CO}_2$  (fioles de Warburg), à raison de 5 mL par fiole, 4 fioles par lot. Pour chaque lot, trois fioles ont été inoculées avec environ  $5 \cdot 10^8$  bactéries de la



souche 6PY1, une fiole non inoculée servant de contrôle abiotique. Les fioles ont été incubées à température ambiante et le  $^{14}\text{CO}_2$  piégé a été quantifié par comptage.

Les cinétiques de minéralisation sont reproductibles et montrent que la photo-oxydation préalable du pyrène n'a que peu d'incidence sur la vitesse de minéralisation (**Fig. 4-10A**). Cependant, le bilan de la minéralisation après 24 h montre une diminution d'environ 1/3 du pourcentage de biotransformation par rapport au témoin de bactéries incubées en présence de pyrène non photo-oxydé.

Une analyse des produits de photo-oxydation et de biodégradation a été effectuée en début et en fin d'expérience par chromatographie couche mince et autoradiographie (**Fig. 4-10B**). Le résultat montre que l'échantillon photo irradié ne contient plus de pyrène intact, mais indique la présence de 2 sous-produits majeurs P1 et P2 bien séparés. Après biodégradation, on observe la persistance du produit P1 alors que P2 disparaît en grande partie et que de nouveaux sous-produits apparaissent, dont 2 sont comparables à ceux obtenus par biodégradation du pyrène non-irradié (B1 et B2). Faute de temps, ces produits n'ont pu être identifiés.



**Figure 4-10** : Minéralisation du  $^{14}\text{C}$ -pyrène photo-oxydé par *Mycobacterium* 6PY1.

A : Comparaison des cinétiques de minéralisation du pyrène et de ses produits de photo oxydation.

B : Chromatographie couche mince du pyrène photo-oxydé (A<sub>0</sub>), ainsi que des produits hydrosolubles extraits après 24 h d'incubation avec la souche 6PY1 : A, photo-oxydation + biodégradation ; B, biodégradation ; T, témoin  $^{14}\text{C}$ -pyrène non traité

En conclusion, ces expériences montrent que les produits générés par photo-oxydation du pyrène n'ont pas de caractère toxique vis-à-vis de la souche *Mycobacterium* 6PY1, tout au moins aux concentrations testées. D'autre part, les sous-produits de photo-oxydation sont dans une large mesure, métabolisables par les bactéries et peuvent leur servir de substrat carboné pour la croissance.

## **5. DEVENIR DU PYRENE EN MICROCOSMES CLOS**

### **5.1 Description du dispositif expérimental**

Les expériences de minéralisation ont été conduites dans des jarres transparentes d'une capacité maximale de 2,4 L, normalement destinées à l'incubation des boîtes de Pétri en anaérobiose. Ces jarres peuvent être fermées hermétiquement à l'aide d'un couvercle. Pour les besoins de l'expérience, le couvercle a été percé pour créer un orifice de 5 mm, lequel a été obturé par un bouchon de caoutchouc. Ce dispositif a permis d'alimenter la jarre fermée par un flux d'air, par le biais d'un jeu de deux aiguilles entrée-sortie traversant le bouchon.

Chaque microcosme expérimental était constitué d'une jarre contenant 300g de sédiment, 250 ml d'eau et, le cas échéant, des plantes ou un amendement bactérien selon les conditions décrites ci-dessous.

Les microcosmes ont été placés sous une Sorbonne, dans laquelle a été installé un éclairage par deux tubes fluorescents placés horizontalement, créant une lumière blanche « naturelle » propre à la croissance des plantes. Les microcosmes contenant des plantes ont été placés à 20 cm des lampes.

Les microcosmes étaient en outre reliés à un système d'alimentation d'air par deux jeux de tubulure souple indépendants. Le système d'alimentation d'air comportait une bouteille d'air comprimé, un régulateur de débit, un filtre microbiologique et un flacon laveur pour humidifier l'air. Sur chaque tubulure de sortie des microcosmes, une cartouche de résine hydrophobe destinée à piéger le pyrène éventuellement entraîné sous forme d'aérosol a été installée. Cette cartouche était ensuite reliée à deux pièges à CO<sub>2</sub> en série, constitués de tubes de verre 30 ml contenant respectivement 15 et 10 ml de soude 1 N. Une photographie du dispositif expérimental est présentée à la **figure 5.1**.

### **5.2. Conditions opératoires et paramètres mesurés**

La préparation du microcosme et le dopage des sédiments avec le pyrène marqué au <sup>14</sup>C se sont déroulés selon la procédure suivante : chaque jarre vide a reçu 15 mg de mélange de pyrène froid et marqué équivalent à 3 µCi (50 ppm/kg de sédiment humide). Après évaporation du solvant, 300 g de sédiments ont été répartis dans chaque jarre, et le mélange a été homogénéisé par incubation 3 h à 100 rpm sur un agitateur rotatif.

Après quoi, cinq lots de microcosme ont été réalisés :

- les lots A et B (3 microcosmes) ont reçu 5 plants de roseaux dont 3 issus de semis, 2 boutures, ainsi que 5 lentilles d'eau.
- les lots B et C (2 microcosmes) ont reçu un amendement de *Mycobacterium* 6PYI à raison de  $1,4 \cdot 10^7$  bactéries par g de sédiment humide.
- le lot D (2 microcosmes) n'a reçu aucun supplément, et le lot E (2 microcosmes) a reçu 3g/kg de sédiment d'azote de sodium en tant qu'agent anti-microbien.



**Figure 5.1 :** Photographie du dispositif expérimental montrant les 12 microcosmes (enceintes transparentes contenant une couche de sédiments de 2 cm surmontée d'une colonne d'eau de 3 cm) et les tubulures d'entrée et sortie d'air. En arrière plan, se trouvent 2 tubes fluorescents diffusant un éclairage de type lumière du jour.

Les microcosmes ont ensuite été complétés par 250 ml d'eau stérile puis fermés hermétiquement et incubés à température ambiante ( $23 \pm 2^\circ\text{C}$ ) sous un éclairage jour/nuit de 16h/8h. Chaque microcosme a été alimenté en continu par un flux d'air régulé à environ 1L/h ( $\pm 0,5$ ), permettant l'entraînement du  $^{14}\text{CO}_2$  vers le piège alcalin. Chaque semaine, la radioactivité accumulée dans le piège a été comptée et la solution de soude renouvelée. Les

cartouches de résine hydrophobe ont été renouvelées et analysées pour quantifier la fraction de pyrène entraînée par aérosols.

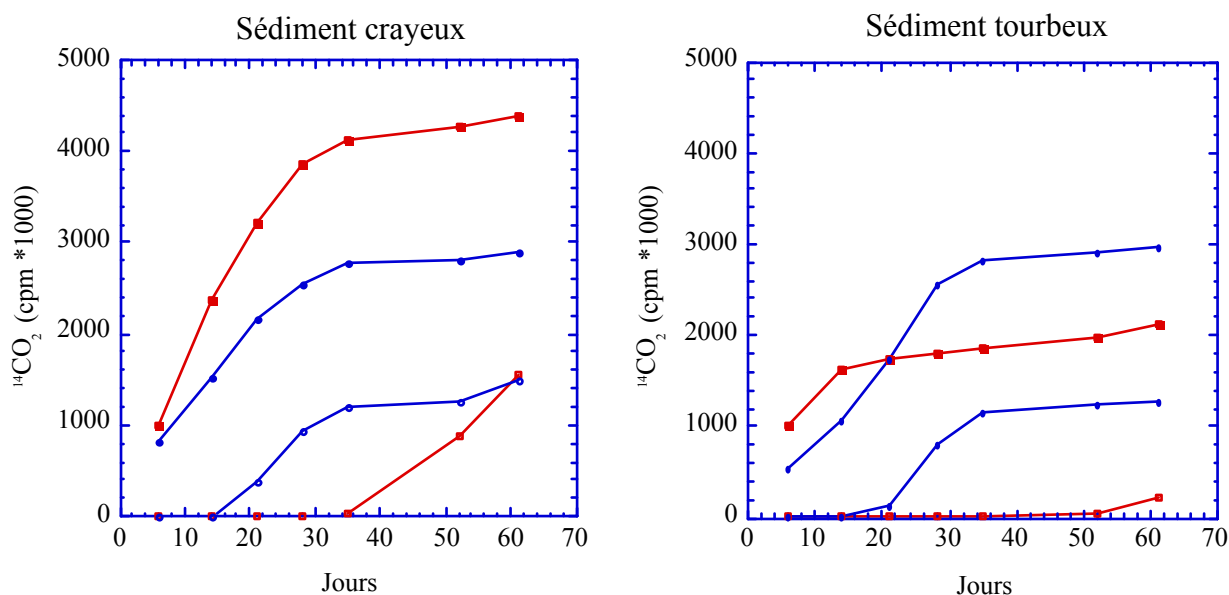
### 5.3 Cinétiques de minéralisation du pyrène

#### 5.3.1 Essais préliminaires de minéralisation du pyrène par les microorganismes des sédiments

Avant de mettre en œuvre les expériences en microcosmes, des tests ont été effectués à plus petite échelle pour évaluer l'incidence de certains paramètres sur la dégradation du pyrène. Il s'agissait notamment de déterminer si les deux sédiments étudiés contenaient des bactéries capables de dégrader le pyrène, d'avoir une idée de la cinétique de dégradation et de connaître l'effet d'un amendement de bactéries sélectionnées (souche 6PY1). Ces expériences ont été conduites dans des fioles de verre closes de 250 mL contenant 20 g de sédiment, 100 mL d'eau, et 50 µg de pyrène marqué au  $^{14}\text{C}$ . Les fioles ont été incubées à température ambiante et sans agitation. Un dispositif de piège à  $\text{CO}_2$  installé à l'intérieur a permis de mesurer la minéralisation à raison d'une mesure par semaine (cf annexe 5 ) sur une période de 8 semaines.

Les tests ont été réalisés selon les conditions indiquées dans la légende de la Fig. 5.2. La minéralisation du pyrène a été fortement stimulée par l'addition de *Mycobacterium* 6PY1 (**Fig.5.2**). La cinétique de minéralisation débute sans temps de latence et atteint un palier vers le 30<sup>ème</sup> jour. La stérilisation préalable du sédiment a eu pour conséquence un accroissement de la vitesse de minéralisation notamment pour le cas du sédiment crayeux. Le ralentissement de la minéralisation observé dans le cas du sédiment tourbeux (**Fig. 5.2**, carrés rouges) est peut-être dû à un piégeage du pyrène dans la matière organique de ce sédiment qui en contient davantage. La minéralisation par *Mycobacterium* a été ralentie dans les sédiments non stériles, ce qui est logique compte tenu de la compétition qu'exercent les autres bactéries et les prédateurs.

Dans les sédiments non amendés, la minéralisation du pyrène est détectable dès le 20<sup>ème</sup> jour. Bien que la cinétique et le taux de minéralisation soient plus faibles, ce résultat atteste de la présence de microorganismes aptes à dégrader le pyrène dans des sédiments considérés comme non pollués.



**Figure 5.2 :** Cinétiques de minéralisation du pyrène en fonction de la nature du sédiment, et de l'amendement avec *Mycobacterium* 6PY1. Au préalable, les sédiments ont été soit traités à l'autoclave (2 fois 15 min à un jour d'intervalle ; symboles carrés), soit utilisés sans traitement (symboles ronds). Dans certains cas, les sédiments ont été amendés avec la souche *Mycobacterium* 6PY1 à raison de  $1,5 \cdot 10^7$  bactéries par ml (■, ●).

Enfin, dans les sédiments traités à l'autoclave, une activité de dégradation d'origine biologique se développe en fin d'expérience, probablement due à des microorganismes ayant survécu à la stérilisation. Cette observation indique que les bactéries aptes à dégrader les HAP sont relativement résistantes à la chaleur. Lors des expériences en microcosmes décrites ci-dessous, nous avons eu recours à un autre mode de stérilisation pour réaliser des sédiments témoins abiotiques dépourvus d'activité vis à vis du pyrène.

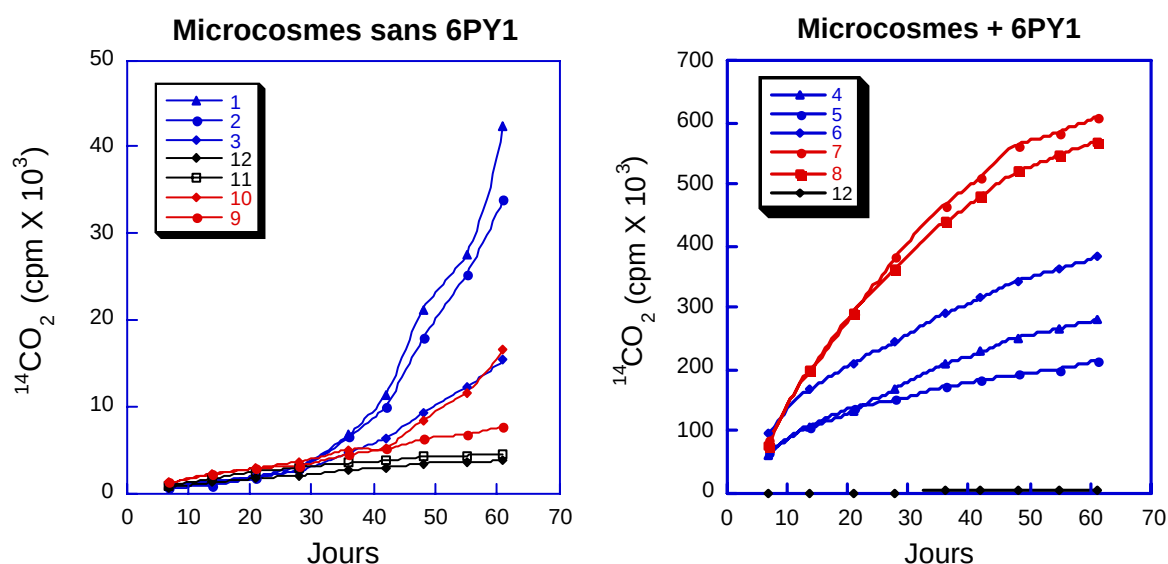
### 5.3.2. Cinétiques de minéralisation du pyrène en microcosmes

Ces expériences ont été réalisées en deux séries successives comportant chacune 12 microcosmes selon les conditions opératoires décrites ci-dessus. Dans un premier temps, l'étude a porté sur le sédiment crayeux, et s'est déroulée sur une période de 61 jours. A la fin de l'incubation, des analyses ont été faites sur les compartiments liquides et solides pour quantifier la répartition de la radioactivité et déterminer la nature des composés formés par biodégradation (§ 5.4 et 5.7). Le développement des plantes, l'effet de la rhizosphère, la bioaccumulation dans la plante ont été mesurés (§ 5.5 et 5.6). Des prélèvements de sédiments ont aussi été effectués pour analyser la microflore et évaluer l'impact de la contamination au pyrène sur la diversité bactérienne (§ 5.8).

Lors de la deuxième série d'expérience, réalisée avec le sédiment tourbeux, deux problèmes ont perturbé le déroulement normal des opérations : le pyrène ne s'est pas correctement mélangé au sédiment lors de l'étape initiale de contamination et est resté, en grande partie, collé au fond des enceintes contenant les microcosmes. De plus, la croissance des roseaux a été notablement perturbée, conduisant dans certains cas à la mort prématurée de certaines plantes. Pour ces raisons, les résultats de minéralisation sont donnés à titre indicatif, et nous n'avons pas fait d'analyses sur les microcosmes en fin d'expérience.

### 5.3.2.1. Sédiment crayeux

Les résultats de minéralisation du pyrène sont illustrés par la **figure 5.3**. Les courbes représentent pour chacun des microcosmes numérotés de 1 à 12, la quantité cumulée de  $^{14}\text{CO}_2$  radioactif en fonction du temps.



**Figure 5.3** : Cinétiques de minéralisation du pyrène en microcosmes. La numérotation correspond aux conditions suivantes : sédiment + plantes (1,2,3) ; sédiment + plantes + souche 6PY1 (4,5,6) ; sédiment + souche 6 PY1 (7,8) ; pas d'addition (9,10) ; addition de biocide (11,12)

De manière synthétique, les données expérimentales appellent les commentaires suivants:

1. Les sédiments possèdent une activité de minéralisation du pyrène endogène qui se manifeste au bout de 30 j environ dans les microcosmes 1-3, 9 et 10, ce qui confirme les résultats obtenus précédemment (**Fig. 5.2**).

2. Les roseaux ont un effet stimulant sur la minéralisation dans les sédiments non amendés par la souche 6PY1. En effet, par rapport aux microcosmes non plantés (9 et 10), la minéralisation du pyrène est plus précoce et la cinétique apparente plus rapide dans les microcosmes plantés (1,2,3). Cette stimulation est sans doute causée par l'effet rhizosphère qui sera explicité au § 5.6.
3. L'apport de bactéries sélectionnées (*Mycobacterium* 6PY1) dans le sédiment provoque une minéralisation immédiate du pyrène qui se prolonge sur au moins 61 jours, durée de l'expérience. Dans les microcosmes inoculés plantés de roseaux, la cinétique apparente de dégagement de CO<sub>2</sub> est significativement plus lente. Cette observation, apparemment contradictoire avec le premier point, sera discutée ultérieurement.
4. En présence de biocide (azoture de sodium) qui inhibe toute activité respiratoire, la minéralisation est négligeable, indiquant que le pyrène n'est pas dégradé de manière significative par voie anaérobie.

Ces observations confirment que les sédiments lacustres sains, c'est-à-dire exposés à un faible niveau de contamination par les HAP, renferment néanmoins des microorganismes capables de minéraliser le pyrène. L'identification de tels microorganismes est décrite au § 5.8.

Le temps de latence de plusieurs jours avant que la minéralisation devienne détectable peut résulter de l'augmentation de la population de l'espèce ou des espèces actives sur les HAP dès lors que le substrat est en plus forte concentration, ou bien à une induction de la synthèse des enzymes dégradatives, ou encore à la conjonction des deux phénomènes.

D'autre part, la souche que nous avons isolée au laboratoire à partir d'un sol pollué (ancienne usine à gaz), s'est montrée capable d'adaptation à un environnement fort différent (sédiments) comme l'indique la persistance de son activité de minéralisation sur une période d'au moins 8 semaines. La cinétique de minéralisation est cependant beaucoup plus lente que celle mesurée en culture pure (Krivobok et al. 2003), du fait de nombreux facteurs susceptibles de ralentir la biodégradation : compétition avec les microorganismes indigènes, diffusion d'oxygène, bio disponibilité du pyrène, etc,....

L'effet des plantes sera discuté à la lumière des résultats d'analyse présentés ci-dessous.



#### 5.3.2.2 Sédiment tourbeux

Les résultats de minéralisation sur 46 jours montrent que l'introduction de la souche 6PY1 a un effet stimulant sur toute la durée de l'expérience. L'effet des plantes n'est pas probant, ce qui n'est pas étonnant compte tenu de leur mauvais état de survie pendant l'expérience.

On peut encore une fois souligner d'une part l'existence à l'état latent dans les sédiments de microorganismes aptes à dégrader les HAP dont le pyrène, et d'autre part, la survie sur une période d'au moins 40 jours de la souche 6PY1 dans un sédiment de nature très différente.

### 5.4. Bilan de transfert du pyrène et de ses produits d'oxydation dans les microcosmes

#### 5.4.1 Volatilisation

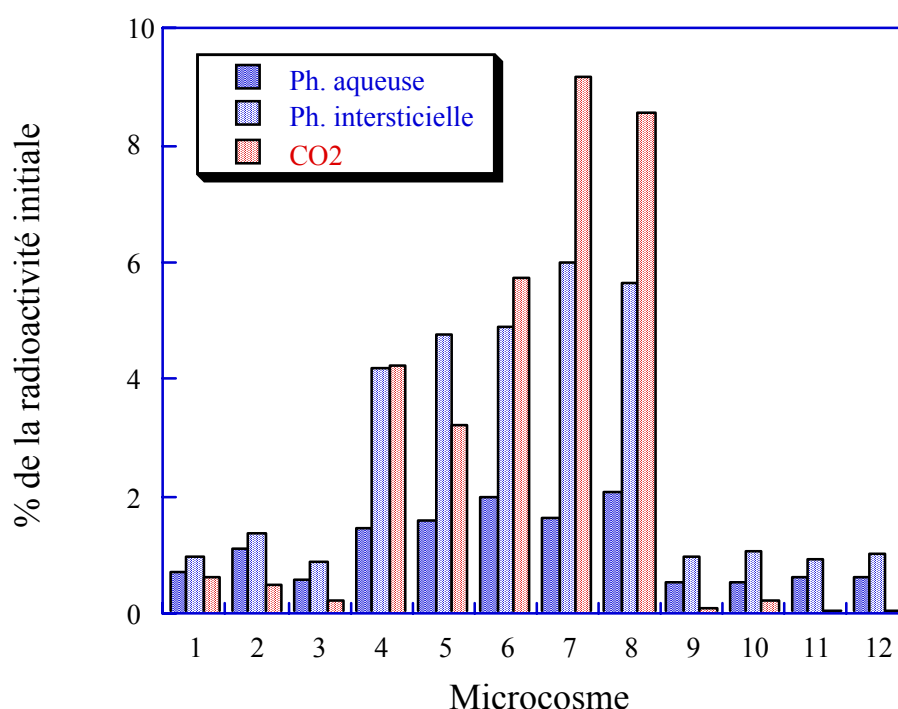
Les roseaux possèdent un système circulatoire (aérenchyme) par lequel l'air peut transiter depuis les racines vers les parties aériennes de la plante. Ce système est susceptible de véhiculer des molécules sous forme gazeuse depuis les sédiments vers l'atmosphère et pouvait donc causer un transfert de pyrène bien que cet HAP soit peu volatil. Le dispositif de piégeage des molécules hydrophobes installé en sortie des microcosmes (cartouche de résine Amberlite XAD-2) a permis d'évaluer l'importance des pertes de pyrène par volatilisation.

Du pyrène a effectivement été détecté mais en quantité très faible. La masse maximale calculée, résultant du cumul des mesures sur 61 j d'expérience, n'excède pas 0,06 % de la quantité initiale de pyrène introduite dans les microcosmes. La cinétique est plus rapide dans les 15 premiers jours d'incubation, et la présence de plantes dans les microcosmes n'a eu aucune incidence sur la volatilisation du pyrène. Les pertes de pyrène par aérosols ont donc été négligeables au cours de l'expérience.

#### 5.4.2. Répartition du pyrène et de ses sous-produits hydrosolubles dans l'eau et le sédiments

En fin d'incubation, nous avons comparé la répartition du pyrène marqué et de ses sous-produits d'oxydation dans les compartiments liquides, solides et gazeux des microcosmes. La **Figure 5.4** compare la proportion de radioactivité retrouvée dans les phases gazeuse et liquide de chaque microcosme. L'histogramme montre que la radioactivité retrouvée dans le surnageant et dans l'eau interstitielle augmente de manière proportionnelle au taux de minéralisation, indiquant que la biodégradation du pyrène s'accompagne de la formation des produits marqués hydrosolubles. L'analyse de ces produits est décrite au § 5.7.

Dans les microcosmes témoins abiotiques (11 et 12), la quantité de pyrène marqué atteint 1,5% de la masse initiale, dont 0,6% dans le surnageant et 0,9% dans l'eau interstitielle. Par le calcul, on en déduit que le pyrène atteint 0,36 mg/L dans le surnageant, soit plus de 2 fois la limite de solubilité du pyrène dans l'eau. Le dépassement apparent du seuil de solubilité pourrait s'expliquer par la présence dans l'eau de matière organique dissoute (acides humiques) à laquelle les HAP sont connus pour s'associer (cf. chapitre 3).



**Figure 5.4 :** Proportion de la radioactivité retrouvée dans les phases aqueuses et gazeuses des microcosmes après 61 jours d'incubation avec le  $^{14}\text{C}$ -pyrène. Les barres rouges ( $\text{CO}_2$ ) correspondent aux valeurs cumulées de  $^{14}\text{CO}_2$  piégé sur 61 j. La radioactivité trouvée dans le surnageant (Ph. aqueuse) et l'eau interstitielle a été déterminée à partir de comptages sur des fractions de 1 mL.

#### 5.4.3. Teneur résiduelle de pyrène dans les sédiments

La concentration résiduelle de pyrène a été estimée par HPLC et spectrophotométrie, après extraction des sédiments par le dichlorométhane. La teneur en molécules marquées des sédiments a d'autre part été dosée par comptage de radioactivité après extraction par le méthanol (**Tableau 5.1**). Par cette deuxième méthode, les valeurs obtenues montrent des écarts plus importants entre réplicats. Cependant, les teneurs moyennes de pyrène résiduel

calculées à partir des deux jeux de données sont comparables. Ces concentrations sont plus faibles que la teneur nominale (50 mg/kg) introduite dans les sédiments au début de l'expérience, y compris pour les témoins abiotiques.

**Tableau 5.1 :** Concentrations de pyrène résiduel dans les sédiments après 61 jours

| Microcosme | Caractéristiques | Extraction DCM/Dosage HPLC |         |            | Extraction MeOH/Dosage radioactivité |         |            |
|------------|------------------|----------------------------|---------|------------|--------------------------------------|---------|------------|
|            |                  | mg/kg                      | moyenne | % résiduel | cpm/g<br>( $\times 10^3$ )           | moyenne | % résiduel |
| <b>1</b>   | Sédiments        |                            |         |            | 9,790                                |         |            |
| <b>2</b>   | + plantes        | 21,7                       | 24,35   | 48,7       | 7,30                                 | 9,95    | 51,8       |
| <b>3</b>   |                  | 27,0                       |         |            | 12,78                                |         |            |
| <b>4</b>   | Sédiments        | 20,1                       |         |            | 5,61                                 |         |            |
| <b>5</b>   | + plantes        | 16,8                       | 17,5    | 35,0       | --                                   | 6,80    | 35,4       |
| <b>6</b>   | + souche 6PY1    | 15,7                       |         |            | 7,97                                 |         |            |
| <b>7</b>   | Sédiments        | 15,9                       |         |            | 5,43                                 |         |            |
| <b>8</b>   | + souche 6PY1    | 15,9                       | 15,9    | 31,8       | 4,62                                 | 5,02    | 26,1       |
| <b>9</b>   | Sédiments        | 35,4                       |         |            | 9,63                                 |         |            |
| <b>10</b>  |                  | 29,9                       | 32,7    | 65,4       | 13,0                                 | 11,3    | 58,7       |
| <b>11</b>  | Sédiments        | 30,8                       |         |            | 9,43                                 |         |            |
| <b>12</b>  | + azoture        | 28,3                       | 29,5    | 59,0       | 14,73                                | 12,1    | 62,9       |

Plusieurs explications sont possibles : (i) les méthodes employées pour l'extraction et la quantification du pyrène sous-estiment la concentration résiduelle, (ii) une partie du pyrène n'est pas extractible car séquestré dans le sédiment. Dans les microcosmes où le pyrène a été biodégradé, il se peut aussi que du pyrène partiellement oxydé se retrouve fixé par covalence dans la matière organique (Eschenbach et al., 1998), (iii) une fraction du pyrène s'est adsorbé sur les parois de l'enceinte contenant les microcosmes.

Toujours est-il qu'une nette corrélation apparaît entre le taux de minéralisation, la formation de molécules marquées hydrosolubles et la diminution de la teneur en pyrène résiduel, les trois effets résultant de la biodégradation bactérienne.

## 5.5. Bioaccumulation du pyrène dans les plants de *Phragmites australis*

### 5.5.1. Etude préliminaire de la répartition de pyrène dans les plantes

Ces expériences ont été effectuées dans des microcosmes de 12 L selon les conditions décrites au § 4.3. Le pyrène a été incorporé aux sédiments aux concentrations de 50,100 et 200 ppm.

Après 20 jours d'incubation, les concentrations de pyrène dans les organes supérieurs (tiges, feuilles) et les organes souterrains des plants (rhizomes et racines) ont été analysées après extraction au dichlorométhane (**Tableau 5.2**).

**Tableau 5.2:** Répartition du pyrène dans les plantes en fonction de la teneur initiale en pyrène dans les sédiments

| Conditions expérimentales  | Concentration du pyrène dans les racines (µg/g) | Concentration du pyrène dans les tiges (µg/g) |
|----------------------------|-------------------------------------------------|-----------------------------------------------|
| Témoin tourbe              | Non détecté                                     | Non détecté                                   |
| Témoin calcaire            | Non détecté                                     | Non détecté                                   |
| Tourbe 50 ppm              | 197                                             | 164                                           |
| Sédiment calcaire 50 ppm   | 216                                             | 181                                           |
| Tourbe contaminé 100 ppm   | 341                                             | 274                                           |
| Calcaire contaminé 100 ppm | 1157                                            | 369                                           |
| Tourbe contaminé 200 ppm   | 594                                             | 317                                           |
| Calcaire contaminé 200 ppm | 755                                             | 347                                           |

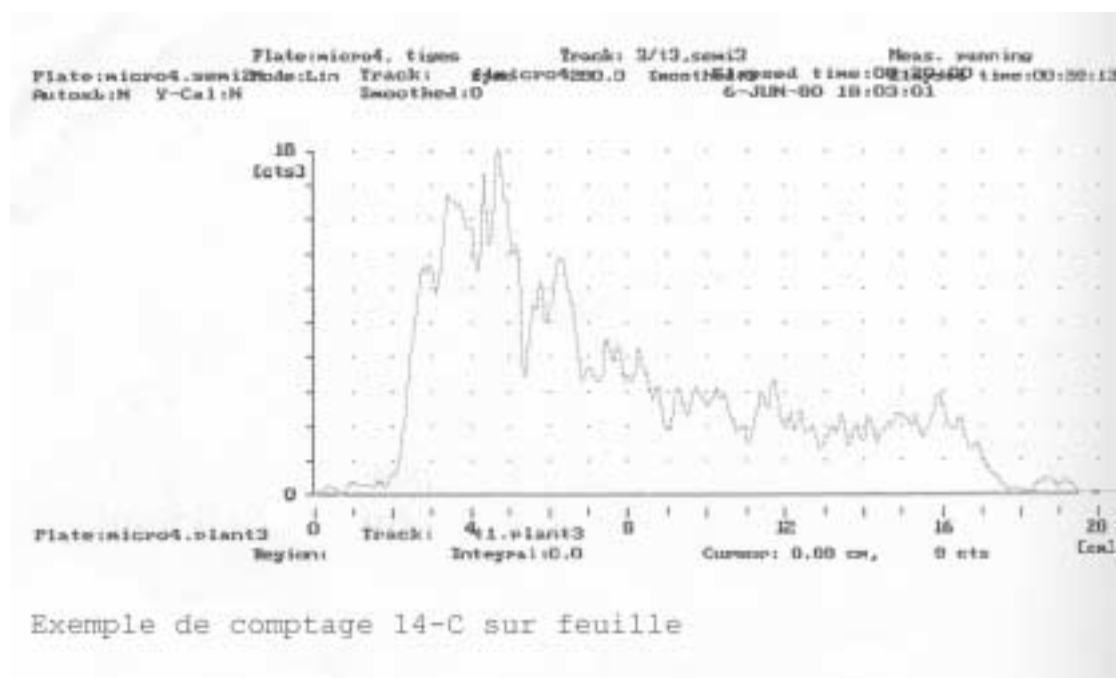
Les résultats mettent en évidence une accumulation systématiquement plus élevée dans les racines et plus particulièrement dans le cas des sédiments calcaires. Les concentrations sont, pour cette série, plus élevées pour les teneurs nominales de 100 ppm alors que pour 200 ppm on constate une diminution d'incorporation du pyrène qui va de pair avec l'apparition d'une toxicité se traduisant par une inhibition de la croissance.

#### 5.5.2. Répartition de la radioactivité dans les plantes cultivées sur sédiments contaminés par le $^{14}\text{C}$ -pyrène

Les expériences décrites ci-dessous concernent des microcosmes faits de sédiments craie contaminés par 50 ppm de  $^{14}\text{C}$ -pyrène. Elles ont été réalisées en enceintes closes de 12 L contenant 0,5 kg de sédiments comme ci-dessus, ou bien en enceintes de 2,5 L comme indiqué au § 5.2. Le traceur radioactif a permis de connaître la répartition du pyrène et des molécules marquées produites par bio transformation dans les différentes parties des plantes.

Les plants ont été mesurés et photographiés, puis, en fin d'expérience, analysés par radiographie  $\beta$ , ou bien par comptage de radioactivité d'extraits en solvant des organes des plantes. Ne sont présentés ici que les résultats principaux.

D'une manière générale, les comptages de radioactivité ont montré des valeurs plus élevées à la base des feuilles et également dans la partie basale des tiges, ainsi que l'illustrent la **figure 5.5**. Ces résultats mettent en évidence une accumulation non homogène de molécules marquées (pyrène + métabolites) dans les plantes au cours des 10 à 15 premiers jours de l'incubation.



**Figure 5.5** : Répartition de la radioactivité dans une feuille mesurée à l'aide d'un scanner  $\beta$

Le devenir du pyrène dans les plantes a été particulièrement étudié dans le cadre des expériences décrites ci-dessus (§ 5.1 à 5.4), et concernant une série de 12 microcosmes dont 6 contenaient des plantes. Pendant la période d'incubation de 61 jours, la croissance des plantes n'a pas été visiblement perturbée par la dose de pyrène introduite dans les sédiments (50 ppm < dose de 200 ppm à partir de laquelle un effet inhibiteur est mesurable, cf. § 4. 3), ni par l'inoculation des sédiments par la souche *Mycobacterium* 6PY1 (Fig. 5.6).



**Figure 5.6 :** Plantes en place dans le microcosme n°4 après 61 jours d'incubation. En fin d'expérience, les plantes ont été prélevées, débarrassées des sédiments, puis soumises à des comptages de radioactivité soit directement par scanner  $\beta$  (annexe 5), soit par comptage d'extraits méthanoliques après découpe et regroupement par type d'organe (Tableau 5.3).

A la fin de l'incubation, les plantes ont été prélevées, mesurées, pesées, puis soumises à une mesure de la radioactivité incorporée soit par scanner  $\beta$ , soit par comptage après fractionnement et extraction (annexe 5). Dans ce dernier cas, les organes de toutes les plantes d'un même microcosme ont été regroupés puis extraits ensemble par le méthanol. La teneur en pyrène des extraits organiques de plante a aussi été déterminée par dosage HPLC. Les résultats des analyses sont présentés dans le **tableau 5.3**.

La teneur en pyrène détecté dans les différents organes des plantes est très différente selon que les microcosmes ont été ou non inoculés avec la souche 6PY1, c'est-à-dire selon que le pyrène a été bio-transformé ou pas. Ainsi, la concentration mesurée s'est avérée environ 10 fois plus faible dans les plantes des microcosmes 3 à 6. Cependant, la radioactivité mesurée sur les mêmes extraits indique un taux d'incorporation équivalent, voire 1,5 à 2 fois supérieur, dans les fractions provenant des microcosmes 3-6 par rapport aux fractions provenant des microcosmes 1-3. En tenant compte de la radioactivité spécifique du  $^{14}\text{C}$ -pyrène introduit dans les microcosmes au début de l'expérience, on peut calculer la contribution du pyrène intact à la radioactivité de chaque extrait en se basant sur les quantités dosées par HPLC

(**Tableau 5.3**). Cette estimation indique que le  $^{14}\text{C}$ -pyrène ne représente que 50% de la radioactivité incorporée dans les racines, et 19-28% de celle trouvée dans les tiges et les feuilles dans le cas des plantes des microcosmes 1-3 (A noter que la concentration de pyrène trouvée dans l'extrait de bases de feuilles a été probablement surestimée). Dans les microcosmes 4-6, le pyrène ne représente qu'une partie négligeable de la radioactivité bio-accumulée.

Ces résultats suggèrent que les plantes incorporent beaucoup plus facilement les métabolites hydrosolubles du pyrène générés par biodégradation du pyrène (cf. § 5.7) que le pyrène. Pour déterminer la nature des molécules marquées extraites par le méthanol, des analyses par CCM ont été réalisées dans des conditions standard (Annexe 5). Le marquage était relativement faible, les extraits ont dû être concentrés par évaporation avant analyse. L'autoradiographie confirme que le  $^{14}\text{C}$ -pyrène constitue une part importante de la radioactivité incorporée dans les plantes des microcosmes 1-3 et qu'il est indétectable dans les plantes des microcosmes 4-6. Dans ce dernier cas, l'essentiel de la radioactivité se retrouve au point de dépôt ; ceci ne correspond à aucun des métabolites identifiés dans la phase aqueuse (cf. § 5.7). On peut penser qu'il s'agit de métabolites liés ou séquestrés dans les tissus de la plante, ou encore de molécules marquées métabolisées par les plantes.

**Tableau 5.3 :** Incorporation de radioactivité et de pyrène dans les organes de plantes après 61 j d'incubation en présence de sédiments contaminés par du  $^{14}\text{C}$ -pyrène

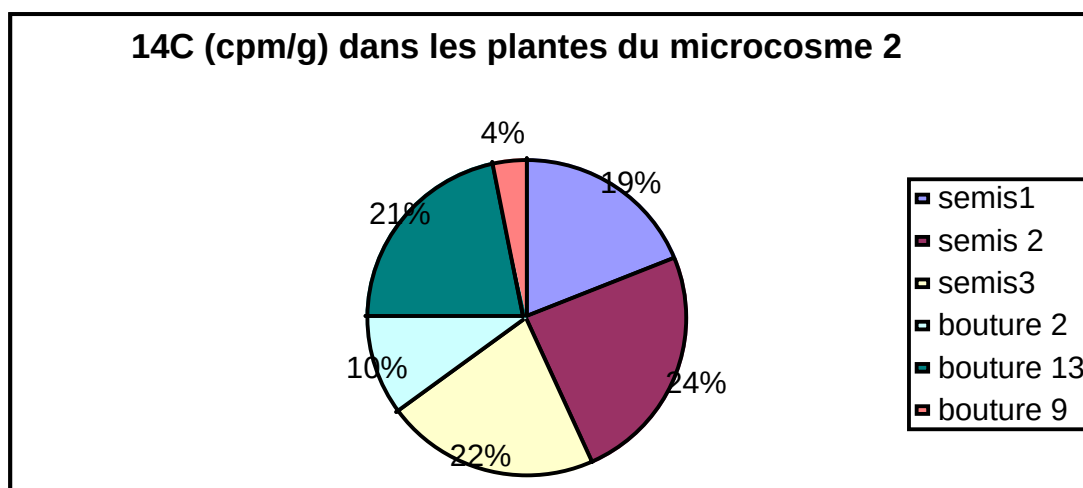
| Extraits      | Microcosmes 1 à 3 |                               |                        |                           |                                                   | Microcosmes 4 à 6 (+ <i>Mycobacterium</i> 6PY1) |                               |                        |                           |                                                   |
|---------------|-------------------|-------------------------------|------------------------|---------------------------|---------------------------------------------------|-------------------------------------------------|-------------------------------|------------------------|---------------------------|---------------------------------------------------|
|               | Masse<br>(mg)     | $^{14}\text{C}$ /extr.<br>cpm | cpm/g<br>$\times 10^3$ | Pyrène<br>$\mu\text{g/g}$ | $^{14}\text{C}$ -pyrène <sup>a</sup><br>cpm/g (%) | Masse<br>plante                                 | $^{14}\text{C}$ /extr.<br>cpm | cpm/g<br>$\times 10^3$ | Pyrène<br>$\mu\text{g/g}$ | $^{14}\text{C}$ -pyrène <sup>a</sup><br>cpm/g (%) |
| Racines       | 40,8              | 7600                          | 186                    | 242                       | 93,6 (50)                                         | 30,2                                            | 4840                          | 160                    | 32,2                      | 12,4 (7,8)                                        |
| Feuilles Ext. | 25,4              | 2400                          | 94,5                   | 46,7                      | 18,0 (19)                                         | 27,7                                            | 4700                          | 170                    | 2,23                      | 0,86 (0,5)                                        |
| Feuilles base | 37,4              | 3600                          | 96,3                   | 282                       | 109 (113)                                         | 35,7                                            | 5600                          | 157                    | 4,04                      | 1,56 (1)                                          |
| Tiges ext.    | 21,5              | 1640                          | 76,3                   | 40,3                      | 15,5 (20)                                         | 19,6                                            | 2820                          | 144                    | 4,88                      | 1,88 (1,3)                                        |
| Tiges base    | 47,0              | 3700                          | 78,7                   | 58,2                      | 22,4 (28)                                         | 29,7                                            | 4660                          | 157                    | 2,92                      | 1,12 (0,7)                                        |

<sup>a</sup> Radioactivité due au  $^{14}\text{C}$ -pyrène calculée en se basant sur les dosages HPLC d'une part et sur la radioactivité spécifique du pyrène marqué (385 cpm/ $\mu\text{g}$ ). Le % indique la part théorique du  $^{14}\text{C}$ -pyrène à la radioactivité de l'extrait.

La question s'est posée de savoir si les plantes pouvaient incorporer de la radioactivité sous forme de  $\text{CO}_2$  par photosynthèse, en recyclant une partie du  $^{14}\text{CO}_2$  produit lors de la minéralisation du pyrène. Bien qu'on ne puisse pas l'exclure *à priori*, nous pensons que

compte tenu du balayage continu des microcosmes par de l'air, l'incorporation de radioactivité par ce biais serait négligeable.

L'incorporation de  $^{14}\text{C}$ -pyrène ou de métabolites a aussi été étudiée en fonction de la croissance des plantes. Dans ce but, la radioactivité mesurée dans les plants issus de semis a été comparée à celle mesurée dans les boutures. Les résultats obtenus dans le cas du microcosme 2, illustre le fait que la radioactivité se retrouve aux 2/3 dans les semis qui ont eu une croissance régulière dans le microcosme (**Fig. 5.7**). Les boutures, bien que pourvues d'un tissu racinaire plus important ont fixé moins de pyrène. Cette observation suggère que l'accumulation du pyrène dans les tissus résulte d'un transport actif qui serait plus efficace dans les plantes en croissance rapide (semis).



**Figure 5.7 :** Répartition de la radioactivité ( $^{14}\text{C}$ ) dans les plantes issues de boutures et de semis après 61 jours d'incubation en microcosme contaminé par le  $^{14}\text{C}$ -pyrène ( ex. microcosme n°2)

## 5.6. Effet de la rhizosphère sur l'équilibre redox des sédiments

Dans les expériences menées en microcosmes contenant ou non des macrophytes, notre objectif était de mettre en évidence l'action de ces plantes aquatiques sur les activités bactériennes des sédiments. On parlera d'effet « rhizosphère » c'est-à-dire leur capacité d'apporter de l'oxygène et des nutriments à proximité des racines.



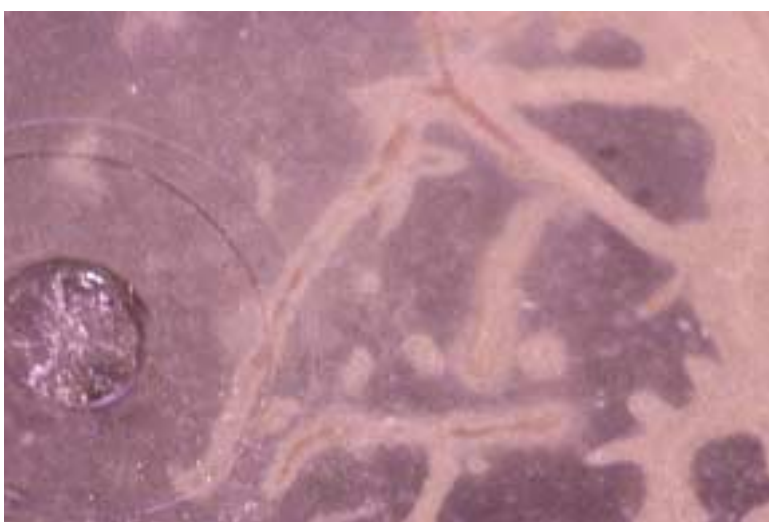
### 5.6.1. Mise en évidence de l'activité des macrophytes: dans l'espace de la rhizosphère

L'observation des microcosmes contenant des sédiments calcaires a révélé des différences de coloration dans le voisinage des jeunes racines. Les zones proximales apparaissent claires ce qui contraste avec l'aspect sombre du reste des sédiments. Ces différences sont liées à l'activité des bactéries sulfato-réductrices, qui dans la zone anoxique des sédiments, transforment le sulfates en sulfures, lesquels précipitent sous forme de sulfures métalliques de couleur sombre. Ce phénomène a notamment été décrit par Armstrong (1978).



**Figure 5.8 :** Mise en évidence de zones claires au voisinage des racines de roseaux

Des dépôts de sulfures se produisent dans les zones anoxiques (précipités noirâtres). L'absence de tels précipités à l'interface sédiments-eau et près des parties apicales des nouvelles racines, (photographies ci-contre) indique que ces zones ne sont pas anoxiques. La photo du bas montre un microcosme vu par le dessous, avec des zones claires près des racines et des zones sombres anoxiques. On note également la présence d'une plaque ferrique (taches de rouille caractéristiques autour des racines).



Les zones claires de la rhizosphère sont une manifestation de l'activité des plantes qui correspond à deux processus principaux :

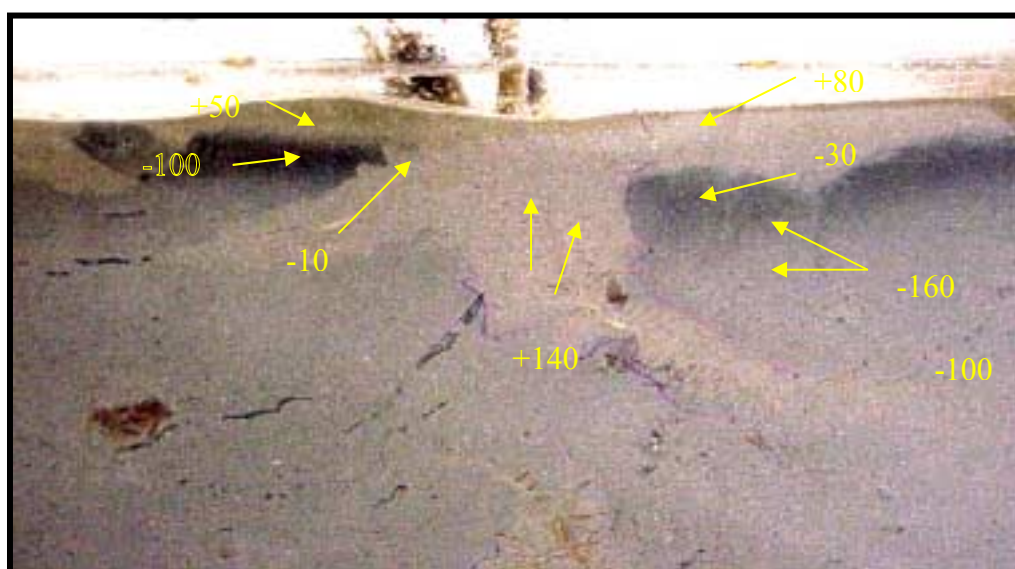
- le rejet d'oxygène par la partie apicale des racelles, résultant d'une diffusion de l'air depuis l'aérenchyme des racines,
- l'émission de composés organiques assimilables par les bactéries.

Les deux phénomènes sont susceptibles d'entraîner une stimulation du métabolisme microbien et, en particulier, de la dégradation des xénobiotiques comme le pyrène .

Les flux d'oxygène rejetés ont été mesurés dans des gammes variant de 20 à 35  $\mu\text{mol O}_2$  par jour suivant le potentiel redox environnant les racines (Armstrong, 1978). Les travaux de cet auteur et ceux de Koncova (1990) ont montré que ces émissions d'oxygène se traduisent par une augmentation des valeurs du potentiel redox de la rhizosphère.

De même, il a été montré que l'oxygène émis par les racines a un effet stimulant sur la transformation des ions ammonium en nitrate ( Tolley et al, 1986). Ce phénomène est aussi à l'origine de la formation de la plaque ferrique visible sur la figure 5 .8. Ceci correspond à des dépôts d'hydroxydes de fer ou d'autres métaux sur le pourtour des poils absorbants et des jeunes radicules.

Dans les sédiments des microcosmes, « l'effet rhizosphère » a pu être quantifié en mesurant les gradients de potentiel redox à l'aide de micro-électrodes. Les mesures montrent une excellente correspondance entre zones claires et valeurs positives et vice-versa (**Fig. 5.9**).



**Figure 5.9** : Valeurs ponctuelles du potentiel redox (en mV) dans les zones claires et sombres des sédiments calcaires. Des valeurs positives ont été trouvées dans les zones claires près de la surface et au voisinage des racines.

### 5.6.2. Relations entre l'effet rhizosphère et la stimulation de dégradation du pyrène

Les zones claires des sédiments sont donc le reflet de l'activité oxydante des racines. Pour estimer cette activité dans les microcosmes, la proportion de zones claires a été quantifiée à partir d'images du fond transparent des microcosmes. Pour cela, des photographies ont été prises en fin d'expérience (J61), et ont ensuite été soumises à un programme d'analyse d'images, pour calculer le pourcentage de surface claire sur le fond des microcosmes (**tableau 5.4**). Les valeurs obtenues peuvent être considérées, en simplifiant, comme indicatrices de l'activité des racines dans chacun des microcosmes. On remarque une réduction sensible des zones claires aérobies dans le microcosme n° 5, dans lequel la minéralisation du pyrène a été nettement plus lente que dans les microcosmes équivalents n° 4 et 6. Ceci peut être lié à la surabondance anormale d'une espèce bactérienne aérobie dans ce microcosme, comme l'analyse microbiologique l'a montré (cf.§ 5.8), ce qui peut avoir réduit l'oxygène disponible pour les bactéries dégradant le pyrène.

De plus, les différentes mesures effectuées lors du suivi des microcosmes montrent qu'il y a une bonne corrélation générale entre le poids des racines et la surface apparente des zones claires (coef corr. = 0.85), ainsi qu'entre le poids des organes supérieurs (tiges et feuilles) et la surface des zones claires des sédiments (coef corr. = 0,66 en général).

**Tableau 5.4 :** Mesures de la proportion des sédiments sous l'influence oxydante des racines (zones claires) dans les microcosmes

| N°microcosme | % zones claires |
|--------------|-----------------|
| 1            | 67,62           |
| 2            | 57,33           |
| 3            | 56,27           |
| 4            | 54,73           |
| 5            | 36,84           |
| 6            | 54,3            |

Dans les microcosmes, les mesures de potentiel rédox effectuées en fin d'expérience (J61) ont fourni les résultats présentés dans le **tableau 5.5**.

Ces résultats mettent en évidence les effets suivants :

- les plantes accentuent le contraste de valeurs de potentiel redox entre la surface des sédiments et le fond des microcosmes ( 3 cm de profondeur environ),

- la présence de la souche 6PY1 dans les microcosmes 4 à 7 ne contribue pas à modifier ces valeurs en profondeur, mais provoque une augmentation de la consommation d'oxygène sous la surface des sédiments (-5 mm, tableau 5.5).

- la présence d'azoture réduit la consommation d'oxygène en profondeur et l'état d'oxydation dans l'eau surnageante. C'est un résultat attendu puisque l'azoture est un inhibiteur de la fonction respiratoire des organismes aérobies.

**Tableau 5.5 :** Détermination des potentiels redox des sédiments suivant la présence ou l'absence de plantes

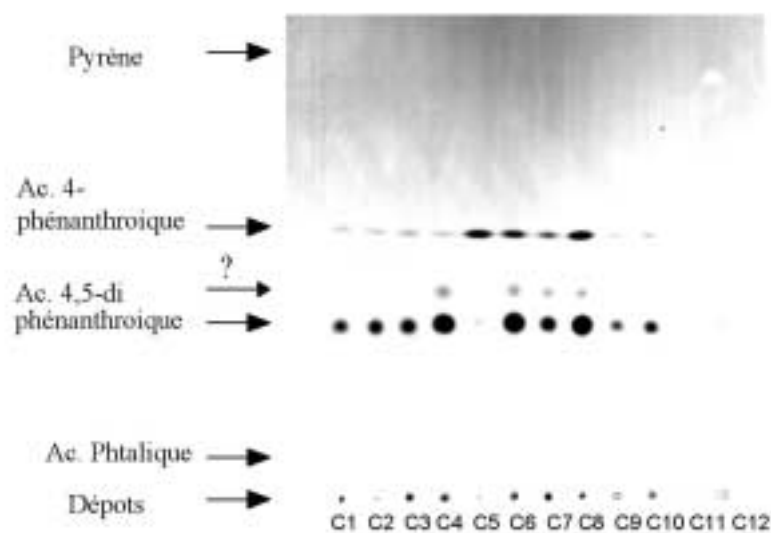
| Microcosmes | Conditions     | Redox eau<br>mV | Redox surf.<br>sédiments | Redox sédim.<br>-5 mm | Redox sédim.<br>fond<br>(z.sombre) |
|-------------|----------------|-----------------|--------------------------|-----------------------|------------------------------------|
| 1           | Plantes        | +70             | +80                      | +50                   | -110                               |
| 2           | Plantes        | +80             | +90                      | +60                   | -200                               |
| 3           | Plantes        | +70             | +75                      | +10                   | -190                               |
| 4           | Plantes + 6PY1 | +80             | +90                      | -20                   | -200                               |
| 5           | Plantes + 6PY1 | +80             | +75                      | -100                  | -190                               |
| 6           | Plantes + 6PY1 | +80             | +100                     | -90                   | -190                               |
| 9           |                | +70             | +60                      |                       | -50                                |
| 10          |                | +55             | +50                      |                       | -40                                |
| 11          | azoture        | 0               | -10                      |                       | -10                                |
| 12          | azoture        | +20             | 0                        |                       | -10                                |

Ces observations soulignent l'importance du dégagement d'oxygène dans l'entourage immédiat des racines des macrophytes sur les dégradations par les bactéries aérobies. Le rôle des racines a été démontré dans des expériences de phyto-remédiation des sols contaminés par les HAP (Wetzel et al, 1997).

### 5.7. Identification des produits de biodégradation du pyrène

L'analyse par chromatographie couche mince (CCM) d'extraits de la colonne d'eau montre que seulement trois molécules marquées sont retrouvées dans les microcosmes (**Fig. 5.10**). Ces molécules sont absentes dans les témoins abiotiques 11 et 12, et sont donc révélatrices de l'activité de biodégradation bactérienne. La molécule donnant la tache de radioactivité la plus intense a la même mobilité relative que l'acide 4,5-diphénantroïque, alors que la seconde par ordre d'intensité, forme une tache aplatie caractéristique. Ces deux molécules ont été extraites puis analysées par CPG : couplée à un détecteur de masse : il s'agit de l'acide 4,5-diphénanthroïque et de l'acide 4-phénanthroïque. La troisième molécule, donnant une tache

beaucoup moins intense, n'était pas en quantité suffisante pour pouvoir être identifiée par CPG-SM.



**Figure 5.10 :** Séparation par CCM des métabolites du  $^{14}\text{C}$ -pyrène produits dans la phase aqueuse des microcosmes. Les conditions d'extraction des métabolites et de chromatographie sont décrites en annexe 5. Les molécules marquées ont été révélées par autoradiographie. Des étalons de pyrène, d'acide phtalique, et d'acide 4,5-diphénanthroïque ont été analysés en parallèle pour connaître leur distance de migration, repérée par les flèches.

Les deux produits hydrosolubles identifiés dans les microcosmes sont des métabolites produits par la souche *Mycobacterium* 6PY1 lors de la croissance en culture pure sur pyrène (Krivobok et al., 2003). Ils se forment lors de la 3<sup>ème</sup> et de la 4<sup>ème</sup> étape de la voie de dégradation enzymatique du pyrène selon le schéma encore provisoire donné en annexe. L'accumulation de ces métabolites indique que les enzymes catalysant les étapes réactionnelles 4 et 5 ont des cinétiques lentes limitant la biodégradation du pyrène. De manière surprenante, les mêmes métabolites se sont formés dans les microcosmes non inoculés par la souche 6PY1, suggérant que les espèces bactériennes indigènes des sédiments dégradent le pyrène selon une voie métabolique semblable à celle proposée pour la souche 6PY1, au moins dans ses premières étapes. D'autre part, l'acide 4,5-diphénanthroïque apparaît comme un bon marqueur de dégradation micro biologique du pyrène.

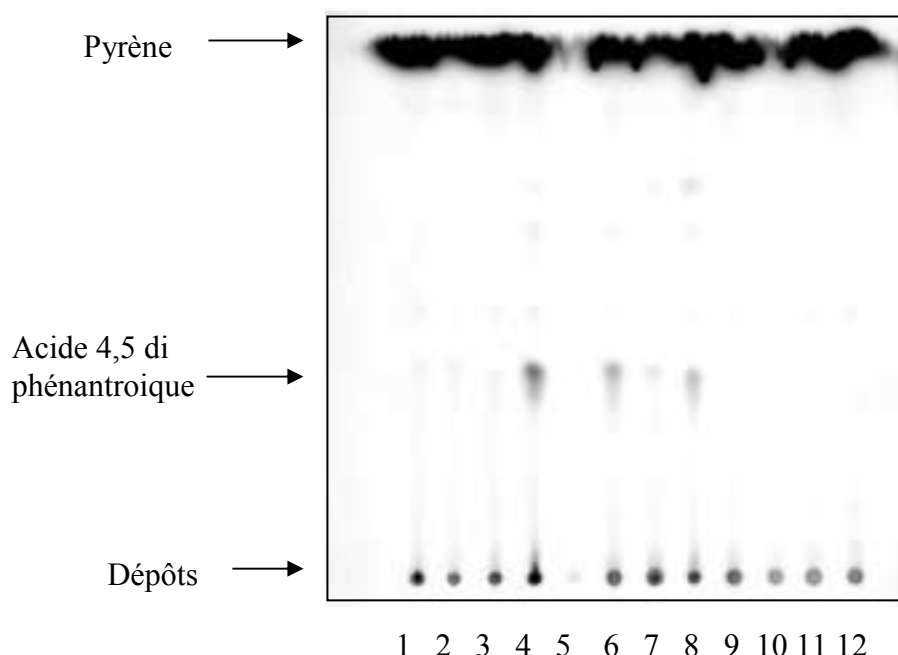
Dans le microcosme 5, seul l'acide 4-phénanthroïque était détectable en quantité significative (**Fig. 5.10**). Lors de l'extraction de l'eau surnageante, la radioactivité n'a été retenue qu'à 35% contrairement à des taux compris entre 65 et 95% dans les autres cas. Ce résultat suggère que, dans ce microcosme, l'acide 4,5-diphénanthroïque a été converti en molécules beaucoup plus hydrophiles, peut-être par une autre (ou des) espèce(s) bactérienne(s), absente(s) ou beaucoup moins abondante(s) dans les autres microcosmes. L'analyse microbiologique décrite ci-dessous a confirmé l'existence anormale de souches aptes à croître sur milieu minimum dans le microcosme 5 (§ 5.8).

On peut remarquer que le pyrène est indétectable dans les extraits d'eau surnageante, y compris dans les microcosmes témoins, où le pyrène n'a pas été minéralisé. Une partie du pyrène a pu s'adsorber sur les parois des flacons de stockage des fractions aqueuses pendant la période d'un mois qui a précédé l'analyse. Cependant, d'après les comptages de radioactivité des fractions retenues et non retenues lors de l'extraction, les pertes par adsorption n'ont pu excéder 25% en moyenne.

Dans le cas des microcosmes témoins, la radioactivité s'est partagé moitié-moitié entre la fraction retenue sur colonne SPE et la fraction non retenue (cf. Annexe 5 pour plus de détails). La fraction non retenue pourrait contenir des complexes peu hydrophobes de pyrène avec des acides humiques ou d'autres molécules amphiphiles, la fraction retenue pouvant renfermer du pyrène libre. Il se peut que ce pyrène libre élué en 50% méthanol se soit volatilisé lors de l'évaporation du solvant, et de ce fait, n'ait pas pu être détecté par CCM. Faute de temps, les fractions représentant l'eau interstitielle n'ont pu être analysées.

Les molécules marquées retenues dans les sédiments ont été analysées après extraction par le méthanol. Les extraits contenaient assez de radioactivité pour être analysés directement par CCM sans évaporation préalable. Le résultat montre que l'essentiel de la radioactivité est associé au pyrène (**Fig.5.11**).

Dans les extraits correspondant aux microcosmes où la minéralisation a été maximale (4 à 8), une tache d'acide 4,5-diphénanthroïque est aussi détectable (à l'exception du microcosme 5, ce qui conforte l'hypothèse selon laquelle ce métabolite a été dégradé par une espèce bactérienne qui s'est développée seulement dans ce microcosme).



**Figure 5.11** : Séparation par CCM du  $^{14}\text{C}$ -pyrène et des métabolites produits dans les sédiments des microcosmes. Les sédiments ont été extraits au méthanol. Les molécules marquées ont été révélées par autoradiographie.

### 5.8. Analyses de la microflore bactérienne des sédiments contaminés par le pyrène

Les résultats présentés jusqu'à présent indiquent que les bactéries jouent un rôle majeur dans la transformation du pyrène en microcosmes. Il était donc logique d'analyser le compartiment microbien des microcosmes étudiés ci-dessus. Deux approches ont été employées : la première est classique et repose sur des méthodes microbiologiques de comptages par microscopie et de culture sur milieu sélectif. La seconde fait appel à des techniques de biologie moléculaire que nous avons du adapter. Il s'agissait notamment d'extraire l'ADN des sédiments, amplifier des gènes cibles (ADNr 16S de ribosome) pour permettre ensuite l'analyse de la diversité bactérienne par des techniques telles que la DGGE ou la SSCP.

Nous avons mis au point une méthode, décrite en annexe, permettant d'isoler, à partir de 1-2 g de chacun des sédiments étudiés, de l'ADN de qualité et en quantité suffisante pour amplifier les ADNr 16S bactériens. Cependant, nous n'avons pas pu obtenir d'images de la diversité bactérienne des sédiments, parce que les techniques que nous avons testées se sont avérées délicates à mettre en oeuvre (TTGE, DGGE ou SSCP).

Nous avons également mis au point au cours de cette étude une technique de détection d'espèces du genre *Mycobacterium* par fluorescence in situ ou FISH (fluorescence in situ hybridization). Cette méthode permet de visualiser de manière spécifique *Mycobacterium* par microscopie. Nous comptons la mettre en œuvre pour quantifier ce type de bactéries dans les sédiments, et évaluer la survie de la souche 6PY1 dans les microcosmes en fonction de différents scénarios (effet des plantes, effet du pyrène, etc....). Faute de temps, ces analyses n'ont pas été réalisées.

Les résultats présentés ci-dessous comparent la microflore bactérienne dans les microcosmes décrits ci-dessus à 61 j d'incubation. Comme les microcosmes étaient clos, il n'était pas possible de faire de prélèvements pour suivre les variations de la microflore au cours de l'expérience. Il s'agit donc d'un constat ponctuel visant à rendre compte globalement des effets des plantes et du pyrène sur la microflore.

#### 5.8.1. Comptages de bactéries

Les résultats des dénombrements totaux des bactéries dans les sédiments par comptage microscopique, ainsi que le dénombrement des bactéries capables de dégrader le pyrène sur milieu gélosé (zones de dégradation) sont montrés dans le tableau 5.4. En ce qui concerne les comptages microscopiques, on peut constater que le nombre total de bactéries dans le sédiment est augmenté par l'ajout de plantes et/ou par l'ajout de *Mycobacterium gilvum* 6PY1. Si on calcule la différence entre le nombre de bactéries dans les microcosmes amendés avec la souche 6PY1 et celui trouvé dans les microcosmes non amendés, on trouve de  $4,4 \times 10^7$  pour les microcosmes avec plantes et de  $3,6 \times 10^7$  pour les microcosmes sans plantes. Ces valeurs sont proches du nombre de bactériesensemencées initialement(souche 6PY1), estimé à  $3,4 \times 10^7$  par g de sédiment. La proportion de bactéries vivantes (colorées vertes par le réactif BacLight) était >90% dans l'ensemble des microcosmes, à l'exception du microcosme 5, dans lequel environ 50% des bactéries extraites du sédiments étaient mortes (colorées rouges).

Le nombre de bactéries produisant des zones de dégradation du pyrène sur milieu gélosé était largement supérieur (35 à 70 fois) dans les sédiments des microcosmes ensemencés avec la souche 6PY1. En revanche, le nombre absolu déterminé ( $1,8 \times 10^6$ ) et 20 fois inférieur au nombre de cellules ajoutées initialement (voir paragraphe précédente). Trois explications sont possibles: (1) la méthode de dénombrement sous-estime le nombre de bactéries capables de dégrader le pyrène; (2) la majorité des bactéries inoculées (6PY1) sont



mortes au cours de l'expérience; (3) la souche 6PY1 est restée adsorbée aux particules de sédiment ou au contraire, a migré dans le surnageant. Le dénombrement spécifique des cellules 6PY1 par hybridation *in situ* pourrait aider à répondre à cette question.

**Tableau 5. 6 :** Dénombrements bactériens dans les sédiments des microcosmes contaminés par 50 ppm de pyrène

| Microcosmes | Caractéristiques           | Comptages microscopiques<br>(bactéries/g sédiment) | Comptages des colonies<br>dégradant le pyrène<br>(bactéries/g sédiment) |
|-------------|----------------------------|----------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------|
| 1,2,3       | Sédiments + plantes        | $5,5 \pm 2,2 \times 10^7$                          | $5,1 \pm 0,9 \times 10^4$                                               |
| 4,5,6       | Sédiments + plantes + 6PY1 | $9,9 \pm 2,9 \times 10^7$                          | $1,8 \pm 0,1 \times 10^6$                                               |
| 7,8         | Sédiments + 6PY1           | $7,6 \pm 2,7 \times 10^7$                          | $1,8 \pm 0,4 \times 10^6$                                               |
| 9,10        | Sédiments seuls            | $4,0 \pm 0,9 \times 10^7$                          | $2,6 \pm 0,7 \times 10^4$                                               |
| 11,12       | Témoins + NaN <sub>3</sub> | $2,8 \pm 0,6 \times 10^7$                          | non déterminé                                                           |

#### 5.8.2. Isolement et identification de souches

Deux souches capables de dégrader le pyrène ont été isolées des microcosmes 1 et 2, respectivement, qui contenaient des sédiments et des plantes. La première souche présente une séquence du gène ARN 16S identique à celle de *Mycobacterium austroafricanum*, ce qui permet de l'identifier comme une souche de cette espèce. La deuxième souche présente 99,2% d'identité de séquence avec *Stenotrophomonas maltophilia* LMG 10857, une espèce à Gram négatif dont certaines souches sont déjà connues pour dégrader des HAP (Boonchan et al., 1998).

Dans les microcosmes ensemencés avec la souche 6PY1, 3 isolats sur 4 présentaient un gène ARN 16S identique à celui de la souche introduite, et le 4<sup>ème</sup> était identique à *M. austroafricanum*. Enfin, sur les 5 souches isolées d'un microcosme contenant des sédiments non amendés, toutes ont été identifiées comme *M. austroafricanum*. Il semble donc que cette dernière espèce soit indigène aux sédiments crayeux et qu'elle contribue à la minéralisation du pyrène dans les microcosmes non ensemencés avec la souche 6PY1. Sur boîtes de Pétri contenant du pyrène, *M. austroafricanum* forme des zones de dégradation plus grandes que *M. gilvum* 6PY1, avec une croissance bactérienne plus abondante, ce qui favorise son isolement.

Dans l'un des microcosmes avec plantes et ensemencés avec 6PY1 (n°5), une ou des souches bactériennes capables de se développer sur milieu minimum se sont multipliées en abondance. Ces souches incapables de dégrader le pyrène ont envahi les boîtes de sélection sur pyrène, en utilisant peut-être l'acétone résiduel comme substrat carboné. La surabondance de colonies sur les boîtes a masqué l'apparition des zones de dégradation, empêchant l'isolement de souches dégradant le pyrène de ce microcosme. Le ralentissement de la cinétique de minéralisation du pyrène, beaucoup plus marquée dans ce microcosme (voir Fig. 5.3), serait éventuellement lié au développement anormal d'espèces dominantes au cours de l'expérience, qui pourrait aussi être à l'origine de la surmortalité bactérienne constatée dans ce microcosme.

## **5.9 Conclusions**

### Biodégradation du pyrène

Nos résultats montrent que la biodégradation du pyrène en microcosmes est exclusivement d'origine bactérienne, qu'il y ait eu ou non amendement préalable avec la souche 6PY1. De ce point de vue, la participation des champignons micromycètes apparaît comme négligeable, bien que, dans d'autres conditions, des espèces fongiques aient été impliquées dans la dégradation du pyrène (Ravelet et al., 2000).

L'identification de produits d'oxydation du pyrène retrouvés dans la phase aqueuse, notamment l'acide 4,5-diphénanthroïque, prouve que la dégradation résulte d'une attaque bactérienne, comme l'ont montré des études antérieures sur des souches isolées (Dean-Ross et Cerniglia, 1996 ; Schneider et al., 1996 ; Krivobok et al., 2003). C'est la première fois que de tels métabolites sont détectés directement dans un écosystème naturel : comme l'acide 4,5-diphénanthroïque est facile à extraire et à doser par CPG, il constitue un bon marqueur métabolique révélateur des bactéries dégradant le pyrène dans un milieu contaminé.

Nos résultats suggèrent en outre, que les autres bactéries des sédiments sont incapables de dégrader ce métabolite. Enfin, les bactéries anaérobies sont sans effet sur le pyrène, puisque l'inhibition du métabolisme respiratoire (par l'azoture) a pour conséquence l'abolition de toute biotransformation du pyrène, tout au moins pendant la période considérée. Il a été estimé que la biodégradation des HAP à 2-3 cycles en anaérobiose était 1-2 ordres de grandeur plus lente que celle observée en aérobiose (Rockne et Strand, 1998).

Nous apportons la preuve que les sédiments lacustres étudiés contiennent des bactéries indigènes capables de minéraliser le pyrène, et ce bien qu'ils ne soient contaminés que par des

traces de HAP (Tableau 1.1). Ces bactéries ne sont pas détectables immédiatement par leur activité, mais seulement au bout de 15 j d'incubation en présence de 50 ppm de pyrène, suggérant que ce temps de latence correspond à la multiplication dans le milieu de bactéries spécialisées. Du fait du caractère inductible de la dégradation, la proportion de pyrène dégradé n'excède pas quelques pour cent au bout de 2 mois dans les microcosmes non amendés en bactéries sélectionnées, comparé à environ 15-20 % dans les microcosmes amendés. A J61, l'activité de minéralisation du pyrène est encore croissante, et représente env. 20% de l'activité maximale observée dans les microcosmes amendés. En extrapolant l'expérience, on peut penser que la cinétique de biodégradation pourrait devenir comparable à celle observée dans les microcosmes amendés. Dans ce dernier cas, la cinétique de minéralisation du pyrène s'infléchit après 30-40 j, traduisant l'incidence de facteurs limitant tels que la diminution de l'accessibilité des bactéries à leur substrat, la compétition entre espèces, la prédation. La comparaison entre le nombre de bactéries (souche 6PY1) ensemencées initialement et le dénombrement de bactéries dégradant le pyrène à J61, laisse à penser que les deux derniers facteurs jouent un rôle non négligeable.

#### Effets des plantes aquatiques

Les plantes aquatiques ont un effet stimulant sur la biodégradation du pyrène, ce qui se manifeste par une augmentation de la cinétique de minéralisation, accompagnée par un accroissement de la formation de métabolites hydrosolubles (fig. 5.4) et corroborée par une diminution de la concentration de pyrène résiduel (tableau 5.1). Curieusement, les plantes n'ont pas eu d'effet stimulant dans les microcosmes amendés par la souche 6PY1, provoquant au contraire un petit ralentissement de la minéralisation surtout perceptible au début de la cinétique. Ce résultat un peu paradoxal est difficile à expliquer : on pourrait invoquer l'inhibition de la croissance de la souche 6PY1 par un produit sécrété par les plantes, mais nous n'avons pas testé cette hypothèse. En général, les plantes favorisent au contraire la croissance bactérienne par les produits carbonés qu'elles sécrètent au niveau de leurs racines. Dans certains cas, des substances d'origine végétale stimulent de manière plus spécifique telle ou telle fonction bactérienne, par exemple la dégradation de polluants, d'où l'intérêt de la phytoremédiation (Singer et al., 2003). Les études de phytoremédiation de sols ou sédiments contaminés par des polluants organiques, notamment des HAP, sont toutefois rares et l'effet bénéfique des plantes quand il est avéré, n'est pas bien compris.

Dans le cas présent, les roseaux pourraient exercer leur effet stimulant de plusieurs façons :

(i) ils pourraient véhiculer par leurs racines l'oxygène de l'air jusque dans le sédiment et contribuer ainsi à favoriser le catabolisme oxydatif du pyrène, très dépendant de O<sub>2</sub>. Nos observations indiquent de manière spectaculaire que les racines induisent une compartimentation du sédiment crayeux en zones claires plus riches en O<sub>2</sub> à proximité des racines, et zones sombres anoxiques où se produit la précipitation de sulfures métalliques.

(ii) ils pourraient favoriser la multiplication des bactéries aérobies et en particulier des espèces qui s'attaquent au pyrène. Les comptages de bactéries à J61 indiquent une légère augmentation du nombre total de bactéries et des espèces pyrène-spécifiques dans les microcosmes contenant des plantes. Nous n'avons pas pu distinguer plus finement les populations bactériennes des zones claires et des zones sombres du fait de l'homogénéisation des sédiments avant échantillonnage.

Le pyrène a été retrouvé dans les tissus des roseaux à des concentrations variant dans une fourchette de 50 à 1000 µg/g de tissu sec, pour des contaminations des sédiments par le pyrène de 50 à 200 ppm. Le pyrène a été principalement localisé dans les racines, mais aussi dans les parties aériennes de la plante, notamment à la base des tiges et des feuilles. Cette répartition suggère que le pyrène emprunte le système vasculaire de la plante, et se concentre là où le flux vasculaire est maximal. En accord avec cette hypothèse, nous avons remarqué que les plantes en croissance rapide (issues de semis), accumulent plus de pyrène dans leurs tissus que les plantes à croissance plus lente provenant de boutures.

Les facteurs de concentration observés sont relativement faibles comparés à la concentration nominale dans les sédiments. Cependant, si on prend en compte la limite de solubilité du pyrène dans l'eau, soit 0,16 µg/ml, et en supposant que le pyrène est transporté de manière passive dans la sève, alors l'accumulation dans la plante est significative.

Quand le pyrène est métabolisé par les bactéries, les plantes incorporent 8 à 20 fois moins de pyrène, mais accumulent beaucoup plus de produits d'oxydation, mis en évidence par marquage radioactif. Il semblait plausible que ces produits d'oxydation soient les métabolites générés par les bactéries, plus hydrosolubles que le pyrène, et donc susceptibles de pénétrer plus facilement dans les plantes par la sève. Cependant, la nature des produits marqués trouvés dans les tissus végétaux diffère de celle des métabolites sécrétés dans l'eau par les bactéries. Il pourrait s'agir d'adduits ou de complexe entre métabolites et composantes des plantes.

### Devenir du pyrène

L'utilisation de traceur radioactif a permis de connaître la répartition du pyrène et de ses produits d'oxydation dans les microcosmes. Comme on pouvait s'y attendre, le pyrène introduit est resté pour l'essentiel adsorbé aux sédiments. Les calculs basés sur les comptages de radioactivité dans les phases gazeuses, aqueuses, et les extraits de sédiments indiquent qu'au plus 63% du carbone initialement introduit a été retrouvé en fin d'expérience. Cette valeur maximale a été obtenue pour les microcosmes où la biodégradation était inhibée par l'azoture. Même si on prend en compte des pertes possibles par adsorption du pyrène sur les parois des microcosmes et des sous-estimations lors des comptages de radioactivité, il est peu probable que la disparition de près de 40% du pyrène leur soit totalement imputable. L'hypothèse la plus plausible est qu'une partie du pyrène reste fortement associée aux sédiments et n'est pas extractible aux solvants organiques. Cette fraction non extractible aurait pu être analysée à l'aide d'un appareil de minéralisation équipé d'un détecteur de radioactivité, mais nous ne disposons pas d'un tel appareil. De nombreuses études ont montré, et il est largement reconnu, que les HAP en général et le pyrène en particulier sont en partie séquestrés dans les sols et les sédiments sous une forme non extractible (Eschenbach et al., 1998 ; Richnow et al., 1998 ; Guthrie et al., 1999). La proportion de cette fraction non extractible augmente avec le temps : par exemple, Guthrie et al. (1999) n'ont retrouvé que 53 à 77% du pyrène après incubation de cet HAP avec des sédiments pendant 60 j. Les chiffres que nous obtenons sont dans cette fourchette. Les mêmes auteurs ont montré qu'une partie du pyrène était séquestré sous forme de complexes avec les acides humiques. D'autres auteurs ont proposé que les HAP s'insinuent dans des micro-porosités des particules de sédiments ou de sols d'où ils ne sont pas extractibles.

Le pyrène subit des bio-transformations qui résultent quasi exclusivement de l'activité des bactéries des sédiments. Les bactéries peuvent dégrader jusqu'à 20% du pyrène, l'hydrocarbure étant pour moitié minéralisé en CO<sub>2</sub>, pour une autre moitié transformé en métabolites. Ce bilan est comparable à celui que nous avons obtenu au laboratoire en culture pure avec la souche 6PY1, à ceci près que, dans ce dernier cas, nous avons estimé qu'environ 1/4 du carbone du substrat est converti en biomasse.

### Effets du pyrène sur la biodiversité microbienne

L'impact du pyrène sur la communauté bactérienne n'a été que partiellement abordé lors de cette étude, car, pour des raisons techniques évoquées plus haut, nous n'avons pas pu mettre en œuvre de méthodes d'analyse globale de la diversité génétique. En général, les HAP

induisent des changements qui résultent d'une adaptation de la microflore où les espèces capables de les utiliser comme sources de carbone deviennent prépondérantes. Cette adaptation a souvent pour conséquence une diminution de la diversité de la communauté bactérienne (Röling et al., 2002 ; Cheung et Kinkle, 2001). Une étude récente a montré que les variations de la diversité bactérienne, tant aux plans qualitatif que quantitatif, étaient moins liées à la présence de polluants qu'à l'effet rhizosphère des plantes (Siciliano et al., 2003).

Les isolats obtenus indépendamment de microcosmes incubés dans différentes conditions sont apparemment très proches et sont presque tous apparentés à l'espèce *Mycobacterium austroafricanum*. Cette espèce indigène semble la plus apte à s'adapter à la croissance en utilisant le pyrène comme source de carbone. La majorité des espèces capables de dégrader le pyrène qui ont été isolées à ce jour, bien qu'elles proviennent d'origines géographique et géophysique très diverses, appartiennent au genre *Mycobacterium* ou à d'autres bactéries à gram positif taxonomiquement proches (Kastner et al., 1994 ; Cheung et Kinkle, 2001 ; Jouanneau et al., 1999).

## 6. DEVENIR ET TOXICITE DU PYRENE EN MICROCOSMES OUVERTS

### 6.1. Description des essais réalisés

Afin d'étudier le devenir et les effets du pyrène dans des conditions plus réalistes que celles offertes par les tests monospécifiques (cf 4.1), des bioessais ont été mis en œuvre sur microcosmes de laboratoire de 2 litres (Clément et Cadier, 1998). Ces microcosmes simulent schématiquement des écosystèmes aquatiques à partir d'un sédiment, d'une colonne d'eau et d'organismes issus d'élevages et de cultures et se développant dans le sédiment (chironomes et crustacés amphipodes) ou dans la colonne d'eau (daphnies, microalgues et lentilles d'eau). Dans la mesure où l'on visait également à mesurer d'une part les effets du pyrène sur le compartiment bactérien du sédiment et d'autre part la bioaccumulation du pyrène par les organismes supérieurs, un essai préliminaire (appelé *essai mono* par la suite) en conditions simplifiées (petits béciers de 400 mL, pas d'organismes supérieurs sauf daphnies ajoutées à plusieurs reprises) sur 21 jours a été réalisé. L'objectif est ici de définir les paramètres expérimentaux et méthodologiques adéquats pour le suivi de la réponse des communautés bactériennes au contact du pyrène et de la bioaccumulation dans les organismes supérieurs. Cette étape a par ailleurs permis de choisir la concentration en pyrène utilisée dans la phase finale du travail de recherche et dans le choix d'un marqueur d'activité bactérienne (activité leucine-aminopeptidase ou activité  $\beta$ -D-glucosidase, Verrhiest *et al.*, 2002) correspondant à nos critères d'étude. La dernière étape est la réalisation de bioessais plurispécifiques de 28 jours (appelés *essais pluri1* et *pluri2* par la suite) associés à l'utilisation de deux phases sédimentaires dopées à une concentration unique en pyrène. Parallèlement au suivi des paramètres biotiques et abiotiques retenus dans l'étude, nous avons également mis à profit le second essai pour étudier l'influence de l'introduction d'une souche dégradant spécifiquement le pyrène sur le devenir du pyrène et la réponse des organismes supérieurs.

### 6.2. Conditions opératoires et paramètres mesurés

Les matériels et méthodes sont présentés en annexe. Les organismes utilisés proviennent des mêmes élevages et cultures que ceux utilisés dans les tests monospécifiques (cf 4.1). Les conditions générales des essais en microcosmes ne sont pas très différentes des essais monospécifiques sur sédiments. Le sédiment est dopé selon le même protocole, mis sous eau et à l'obscurité pendant 7 jours, puis les organismes sont introduits (J0). La colonne d'eau est aérée par bullage et non renouvelée au cours du test. Des sacrifices sont réalisés à intervalles

de temps réguliers (J0, J10, J21 et J28) pour permettre de récupérer les organismes pélagiques et benthiques ainsi que des échantillons d'eau et de sédiments pour analyses. La nécessité de sacrifier une partie des systèmes au cours de l'essai et de travailler à un certain niveau de réplication (3 réplicats par date de sacrifice et par traitement) se traduit par la mise en place d'un grand nombre de systèmes (entre 36 et 48). Sont suivis sur 21 jours (essai mono) ou 28 jours (essais pluri1 et pluri2) : la survie et la croissance des organismes supérieurs (daphnies, lentilles d'eau, amphipodes, chironomes, essais pluri1 et pluri2), une ou deux activités exo-enzymatiques ainsi que la densité bactérienne du sédiment (tous essais), certains paramètres physico-chimiques de la colonne d'eau (oxygène dissous, pH, conductivité, température, COT) et du sédiment (pH, perte au feu, teneur en eau, COT de l'eau interstitielle, anions et cations de l'eau interstitielle) (tous essais), les teneurs en pyrène dans le sédiment, l'eau surnageante et l'eau interstitielle (à J0 seulement pour l'essai mono, à J0, J10, J21 et J28 pour les essais pluri1 et pluri2), les doses de pyrène bioaccumulées dans les organismes supérieurs (daphnies pour l'essai mono et tous organismes pour les essais pluri1 et pluri2).

Les essais sont réalisés sur le seul sédiment « craie » pour l'essai mono (dopé à 0-2-20-200 mg/kg frais, concentrations nominales) et simultanément sur les sédiments « craie » et « tourbe » pour les essais pluri1 et pluri2 (dopés à 0 et 50 mg/kg frais, concentration nominale).

### **6.3. Essais en petits béchers sur sédiment dopé (essai mono)**

#### **6.3.1. Effets sur le compartiment bactérien du sédiment**

De façon globale, les niveaux d'activité leucine-aminopeptidase se sont révélés 4 fois plus importants que les niveaux d'activité  $\beta$ -D-Glucosidase mesurés autour des mêmes dates (2 jours d'intervalles maximums). Pour les deux marqueurs enzymatiques mis en œuvre et pour chacune des dates de mesures, le dopage du sédiment « craie » n'entraîne aucune variation significative des niveaux d'activités sur la gamme 1, 10, 50, 100 et 200 mg/kg. De la même façon, le pyrène n'affecte pas la densité bactérienne totale des sédiments pour la même gamme de concentrations.

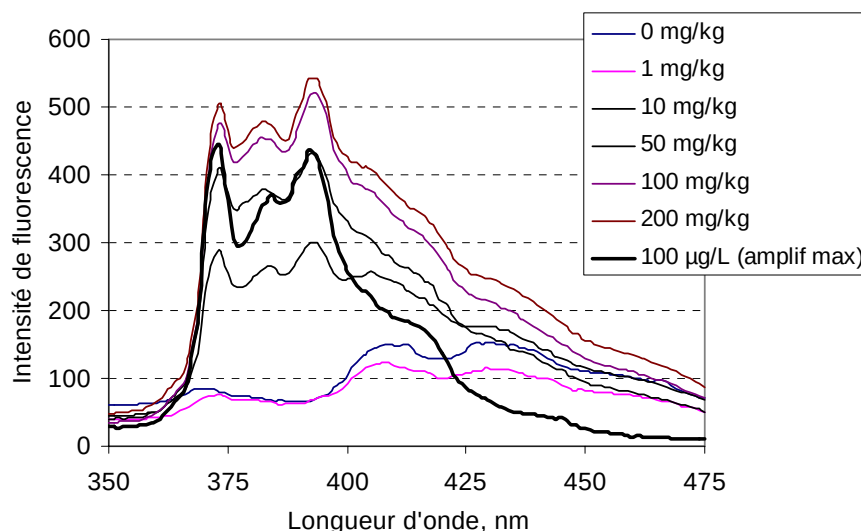
#### **6.3.2. Survie des daphnies et bioaccumulation du pyrène**

De J-4 à J-3 et de J-3 à J0, l'exposition de 24 à 72 h de jeunes daphnies aux sédiments contaminés n'a pas entraîné de mortalité significative (survie toujours  $\geq 80\%$ ). Il en est de



même pour les daphnies exposées 24 h de J2 à J3. En revanche, à J0, si sur 24 h on ne note pas d'effet significatif sur la survie, l'exposition des daphnies pendant 48 h au-dessus des sédiments ou dans les eaux surnageantes récupérées à J0 et filtrées à 0.8 µm entraîne des mortalités marquées et croissantes avec la concentration. Ainsi, sur 48 h on obtient une mortalité de 50% à 100 µg/g pour le sédiment. Les daphnies exposées aux eaux surnageantes seules sont également affectées puisque les mortalités varient entre 20 et 60%. Si l'on confronte ces résultats de mortalité aux teneurs mesurées dans ces mêmes eaux on montre que 50% de mortalité est obtenu autour de 70 µg/L. Il est intéressant de noter que cette valeur est identique à la CE50-48 h à 1500 lux de 74 µg/L trouvée en tests monospécifiques. L'absence d'effets sur 24 h est logique puisque la CE50-24 h du pyrène est de 105 µg/L sous un éclairage de 2500 lux.

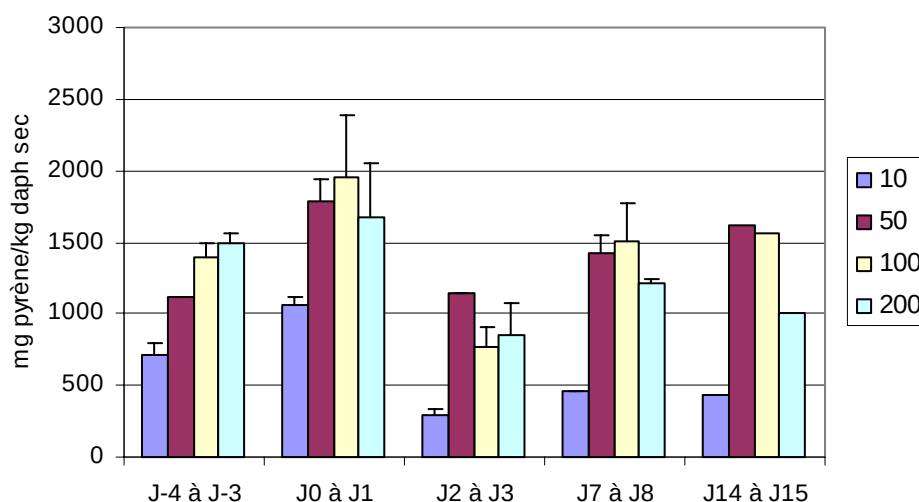
Le pyrène accumulé par *D. magna* est décelable à partir de 10 mg/kg de sédiment, plus rarement à 1 mg/kg, mais la sensibilité de la méthode est liée au nombre de daphnies utilisées. Compte tenu des spectres d'émission de fluorescence obtenus (**figure 6.1**) tout au long de cet essai, très proches du spectre du pyrène pur quelle que soit la durée d'exposition des jeunes daphnies, la méthode basée sur la hauteur du pic à 393 nm permet effectivement d'évaluer les doses de pyrène accumulées par ces organismes. On verra que, dans les essais pluri1 et pluri2, ce n'est pas le cas pour tous les organismes.



**Figure 6.1.** Spectres d'émission de fluorescence des extraits méthanoliques de daphnies exposées de J-4 à J-3 au cours du 1<sup>er</sup> essai en petits béchers versus spectre du pyrène à 100 ppb dans du MeOH

La **figure 6.2** synthétise les résultats de bioaccumulation par les daphnies exposées dans les systèmes, donc exposées au pyrène du sédiment, au pyrène dissous dans la phase d'eau surnageante, et au pyrène particulaire de cette même phase. Dans l'ensemble on observe les

plus fortes doses bioaccumulées aux plus fortes teneurs du sédiment, mais les résultats sont rarement significativement différents entre 50, 100 et 200 mg/kg, alors que les doses bioaccumulées sont significativement inférieures pour 10 mg/kg.



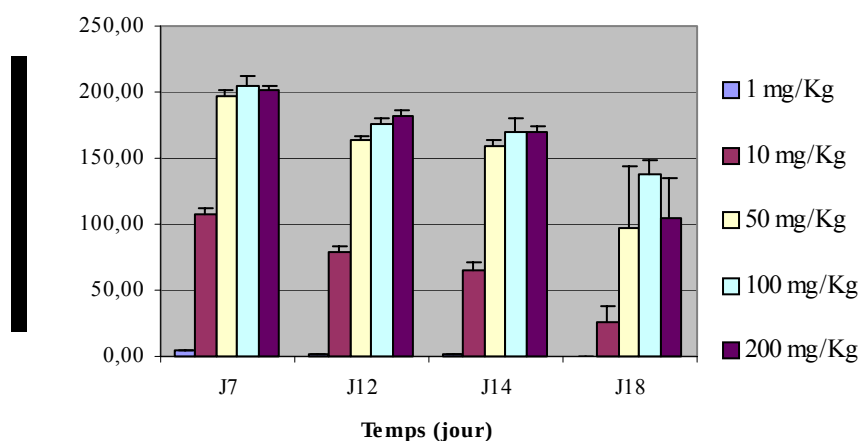
**Figure 6.2.** Evolution des doses bioaccumulées chez *Daphnia magna* exposées 24 h aux sédiments contaminés à 10, 50, 100 et 200 mg/kg frais.

Sur 2 semaines la capacité de bioaccumulation évolue assez peu, on note des valeurs inférieures pour J2, qui pourraient être dues à la taille particulièrement petite des daphnies utilisées ce jour-là. Il n'est pas impossible que cette capacité diminue pour 10 mg/kg, alors qu'elle se maintient globalement aux concentrations les plus fortes, ce qui pourrait traduire pour ces concentrations un équilibre atteint pour le pyrène dans le système, tout au moins entre l'eau surnageante et le sédiment.

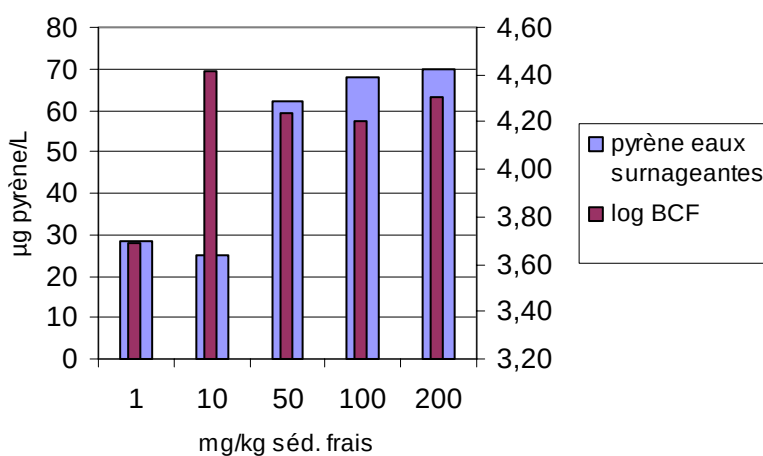
Lorsque les daphnies sont exposées aux seules eaux surnageantes après récupération de celles-ci, la bioaccumulation est moindre chez ces daphnies par rapport à celles exposées aux sédiments, mais il convient de remarquer que ces eaux surnageantes ont été filtrées dans ce type de comparaison. Un essai comparatif entre eaux filtrées et eaux non filtrées indique une moindre accumulation dans les eaux filtrées, ce qui permet de penser que les daphnies ingèrent de façon passive, du fait de leur comportement d'organismes filtreurs, les particules sur lesquelles le pyrène est adsorbé, et que les différences constatées entre une exposition au sédiment donc aux eaux surnageantes brutes et une exposition aux seules eaux surnageantes filtrées pourraient n'être dues en fait qu'aux particules présentes dans les eaux surnageantes brutes. S'agissant de tests de courtes durées sur des jeunes daphnies, il semble logique de penser que les daphnies n'augmentent pas leur exposition en allant fouiller à la surface du

sédiment, surface sur laquelle elles ont peu de chance de trouver quelque chose du fait de l'absence de nourriture apportée (par exemple microalgues qui pourraient se déposer).

L'absence de différences significatives de bioaccumulation entre 50, 100 et 200 mg/kg pourrait bien être liée au fait que les teneurs en pyrène de l'eau surnageante présentent rapidement un palier à partir de 50 mg/kg, comme le montrent les mesures réalisées sur les eaux surnageantes au cours de l'essai (**figure 6.3**). L'écart systématique entre les valeurs de bioaccumulation obtenues à 10 µg/g et celles obtenues à 50, 100 et 200 µg/g, souvent groupées, semble corroboré par ces résultats d'analyse, et semble confirmer que l'exposition des daphnies se fait en majeure partie *via* l'eau surnageante. Dans ces conditions il est logique de calculer un facteur de bioconcentration à partir des doses mesurées dans les daphnies et des valeurs obtenues sur les eaux surnageantes (**Fig. 6.4**).



**Figure 6.3.** Evolution des teneurs mesurées dans les eaux surnageantes (µg/L) en fonction des teneurs nominales du sédiment



**Figure 6.4.** Teneurs mesurées des eaux surnageantes à J0 et facteurs de bioconcentration (log BCF) calculés à partir de ces teneurs et des doses mesurées dans les daphnies exposées 24 h de (J0 à J1) dans les béciers au-dessus de sédiment contaminé à 10, 50, 100 et 200 mg/kg

Si l'on met de côté les résultats à 1 µg/g, teneur à laquelle le protocole de dosage du pyrène chez de jeunes *D. magna* ne semble pas adapté (voir ci-dessus), on obtient un log BCF moyen de  $4.29 \pm 0.093$  sur la base des poids secs ou encore un log BCF moyen de  $3.29 \pm 0.093$  sur la base des poids frais. Cela correspond à un BCF (poids frais) moyen de  $1986 \pm 445$  L/g très proche des valeurs comprises entre 1000 et 2000 L/kg obtenues par Nikkilä et Kukkonen (2001) dans des eaux de différentes teneurs en COD et dopées à 1.2 µg de pyrène/L. Dans le travail de ces auteurs, la valeur de 2100 L/g est obtenue pour une eau de DOC < 0.2 mg/L et, pour une eau de DOC égal à 9.4 mg/L ils obtiennent environ 1900 L/g. Nos résultats sont également proches des valeurs obtenues par Southworth *et al.* (1978) sur *Daphnia pulex* exposé à 50 µg/L. Ces auteurs obtiennent en effet un BCF (poids frais) de 2702 L/kg.

S'agissant d'HAP, on parle d'effets narcotiques qui se manifestent à partir d'une certaine accumulation dans les tissus. Selon Landrum *et al.* (1991, 1994) et Driscoll *et al.* (1997), on obtient 50% d'effet, pour divers organismes (amphipode *Diporeia* par exemple) exposés à des sédiments spikés en HAP pour des doses internes voisines de 6 µmol/g (poids frais d'organisme). Si l'on examine les doses internes chez les daphnies exposées de J0 à J2 on obtient 50% d'effet autour de 0.7 µmol/g (poids frais), en supposant que les doses mesurées à J1 n'augmentent pas entre J1 et J2 (les résultats de Nikkilä et Kukkonen (2001) montrent que le palier est atteint à partir de 15 heures d'exposition). Dans nos conditions on obtient des effets médians à des doses 10 fois inférieures à celles obtenues sur les amphipodes de Landrum et collaborateurs. Il est vrai que les organismes sont différents et les durées d'exposition également (48 h pour les daphnies contre 31 jours pour *Diporeia*).

#### **6.4. Essais en microcosmes de 2 L sur sédiments dopés (essais pluri1 et pluri2)**

##### 6.4.1. Partition du pyrène dans les compartiments abiotiques

Les teneurs mesurées dans les sédiments apparaissent faibles par rapport à la teneur nominale de 50 µg/g poids frais (**tableau 6.1**). Un essai supplémentaire en béciers de 2 L mais sans introduction d'organismes a été mené par la suite. Ces valeurs conduisent à estimer le rendement de dopage de 48 ou 67% selon l'essai pour la craie, alors que ce rendement était d'au moins 76% sur le test monospécifique sur *Hyalella azteca*. Pour la tourbe, le rendement est encore plus faible : 3 à 17% contre 58 à 97% sur le test monospécifique. Un essai complémentaire de dopage a été réalisé de façon à approcher au mieux les rendements sur du sédiment fraîchement dopé (**tableau 6.2**). Cet essai permet, pour les deux sédiments, de

montrer une certaine hétérogénéité de la contamination, qui peut expliquer que les estimations de rendement puissent montrer une certaine dispersion. Cependant, les résultats obtenus mettent en évidence que les rendements pour la tourbe sont effectivement plus faibles que pour la craie mais ne permettent pas d'expliquer les très faibles valeurs obtenues pour la tourbe lors des essais pluri1 et pluri2.

**Tableau 6.1.** Résultats des analyses de pyrène pour les sédiments craie et tourbe (en mg/kg de sédiment frais) au cours des essais pluri1 et pluri2, et lors d'un essai supplémentaire sans organismes (essai contrôle).

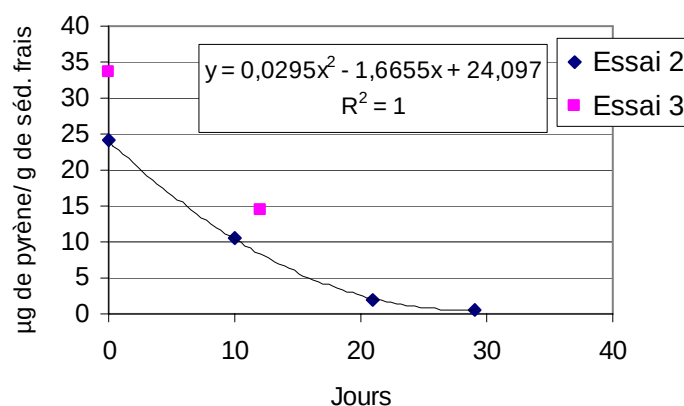
|     | Craie        |              |                | Tourbe       |              |                |
|-----|--------------|--------------|----------------|--------------|--------------|----------------|
|     | Essai pluri1 | Essai pluri2 | Essai contrôle | Essai pluri1 | Essai pluri2 | Essai contrôle |
| J-7 |              |              | 29.96          |              |              | 8.442          |
| J0  | 24.08        | 33.6         | 17.199         | 1.37         | 3.9          | 7.25           |
| J10 | 10.41        | 14.4         |                | 0.05         | 1.87         |                |
| J14 |              |              | 21.91          |              |              | 1.916          |
| J21 | 2.07         |              |                | 1.12         |              |                |
| J28 | 0.62         |              | 13.188         | 1.96         |              | 1.332          |

La décroissance importante des teneurs en pyrène dans le sédiment « craie » entre J0 et J28 pour l'essai pluri1 et entre J0 et J12 pour l'essai pluri2 est difficile à expliquer. Noter que cette décroissance est continue et peut se modéliser par un polynôme du second degré (**figure 6.5**). Il est peu vraisemblable que la teneur totale en pyrène du sédiment puisse avoir autant diminué par le fait de processus comme la photolyse, la biodégradation ou plus simplement la diffusion vers la colonne d'eau. En effet, l'éclairement n'est pas suffisant pour entraîner, au niveau du sédiment, une action sur le pyrène.

**Tableau 6.2.** Résultats des analyses de pyrène réalisées sur 3 échantillons prélevés dans du sédiment fraîchement dopé en pyrène

|         | Craie       |               | Tourbe      |               |
|---------|-------------|---------------|-------------|---------------|
|         | mg/kg frais | rendement (%) | mg/kg frais | rendement (%) |
| 1       | 38.32       | 76.64         | 16.42       | 32.84         |
| 2       | 22.87       | 45.74         | 22.87       | 45.74         |
| 3       | 33.55       | 67.10         | 31.61       | 63.22         |
| moyenne | 31.58       | 63.16         | 23.63       | 47.27         |
| SD      | 7.91        | 0.16          | 7.62        | 0.15          |
| CV      | 25.05%      | 25.05%        | 32.26%      | 32.26%        |

La biodégradation, même si elle est probablement effective comme le montrent les résultats obtenus dans ce travail (cf chapitre 5), ne peut présenter de tels rendements. Enfin, la diffusion ne peut être que négligeable en raison de la propension du pyrène à se fixer sur les particules du sédiment.



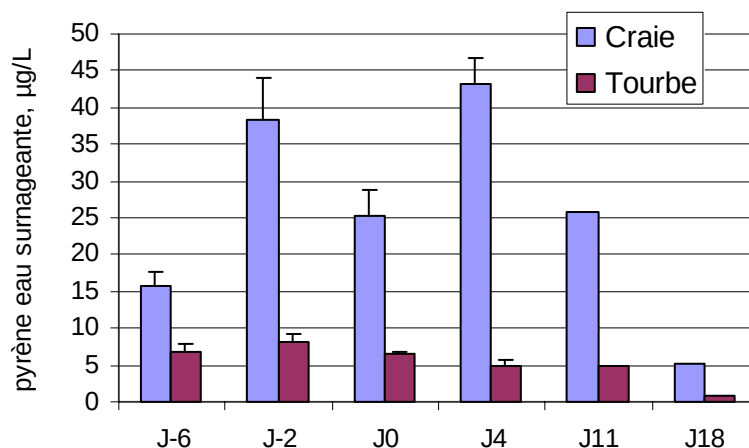
**Figure 6.5.** Evolution de la teneur en pyrène du sédiment « craie » au cours de l'essai pluri1 (essai en microcosmes plurispécifiques)

On peut en revanche avancer l'hypothèse que, du fait d'un phénomène de vieillissement du sédiment (Leppänen & Kukkonen, 2000 ; Alexander, 2000 ; Conrad *et al.*, 2002), le pyrène migrerait de plus en plus loin à l'intérieur des particules minérales et/ou organiques de sédiment, ce qui pourrait se traduire par une extraction de moins en moins facile. La diminution de l'extractabilité chimique du pyrène du fait du vieillissement du sédiment a été démontrée pour différents solvants d'extraction (Conrad *et al.*, 2002), mais la décroissance, si elle est significative dès 10 jours, n'est pas du même ordre de grandeur que dans notre étude puisqu'il faut plusieurs mois pour diminuer par deux le rendement d'extraction.

A partir des dosages de pyrène dans les eaux interstitielles (essai contrôle seulement, les dosages n'ayant pu se faire dans des délais acceptables pour les essais pluri1 et pluri2) et des teneurs mesurées dans les sédiments, il est possible de calculer des Koc apparents (**tableau 6.3**). Les valeurs obtenues présentent une certaine homogénéité mais sont inférieures à celles obtenues lors de l'essai monospécifique sur *Hyaella azteca*, qui se situaient autour de 5 à la teneur nominale de 20 µg/g poids sec (cf 4.1.3.2 et figure 6). Ces différences s'expliquent par des teneurs dans les eaux interstitielles plus faibles lors de l'essai monospécifique, teneurs qui ont pu être sous-estimées du fait de problèmes de délais d'analyses et de conservation.

Les résultats de dosage du pyrène dans les eaux surnageantes (**figure 6.6**) montrent une augmentation au début (diffusion du pyrène du sédiment vers l'eau surnageantes) puis une décroissance à partir de J4, décroissance dans laquelle la photodégradation et l'adsorption du

pyrène sur le verre des parois jouent probablement un rôle compte tenu des observations faites précédemment (cf 4.1.2).



**Figure 6.6.** Teneurs en pyrène des eaux surnageantes au cours de l'essai contrôle en microcosmes 2 L (pas d'organismes)

**Tableau 6.3.** Log Koc apparents estimés au cours de l'essai en microcosmes (essai contrôle) sans introduction d'organismes (EI : eau interstitielle)

|        |                | J -7        | J0          | J14         | J28         |
|--------|----------------|-------------|-------------|-------------|-------------|
| Craie  | µg/g poids sec | 42.8        | 24.57       | 31.3        | 18.84       |
|        | EI, µg/L       | 96.8        | 62.4        | 68.7        | 46.73       |
|        | log Koc        | <b>4.53</b> | <b>4.72</b> | <b>4.68</b> | <b>4.85</b> |
| Tourbe | µg/g poids sec | 42.21       | 36.25       | 9.58        | 6.66        |
|        | EI, µg/L       | 14.0        | 6.8         | 10.0        | 5.92        |
|        | log Koc        | <b>4.16</b> | <b>4.47</b> | <b>4.30</b> | <b>4.53</b> |

#### 6.4.2. Effets sur les organismes supérieurs

La contamination des sédiments par le pyrène à la teneur choisie dans le cadre des ces essais (50 µg/g comme teneur nominale) a permis de mettre en évidence un certain nombre de modifications dans le comportement général des systèmes contaminés. Les essais monospécifiques réalisés en 2001 ont montré l'apparition d'effets toxiques du pyrène (survie et croissance) sur les amphipodes et les chironomes à partir d'une teneur dans les sédiments de 20 µg/g. Pour les essais en microcosmes plurispécifiques nous avons adopté une teneur des sédiments égale à 50 µg/g de pyrène dans les systèmes plurispécifiques, qui devait logiquement permettre d'observer des effets de la contamination sur les organismes. Ce choix prend également en compte l'adsorption potentielle du pyrène en solution sur les parois en verre des contenants utilisés (surface plus importante que dans les essais monospécifiques), facteur pouvant réduire sa biodisponibilité. Cette teneur devait également nous permettre

d'observer des teneurs en pyrène décelables dans les compartiments abiotiques des microcosmes (sédiment, eaux surnageantes, eaux interstitielles).

Globalement les résultats obtenus dans le cadre de cette étude montrent, à la concentration de pyrène nominale introduite dans les sédiments, une gamme d'effets variés de la contamination sur les critères biologiques létaux et sublétaux retenus pour les organismes introduits dans les systèmes (**tableau 6.4**). La survie des daphnies est moins bonne au-dessus du sédiment « craie » contaminé, mais leur reproduction n'est significativement affectée que dans l'essai pluri2. La contamination semble également perturber la reproduction des amphipodes comme le montre l'absence de couple en amplexus en fin d'essai dans les systèmes contaminés. Des observations réalisées en cours d'essai ont permis de mettre en évidence d'autres différences comportementales entre les organismes des systèmes témoins et contaminés. La réaction d'évitement du sédiment observée chez les amphipodes au-dessus du sédiment « craie » contaminé, a également été mise en évidence chez *Lumbriculus variegatus* dans le cadre d'essais de toxicité aiguë portant sur un sédiment naturel contaminé à 100 µg/g de pyrène (Leppanen et Kukkonen, 1996). La différence de réactivité à un stimulus lumineux des daphnies, observée entre les systèmes contaminés et non contaminés, bien que clairement marquée dans cette étude, n'est pas évoquée dans la littérature.

Les essais monospécifiques n'avaient pas montré sur 10 jours d'effet léthal ou subléthal de la contamination sur les chironomes à la plus forte concentration en pyrène introduite dans ce sédiment (200 µg/g). Un des essais plurispécifiques de cette étude a permis de mettre en évidence un effet marqué de la contamination à 50 µg/g sur l'émergence des chironomes dans le sédiment « craie », effet cependant non confirmé lors de l'essai pluri2. D'une manière globale, les tests de toxicité réalisés en présence de sédiments contaminés artificiellement ont montré un faible effet du pyrène sur la survie de différents organismes benthiques tel que *R. abronius* et *L. variegatus* (Kukkonen et Landrum, 1994 ; Swartz *et al.*, 1997), mais les résultats obtenus ici montrent que la survie des chironomes peut être affectée à 21 et 28 jours par la contamination du sédiment « craie » (essai pluri1). Les essais monospécifiques réalisés sur *Hyaella azteca* ont montré que la survie et la croissance des amphipodes diminuent sensiblement dans le sédiment « craie » à partir de 20 µg/g de pyrène et sont fortement affectées à 200 µg/g (cf 4.1). La concentration intermédiaire de 50 µg/g choisie pour les essais en microcosmes affecte logiquement la survie et la croissance des amphipodes dans les microcosmes plurispécifiques mis en place. Ce type de résultats a été mis en évidence pour un autre amphipode *Diporeia spp*, dans différents sédiments naturels dopés à des teneurs en pyrène voisines de celle utilisée dans cette étude (Landrum, 1991). Ces deux séries de tests



s'accordent pour montrer une absence d'effet de la contamination sur la survie et la croissance de ces organismes dans le sédiment « tourbe ». L'absence de données concernant les teneurs réelles en pyrène des eaux interstitielles ne permet pas de réaliser une analyse plus fine de nos résultats. Néanmoins, on peut supposer, qu'à la teneur de 50 µg/g utilisée dans cette étude, le pyrène a adopté un comportement dans les systèmes plurispécifiques similaire à ce qui a été observé dans le test monospécifique sur amphipodes, c'est-à-dire un piégeage plus important du pyrène par la matière organique du sédiment « tourbe », se traduisant par des teneurs plus faibles dans les eaux et, par conséquent, une exposition moindre des organismes. Le développement des lentilles n'a pas été affecté dans les microcosmes à la concentration en pyrène utilisé, ce qui est logique car aucune réponse de ces organismes n'a été mise en évidence dans le cadre des essais monospécifiques utilisant le sédiment « craie » dopé à 200 µg/g de pyrène.

**Tableau 6.4.** Synthèse des perturbations létales et sublétales induites par le pyrène sur les organismes des microcosmes aquatiques

| Organismes             | Effets du pyrène                                                                                          |                            |                                                                                     |
|------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------|
|                        | <i>Craie</i>                                                                                              | <i>Tourbe</i>              | <i>Mycobacterium 6PY1</i>                                                           |
| <i>D. magna</i>        |                                                                                                           |                            |                                                                                     |
| Survie                 | Effet significatif                                                                                        | Effet signif. essai pluri2 | Pas d'effet observé                                                                 |
| Croissance             | Pas d'effet observé                                                                                       | Pas d'effet observé        | Pas d'effet observé                                                                 |
| Reproduction           | Effet signif. essai pluri2                                                                                | Pas d'effet observé        | Effet positif sur la reproduction entre 16 et 28 jours dans <i>craie</i> contaminée |
| Phototactisme          | négatif                                                                                                   | positif                    | positif                                                                             |
| <i>H. azteca</i>       |                                                                                                           |                            |                                                                                     |
| Survie                 | Essai pluri1 : effet à 10 et 21 jours (70 et 53%)<br>Essai pluri2 : effet à 10, 21 et 28 jours (60 à 63%) | Pas d'effet observé        | effet positif ( <i>craie</i> )                                                      |
| Croissance             | Essai pluri1 : effet à 21 jours (62%)<br>Essai pluri2 : effet à 10 et 21 jours (59 à 61%)                 | Pas d'effet observé        | Pas d'effet observé                                                                 |
| Reproduction           | Effet négatif                                                                                             | Pas d'effet observé        | Effet positif détecté ( <i>craie</i> et <i>tourbe</i> )                             |
| Evitement du sédiment  | Effet négatif                                                                                             | Pas d'effet observé        | Pas d'effet observé                                                                 |
| <i>C. riparius</i>     |                                                                                                           |                            |                                                                                     |
| Survie                 | Essai pluri1 : effet à 21 et 28 jours (22 et 28%)                                                         | Pas d'effet observé        | Pas d'effet observé                                                                 |
| Croissance             | Pas d'effet observé                                                                                       | Pas d'effet observé        | Pas d'effet observé                                                                 |
| Emergence              | Essai pluri1 : effet entre 20 et 28 jours                                                                 | Pas d'effet observé        | Pas d'effet observé                                                                 |
| <i>L. minor</i>        |                                                                                                           |                            |                                                                                     |
| Croissance             | Pas d'effet observé                                                                                       | Pas d'effet observé        | Pas d'effet observé                                                                 |
| Compariment bactérien  |                                                                                                           |                            |                                                                                     |
| Activités enzymatiques | Pas d'effet observé                                                                                       | Pas d'effet observé        | Pas d'effet observé                                                                 |
| Densité bactérienne    | Pas d'effet observé                                                                                       | Pas d'effet observé        | Légère stimulation à 28 jours                                                       |

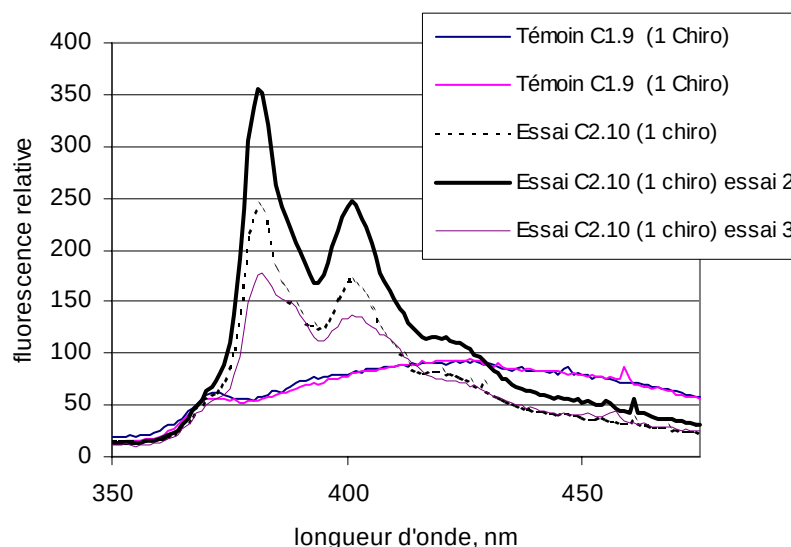
#### 6.4.3. Bioaccumulation du pyrène au cours des essais en microcosmes

##### 6.4.3.1. Essai pluri1

Le suivi de la bioaccumulation par les organismes des microcosmes s'est fait d'une part lors des sacrifices à J10 et J21 et, d'autre part, pour les daphnies seulement, chez de jeunes individus (âge < 24 h) introduits tout au long de l'essai et exposés en général 24 h.

Pour les organismes exposés 10 et 21 jours il n'a pas été possible de doser le pyrène en raison d'un spectre différent de celui du pyrène, présentant deux pics à 381 et 401 nm contre 373 et 393 nm pour le pyrène pur (**figure 6.7**). Il est cependant possible de montrer que la fluorescence est en général plus élevée dans les organismes exposés au sédiment craie.

Pour les jeunes daphnies introduites à différents moments de l'essai et exposées sur une durée courte, les spectres obtenus sur les extraits sont exploitables puisque très proches de celui du pyrène. Là aussi, les daphnies exposées dans les microcosmes à sédiment « craie » présentent les teneurs les plus élevées (**figure 6.8**). Ces teneurs diminuent significativement à partir de J10 pour être proches de 0 à partir de J16 (même figure) ; pour la tourbe, le pyrène n'est plus détectable dès J10 chez les daphnies exposées au sédiment « tourbe ». A noter que, pour la craie, on trouve, comme dans l'essai mono (cf 6.3.2 et figure 8), des valeurs le plus souvent comprises entre 1000 et 2000 µg/g sec.



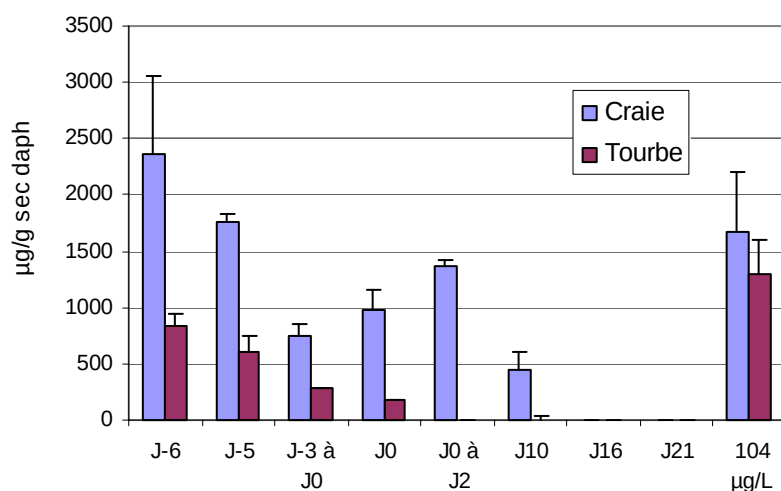
**Figure 6.7.** Spectres d'émission du pyrène extrait des larves de chironomes des microcosmes exposées 10 jours aux sédiments au cours de l'essai en microcosmes n° 1 (C1 : témoins « craie » ; C2 : sédiments « craie » contaminés à 50 mg/kg de poids frais) : examen de la variabilité intra-microcosme

#### 6.4.3.2. Essai pluri2

Les mesures ont concerné uniquement les organismes introduits à J0 dans les microcosmes et leur descendance pour les daphnies.

Les mesures ont porté sur les jeunes daphnies produites à J8 (19/07), J11, J15, J19, et J24. Ces daphnies ont été récupérées dans un délai de 24 à 72 h après leur naissance. Les spectres des

extraits sont tous différents de celui du pyrène mais identiques à ceux des mères (obtenus à J12 et J21). Ces spectres présentent un 1<sup>er</sup> pic à 379-380 nm et un 2<sup>ème</sup> pic entre 395 et 400 nm, alors que celui du pyrène présente des pics à 373 et 383 nm. Par ailleurs, le ratio entre les intensités des pics (fluo(380) / fluo(399)) est en moyenne de 1.168 +/- 0.091 (avec des valeurs peu différentes entre mères et jeunes), contre 1.05 +/- 0.106 pour le pyrène pur, donc un peu plus élevé en moyenne. On a vu dans les essais précédents que les jeunes daphnies ajoutées aux systèmes et exposées au maximum 72 h présentaient des extraits contenant du pyrène non modifié.

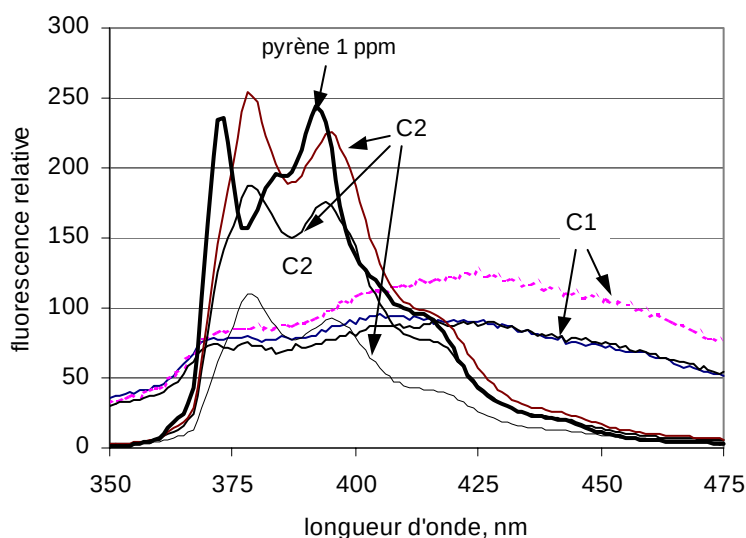


**Figure 6.8.** Evolution au cours du temps de la bioaccumulation du pyrène par des jeunes daphnies (âge < 24 ou 48 h) introduites dans les microcosmes de l'essai pluri1 et exposées 24 h sauf à J-3 (72 h) et de J0 à J2 (48 h) + bioaccumulation par jeunes daphnies du même âge exposées dans eaux surnageantes à 104 µg/L

Les résultats de l'essai pluri2 peuvent suggérer une exposition des embryons dans la poche incubatrice, la durée de formation des jeunes daphnies avant leur libération par la mère étant d'environ 104 heures (Sobral *et al.*, 2001). Dans notre cas les jeunes daphnies sur lesquelles portent les mesures pourraient avoir été exposées 104 + 24 à 104 + 72 h, soit 128 à 176 h, soit 5 à 7 jours environ. Mais cette exposition serait essentiellement une exposition au pyrène modifié (biotransformé ?) transmis par la mère *in utero*, comme le suggèrent les spectres d'émission de fluorescence, à moins que la durée d'exposition ne soit suffisante, même chez les jeunes daphnies, pour opérer une action de (bio ?)transformation du pyrène.

La présence de pyrène chez les daphnies mères à J12 est détectable à des concentrations apparemment élevées (**figure 6.9**), mais il ne s'agit pas de pyrène pur, comme dans l'essai pluri1. Le spectre d'émission détecté présente des pics à 379-380 et 395-397 nm, contre 373 et 393 nm pour le pyrène pur. En faisant l'approximation que les spectres détectés dans les extraits de daphnies sont dus essentiellement au pyrène, on trouve des teneurs moyennes de

27 +/- 9  $\mu\text{g/g}$  sec dans les daphnies des microcosmes « tourbe » contre 1051 +/- 137  $\mu\text{g/g}$  sec dans celles des microcosmes « craie ».



**Figure 6.9.** Spectres d'émission de fluorescence des extraits méthanoliques de daphnies mères exposées 12 jours au cours de l'essai en microcosmes n°2 (sédiments craie contaminés à 50 mg/kg) versus spectre du pyrène à 1 ppm dans du MeOH

Si l'on compare ces résultats avec ceux obtenus lors de l'essai pluri1 on peut dire que les daphnies mères des microcosmes « craie » ont beaucoup plus accumulé en 12 jours lors de l'essai pluri2 que lors de l'essai pluri1 en 10 jours (où les spectres étaient à peine marqués), et que la bioaccumulation lors de l'essai pluri2 par des daphnies exposées 12 jours est d'environ 2 fois celle observée sur de jeunes daphnies exposées 24 h lors de l'essai pluri1, sans toutefois dépasser les doses maximales de 1500 à 2000  $\mu\text{g/g}$  sec constatées lors d'une exposition de jeunes daphnies à des solutions de pyrène proches de la saturation.

Comme pour les daphnies, les amphipodes à J12 présentent des spectres peu marqués dans les microcosmes « tourbe » et au contraire très nets dans les microcosmes « craie » mais avec un spectre encore plus décalé que pour les daphnies (maxima à 380-381 et 399-400 nm) et avec un ratio entre les 2 pics plus élevé. Si, comme pour les daphnies, on fait un calcul approximatif, on trouve une dose moyenne de 1841 +/- 775  $\mu\text{g/g}$  sec pour les amphipodes des microcosmes « craie », du même ordre de grandeur que pour les daphnies.

Les larves de chironomes exposées 12 jours présentent des spectres également différents de celui du pyrène (pics à 381 et 401 nm), mais ils sont nets pour la tourbe et pour la craie. Les doses calculées de façon approximative sont de 13.5 +/- 4.8 pour les microcosmes « tourbe » et 393 +/- 230  $\mu\text{g/g}$  sec pour les microcosmes « craie ».

A J21 les spectres des organismes sont également différents de celui du pyrène pur : pics à 380 et 396-399 nm pour les daphnies mères, à 381 et 400 nm pour les amphipodes, et à 381 et 401-402 nm pour les chironomes émergés.

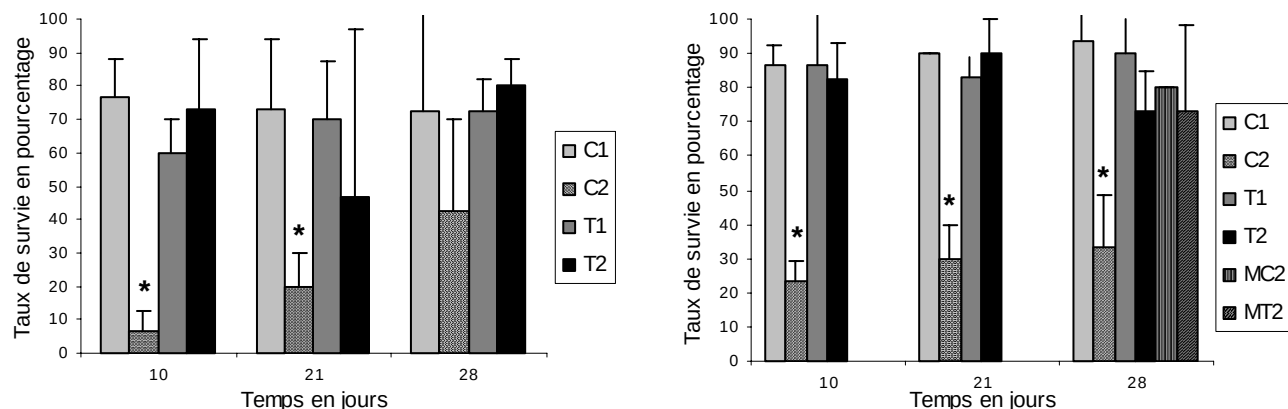
#### 6.4.4. Effets sur le compartiment bactérien (sédiment)

Les résultats obtenus lors de l'essai monospécifique sur sédiment «craie» ont montré des niveaux d'activité leucine-aminopeptidase très supérieurs à ceux qui ont été observés pour l'activité  $\beta$ -D-Glucosidase, ce qui nous a conduit à conserver ce paramètre de suivi dans le cadre des essais plurispécifiques, ceci afin de disposer d'une échelle de valeurs susceptibles de mettre en évidence les effets des traitements appliqués sur ce paramètre. Le suivi des systèmes plurispécifiques n'a pas mis en évidence d'effets de la contamination sur les activités exoenzymatiques du compartiment bactérien des sédiments. La densité bactérienne des sédiments n'est par non plus significativement affectée par la présence de pyrène. Globalement les niveaux d'activité enzymatiques leucine-aminopeptidase et  $\beta$ -D-Glucosidase ainsi que les densités bactériennes mesurées lors des trois bioessais sont faibles : certaines études ont montré des niveaux d'activités correspondants supérieurs à 80  $\mu\text{mol/h/gramme}$  de sédiment sec, dans des sédiments naturels fraîchement prélevés et dopés à 300 mg/kg d'un mélange de fluoranthène, de phénanthrène et de benzo(k)fluoranthène ou non dopés (Verrhiest *et al.*, 2001). Des densités bactériennes mesurées en parallèle montrent des valeurs supérieures à celles obtenues dans cette étude ( $> 10^9$  bactéries/g de sédiment frais). Le traitement appliqué aux sédiments après prélèvement ainsi que leur stockage pendant une durée relativement longue (5 à 8 mois) à basse température et à l'obscurité ont probablement affecté la réponse des communautés bactériennes autochtones. De plus les conditions expérimentales mise en place dans les systèmes diffèrent considérablement des conditions environnementales des sédiments *in situ*.

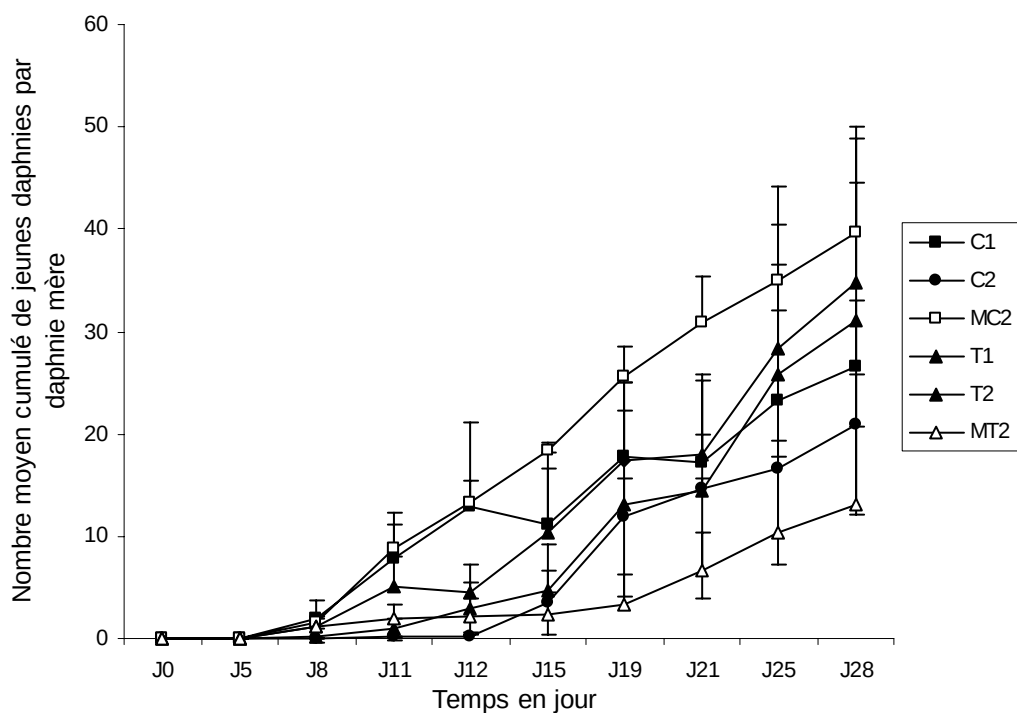
#### 6.4.5. Influence d'une inoculation du sédiment par *Mycobacterium* 6PY1

Le suivi de *Mycobacterium* 6PY1 montre que cette souche bactérienne est capable de se développer dans les systèmes mis en place avec une préférence marquée pour le sédiment «tourbe», comme le montrent les étalements sur couche de pyrène ainsi que la densité bactérienne observée à 28 jours dans le traitement MT2. Au cours du deuxième essai en microcosmes plurispécifique réalisé, l'inoculation de *Mycobacterium* 6PY1 dans le sédiment «craie» contaminé entraîne une diminution des effets de la contamination sur la survie des amphipodes (**figure 6.10** et tableau 6.4) ainsi que sur le niveau de reproduction des daphnies (**figure 6.11** et tableau 6.4). Ce type d'effet n'est pas constaté au niveau du sédiment «tourbe»

contaminé malgré une présence plus forte de *Mycobacterium* dans ce sédiment au bout de 28 jours.



**Figure 6.10.** Taux de survie des amphipodes à 10, 21 et 28 jours au cours des essais pluri1 et pluri2 (moyenne sur 3 réplicats  $\pm$  écart type ; \* effet significatif,  $p < 0,05$  ; C1 : sédiment craie témoin ; C2 : sédiment craie dopé à 50  $\mu\text{g/g}$  ; MC2 : sédiment craie dopé à 50  $\mu\text{g/g}$  avec inoculation de *Mycobacterium* ; T1 : sédiment tourbe témoin ; T2 : sédiment tourbe dopée à 50  $\mu\text{g/g}$  ; MT2 : sédiment tourbe dopé à 50  $\mu\text{g/g}$  avec inoculation de *Mycobacterium*)



**Figure 6.11.** Reproduction des daphnies au cours du 2<sup>ème</sup> essai en microcosmes plurispécifiques (essai pluri2) (C1 : sédiment craie témoin ; C2 : sédiment craie dopé à 50  $\mu\text{g/g}$  ; MC2 : sédiment craie dopé à 50  $\mu\text{g/g}$  avec inoculation de *Mycobacterium* ; T1 : sédiment tourbe témoin ; T2 : sédiment tourbe dopée à 50  $\mu\text{g/g}$  ; MT2 : sédiment tourbe dopé à 50  $\mu\text{g/g}$  avec inoculation de *Mycobacterium*)

## 6.5. Discussion générale et conclusions

### Partition du pyrène

La partition du pyrène a pu être étudiée dans le test sur *Hyalella azteca* 14 jours de la 1<sup>ère</sup> phase (cf 4.1.3.2), mais aussi lors d'un essai en microcosmes sans addition d'organismes (essai contrôle), des problèmes analytiques s'étant posés pour les eaux interstitielles des essais pluri1 et pluri2. Les résultats permettent de calculer des Koc apparents qui sont proches pour les deux sédiments des valeurs les plus élevées de la littérature. Le fait de trouver des Koc indépendants du sédiment, craie ou tourbe, est en accord avec la théorie du partage à l'équilibre (Di Toro *et al.*, 1991) qui explique la partition du pyrène entre la phase particulaire du sédiment et l'eau interstitielle par la teneur en carbone organique du sédiment.

Le caractère fortement hydrophobe du pyrène entraîne cependant des biais dans la mise en œuvre des essais et l'interprétation des résultats. Le dopage du sédiment selon un protocole couramment pratiqué dans la littérature et par certains participants à ce programme dans des études antérieures ne semble pas adapté à tous les sédiments, le rendement de dopage mais aussi l'uniformité de la contamination à l'intérieur d'un même lot de sédiment pouvant varier en fonction des caractéristiques du sédiment. Cela nécessite des contrôles analytiques pour vérifier la teneur nominale et l'homogénéité de la contamination ainsi que des dopages additionnels pour atteindre la concentration souhaitée. Le second problème est lié à la propension du pyrène à s'adsorber sur les parois des flacons au cours des essais, ce qui peut entraîner, dans l'eau surnageante, une minimisation de l'exposition des organismes ; ce phénomène est très probable, même pour des flacons en verre, car nous avons pu le vérifier lors du stockage des eaux avant analyse, avec l'impossibilité de récupérer le pyrène en totalité même par un solvant puissant. Enfin, bien qu'il ne s'agisse pas réellement d'un biais, il semble que les liaisons entre pyrène et particules du sédiment se renforcent au cours du temps au point que le pyrène devienne de moins en moins extractable et par conséquent de moins en moins biodisponible pour les organismes du sédiment (cf 6.4.1). Ceci semble correspondre à un phénomène naturel souligné par plusieurs auteurs, mais la question se pose, lorsqu'on travaille sur de telles molécules, de savoir si l'on doit travailler sur un sédiment fraîchement contaminé ou au contraire dans lequel on a laissé se renforcer les liaisons entre contaminant et particules pour être plus proche des conditions rencontrées dans l'environnement.

### Comparaison des réponses des organismes dans les différents essais

Pour le cladocère *Daphnia magna*, les résultats concernant la survie dans les différents essais, monospécifiques et plurispécifiques, présentent une bonne cohérence (**tableau 6.5**). Le pyrène dissous entraîne les premiers effets sur la survie, sous lumière classique de laboratoire (2000-2500 lux, soit l'éclairement adopté dans les essais en microcosmes) et après 48 h, vers 10 µg/L, avec une CE50-48 h de 28 à 70 µg/L. Dans l'essai monospécifique en présence du sédiment « craie » et sous éclairage de 2000 lux, on note 50% de mortalité chez de jeunes daphnies introduites dans les eaux surnageantes et exposées 48 h au-dessus du sédiment contaminé à 100 mg/kg, ce qui correspond à une teneur mesurée de l'eau surnageante de 70 µg/L. Dans ces conditions, on a pu montrer que les doses mesurées dans les daphnies vont de 1500 à 2000 µg/g sec. Dans l'essai plurispécifique pluri1, on ne note aucune mortalité dans les microcosmes contenant du sédiment « tourbe » contaminé à 50 mg/kg. La teneur dans l'eau surnageante n'a pas pu être mesurée pour les raisons indiquées ci-dessus, mais des mesures de doses accumulées par de jeunes daphnies montrent que ces doses sont inférieures à 250 µg/g sec à partir de J0 pour devenir négligeables par la suite. Lors de l'essai pluri2 on note cette fois une survie moins bonne dans les microcosmes « tourbe » en présence de pyrène ; l'absence de mesures des teneurs en pyrène de l'eau et des daphnies (il y a accumulation mais le pyrène a été biotransformé) ne permet pas d'expliquer cette plus grande sensibilité, qui est peut-être à rapprocher de teneurs mesurées du sédiment de l'essai pluri2 supérieures à celles de l'essai pluri1.

**Tableau 6.5.** Relations entre effets du pyrène sur la survie de *Daphnia magna*, teneurs en pyrène dans l'eau et/ou dans les daphnies, pour les différents essais menés (ND : mesure non déterminée)

|                              | Effets observés                                         | Doses daphnies correspondantes      |
|------------------------------|---------------------------------------------------------|-------------------------------------|
| Essai monospécifique "eau"   | 1er effets à 10 µg/L<br>50% d'effet entre 28 et 70 µg/L | ND                                  |
| Essai monospécifique "craie" | 50% d'effet à 70 µg/L                                   | 1500-2000 µg/g sur 15 jours         |
| Essai pluri1 "craie"         | effets dès J3, teneurs inconnues                        | 500-1400 µg/g sur 10 jours          |
| Essai pluri2 "craie"         | effets dès J5, teneurs inconnues                        | ND                                  |
| Essai pluri1 "tourbe"        | pas d'effets                                            | < 250 µg/g puis négligeables dès J2 |
| Essai pluri2 "tourbe"        | effets dès J8, teneurs inconnues                        | ND                                  |



Pour les microcosmes « craie », les effets sur la survie de *D. magna* observés dès J3 pour l'essai pluri1 et à partir de J5 pour l'essai pluri2 sont à rapprocher des doses de pyrène mesurées dans de jeunes daphnies introduites au cours de l'essai pluri1. Ces doses sont comprises entre 500 et 1400 µg/g entre J0 et J10, valeurs susceptibles d'entraîner des effets au vu des résultats de l'essai monospécifique rappelés ci-dessus, et deviennent négligeables au-delà de 10 jours, ce qui pourrait expliquer que la survie s'améliore considérablement après réintroduction de daphnies à J13 (essai pluri1). Les effets observés sur la survie ne se traduisent pas nécessairement par des effets sur la reproduction (en raisonnant sur la base du nombre de jeunes par mère) ; c'est le cas des microcosmes « craie » de l'essai pluri1 et des microcosmes « tourbe » de l'essai pluri2.

L'algue microscopique *Pseudokirchneriella subcapitata*, pour laquelle la CE50-72 h est inférieure à 10 µg/L, s'est montrée très sensible au pyrène. L'impossibilité de suivre la densité algale dans les essais plurispécifiques du fait de teneurs en chlorophylle insuffisantes et d'un dépôt des algues sur le sédiment et les parois, n'a pas permis de vérifier cette sensibilité au cours de ces essais.

La lentille d'eau *Lemna minor*, pourtant organisme chlorophyllien comme *Pseudokirchneriella subcapitata*, n'est pas sensible au pyrène, nos résultats étant corroborés par la littérature. Cette absence de sensibilité a pu être vérifiée au cours des différents essais menés.

Pour les organismes exposés aux sédiments dopés en pyrène, amphipodes et chironomes, il est possible de comparer les résultats de survie et de croissance des essais monospécifiques et plurispécifiques (**tableau 6.6**). Sur la gamme 2-20-50-200 mg/kg le pyrène n'a pas eu d'effet sur la survie et la croissance (10 ou 12 jours) de *C. riparius* sur l'ensemble des essais mis en œuvre. Les seuls effets observés concernent la survie et l'émergence à partir de 20 jours dans l'essai pluri1. Les teneurs en pyrène des eaux interstitielles estimées à partir d'un autre essai (essais pluri) pourraient expliquer ces effets, car elles sont élevées. Le pyrène dans le sédiment « tourbe » n'a d'effet sur la survie et la croissance de l'amphipode *Hyaella azteca* qu'à partir de 200 mg/kg poids frais (soit 1000 µg/g en poids sec). Il est vrai que les teneurs en sédiment mesurées dans les essais plurispécifiques étaient particulièrement faibles au regard de la dose nominale de 50 mg/kg poids frais, ce qui ne permet pas de préciser ce qui se passe entre 63 et 1000 µg/g poids sec. Dans le sédiment « craie » les effets sur la survie et la croissance de *H. azteca* s'exercent dès 20 µg/g poids frais (nominal), soit dès 21 mg/kg sec (mesuré), et les résultats de l'essai monospécifique et des essais plurispécifiques sont à peu près concordants sur ce point.

**Tableau 6.6.** Résultats de survie et de croissance des amphipodes et chironomes au cours des différents essais en sédiments, avec teneurs nominales et mesurées des sédiments, et teneurs mesurées ou estimées (par la théorie du partage à l'équilibre) des eaux interstitielles <sup>(1)</sup> J0 et J14, <sup>(2)</sup> J0-J10-J21-J29, <sup>(3)</sup> teneurs estimées à partir de l'essai contrôle, <sup>(4)</sup> J0-J12, caractères gras : résultats significativement différents des témoins)

| Teneur sédiment (mg/kg frais)                 | 0             | 2                      | 20                       | 50                              | 200                     |
|-----------------------------------------------|---------------|------------------------|--------------------------|---------------------------------|-------------------------|
| <i>Craie</i>                                  |               |                        |                          |                                 |                         |
| Teneur séd mesurée (mg/kg sec) essai mono     |               | 7.8-1.4 <sup>(1)</sup> | 20.9-24.4 <sup>(1)</sup> |                                 | 173-283 <sup>(1)</sup>  |
| Teneur séd mesurée (mg/kg sec) essai pluri1   |               |                        |                          | 34-15-3-1 <sup>(2)</sup>        |                         |
| Teneur séd mesurée (mg/kg sec) essai pluri2   |               |                        |                          | 2.4-11.6 <sup>(4)</sup>         |                         |
| teneur eau interst. mesurée essai mono        |               | 0.5-2                  | 3.4-16.6                 |                                 | 2.7-19.0                |
| teneur eau interst. estimée essai pluri1 et 2 |               |                        |                          | 62.4-68.7-46.7 <sup>(3)</sup>   |                         |
| <i>C. riparius</i>                            |               |                        |                          |                                 |                         |
| survie (%) essai mono 10 j                    | 98 +/- 5      | 95 +/- 7               | 96 +/- 7                 |                                 | 100 +/- 0               |
| survie (%) essai pluri1 10 j                  | 76 +/- 14     |                        |                          | 25 +/- 37                       |                         |
| survie (%) essai pluri2 12 j                  | 74.7 +/- 4.6  |                        |                          | 80 +/- 6.9                      |                         |
| poids sec (mg/larve) essai mono 10 j          | 1.15 +/- 0.08 | 1.42 +/- 0.14          | 1.41 +/- 0.07            |                                 | 1.45 +/- 0.19           |
| poids sec (mg/larve) essai pluri1 10 j        |               |                        |                          |                                 |                         |
| poids sec (mg/larve) essai pluri2 12 j        | 0.54 +/- 0.1  |                        |                          | <b>0.84 +/- 0.4</b>             |                         |
| <i>H. azteca</i>                              |               |                        |                          |                                 |                         |
| survie (%) essai mono 14 j                    | 87 +/- 6      | 87 +/- 15              | <b>57 +/- 6</b>          |                                 | <b>37 +/- 6</b>         |
| survie (%) essai pluri1 10 j                  | 76.7 +/- 12   |                        |                          | <b>6.7 +/- 5.8</b>              |                         |
| survie (%) essai pluri2 12 j                  | 87 +/- 6      |                        |                          | <b>23 +/- 6</b>                 |                         |
| poids sec (µg/ind.) essai mono 10 j           | 103 +/- 1.26  | 95.6 +/- 18.9          | <b>57.5 +/- 22.4</b>     |                                 | <b>65 +/- 7.1</b>       |
| poids sec (µg/ind.) essai pluri1 10 j         | 65 +/- 8.3    |                        |                          | <b>632 +/- 91</b>               |                         |
| poids sec (µg/ind.) essai pluri1 21 j         | 368 +/- 33.5  |                        |                          | <b>139 +/- 104</b>              |                         |
| poids sec (µg/ind.) essai pluri2 12 j         | 109 +/- 29    |                        |                          | 42 +/- 22                       |                         |
| <i>Tourbe</i>                                 |               |                        |                          |                                 |                         |
| Teneur séd mesurée (mg/kg sec) essai pluri1   |               | 8.5-6.3 <sup>(1)</sup> | 66.7-62.5 <sup>(1)</sup> | 9.1-0.3-7.5-13.1 <sup>(2)</sup> | 1125-938 <sup>(1)</sup> |
| Teneur séd mesurée (mg/kg sec) essai pluri2   |               |                        |                          | 19.5-9.4 <sup>(4)</sup>         |                         |
| teneur eau interst. mesurée essai mono        |               | 0.3-0.5                | 1.6-3.9                  |                                 | 3.3-7.3                 |
| teneur eau interst. estimée essai pluri1 et 2 |               |                        |                          | 6.8-10-5.92 <sup>(3)</sup>      |                         |
| <i>C. riparius</i>                            |               |                        |                          |                                 |                         |
| survie (%) essai mono 10 j                    | 90 +/- 11.5   | 82.5 +/- 23.6          | 97.5 +/- 5               |                                 | 93.3 +/- 11.5           |
| survie (%) essai pluri1 10 j                  | 64 +/- 4      |                        |                          | 63 +/- 12                       |                         |
| survie (%) essai pluri2 12 j                  | 88 +/- 11     |                        |                          | 83 +/- 10                       |                         |
| poids sec (mg/larve) essai mono 10 j          | 1.09 +/- 0.13 | 1.05 +/- 0.15          | 1.22 +/- 0.23            |                                 | 1.30 +/- 0.01           |
| poids sec (mg/larve) essai pluri1 10 j        |               |                        |                          |                                 |                         |
| poids sec (mg/larve) essai pluri2 12 j        | 0.26 +/- 0.02 |                        |                          | 0.30 +/- 0.06                   |                         |
| <i>H. azteca</i>                              |               |                        |                          |                                 |                         |
| survie (%) essai mono 14 j                    | 83 +/- 5.6    | 83 +/- 11.6            | 76.7 +/- 5.6             |                                 | <b>50 +/- 26.5</b>      |
| survie (%) essai pluri1 10 j                  | 60 +/- 10     |                        |                          | 73 +/- 21                       |                         |
| survie (%) essai pluri2 12 j                  | 87 +/- 15     |                        |                          | 83 +/- 10                       |                         |
| poids sec (µg/ind.) essai mono 10 j           | 199 +/- 12    | 188 +/- 85             | 166 +/- 77               |                                 | <b>99 +/- 61</b>        |
| poids sec (µg/ind.) essai pluri1 10 j         | 80 +/- 6      |                        |                          | 74 +/- 10                       |                         |
| poids sec (µg/ind.) essai pluri2 12 j         | 115 +/- 9     |                        |                          | 137 +/- 48                      |                         |

\* Relation entre bioaccumulation du pyrène et survie des organismes

Pour *Daphnia magna*, il a été possible, à l'occasion de l'essai monospécifique en petits béchers sur sédiment craie dopé (« essai mono »), de montrer qu'à une dose de 0.7  $\mu\text{mol/g}$  de poids frais (soit 140  $\mu\text{g/g}$  frais équivalant à environ 1400  $\mu\text{g/g}$  sec) correspond un effet de 50% sur la survie sur 48 h de jeunes daphnies. Dans les microcosmes de l'essai pluril on a mesuré sur de jeunes daphnies ajoutées des doses de pyrène pur (non significativement transformé) allant de 2400  $\mu\text{g/g}$  sec au début de l'essai à 500  $\mu\text{g/g}$  sec 16 jours après. Même aux plus fortes doses accumulées (1700 et 2400  $\mu\text{g/g}$  sec) aucun effet sur la survie n'a été constaté, probablement dû à une exposition de seulement 24 h.

Pour tous les organismes des microcosmes exposés plus de 5 jours, il n'a pas été possible de doser le pyrène accumulé en raison de phénomènes de (bio)transformation qui se traduisent par un spectre différent (décalage des deux pics vers les longueurs d'onde croissantes et augmentation du ratio entre pics). S'il s'agit bien de biotransformation, tous les organismes du microcosme, daphnies, chironomes et amphipodes, sont capables d'une telle activité sur le pyrène. *C. riparius* est effectivement connu pour développer une importante activité de biotransformation du pyrène (Guerrero *et al.*, 2002), et les résultats de Gourlay *et al.* (2002) montrent que *Daphnia magna*, si elle a peu d'effet sur le fluoranthène, serait capable de biotransformer le benzo(a)pyrène. Cette équipe a également travaillé sur le pyrène et montré, comme dans notre étude, un spectre différent du pyrène bioaccumulé. Elle a également mis en évidence, comme dans le cas du benzo(a)pyrène, une forte fluorescence de la phase récupérée dans l'eau et une moindre fluorescence de la phase dichlorométhane, ce qui tend à prouver que le produit dérivé du pyrène est plus polaire, donc bien le résultat d'une transformation biologique.

Compte tenu de ce phénomène de (bio)transformation il n'est pas possible de quantifier les doses des composés (pyrène + métabolites) qui fluorescent, mais, en raisonnant sur la fluorescence maximale (pic vers 400 nm) ramenée au poids des organismes et en comparant avec les témoins, il est possible d'apprécier si les doses sont faibles, modérées ou élevées (**tableau 6.7**). D'une façon générale, les doses diminuent dans le temps, et plus vite dans les microcosmes tourbe que dans les microcosmes craie. Les données analytiques manquent, mais il est vraisemblable que, d'une part le pyrène en phase dissoute a tendance à diminuer dans le temps et, d'autre part, des phénomènes de séquestration le rendent de moins en moins biodisponible donc bioaccumulable. Les caractéristiques du sédiment tourbe (COT élevé) exacerbent ces phénomènes fortement liés à la matière organique. C'est d'ailleurs la raison

pour laquelle la bioaccumulation est systématiquement plus élevée dans les microcosmes craie.

**Tableau 6.7.** Synthèse des résultats de bioaccumulation et de survie des organismes exposés au pyrène dans les deux essais plurispécifiques

| <i>Essai pluri1</i>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                | <i>Essai pluri2</i>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       |
|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| de J-6 à J0 pour la tourbe et de J-6 à J10 pour la craie :<br>bioaccumulation élevée du pyrène par les jeunes daphnies ajoutées et exposées 1 à 3 jours, sans biotransformation<br>bioaccumulation plus élevée dans la craie<br>effet sur la survie des daphnies dans la craie dès J3                                                                                                                                                                                                              | de J8 à J21 pour la craie et la tourbe :<br>bioaccumulation significative mais modérée du pyrène par jeunes daphnies nées dans les systèmes et exposées 24 à 72 h après naissance<br>pyrène biotransformé; effet significatif sur la survie pour les deux types de sédiment                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               |
| A J10 chez organismes exposés 10 jours :<br>* <u>daphnies mères</u> : doses faibles détectées dans la craie<br>pyrène biotransformé, survie < 20% à J10<br>rien de significatif dans tourbe, survie de 60 à 90%<br><br>* <u>amphipodes</u> : doses élevées dans la craie, pyrène biotransformé<br>survie 10% dans la craie<br>* <u>chironomes</u> : pyrène biotransformé détecté dans la craie et la tourbe<br>mais doses assez faibles, quoique plus fortes dans la craie<br><br>survie 68% à 76% | A J12 chez organismes exposés 12 jours :<br>* <u>daphnies mères</u> : doses élevées dans craie, non significatives dans tourbe<br>pyrène biotransformé<br>survie de 80% dans craie (>95% dans craie témoin) de 70% dans tourbe (85% dans tourbe témoin)<br>* <u>amphipodes</u> : doses élevées dans la craie, pyr. biotransformé<br>survie 20 à 30% dans la craie, 72 à 92% dans tourbe<br>* <u>chironomes</u> : pyrène biotransformé détecté dans la craie et la tourbe<br>doses moyennes à fortes dans la craie, faibles dans tourbe<br>survie 4% dans microcosme craie où la bioacc est plus élevée, 52 à 96% ailleurs |
| A J21 chez organismes exposés 21 jours :<br>* <u>daphnies mères</u> : pyrène non détecté<br><br>survie 50 à 100%<br><br>* <u>amphipodes</u> : pyrène non détecté<br>survie 20% dans craie et 0 à 100% dans tourbe<br>* <u>chironomes</u> : pyrène biotransformé détecté dans la craie<br><br>mais doses assez faibles<br>survie 36-40%                                                                                                                                                             | A J21 chez organismes exposés 21 jours :<br>* <u>daphnies mères</u> : pyrène biotransf. détecté dans la craie<br>survie de 50% dans microcosme craie où bioacc. élevée 100% ailleurs<br>* <u>amphipodes</u> : pyrène biotransf. détecté dans la craie<br>survie 20 à 40% dans la craie, 80 à 100% dans la tourbe<br>* <u>chironomes</u> : pyrène biotransformé détecté dans la craie et la tourbe<br>mais doses assez faibles, plus fortes dans tourbe<br>survie 48 à 76%                                                                                                                                                 |

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- AFNOR (1983). Essai des eaux : Détermination de l'inhibition de la mobilité de *Daphnia magna*, norme NFT 90-301
- AFNOR (1996). Essai des eaux – Détermination de l'inhibition de croissance de *Lemna minor*, NF XP T 90-337.
- Alexander M. (2000). Aging, bioavailability, and overestimation of risk from environmental pollutants, *Environ. Sci. Technol.*, 34 : 4259-4264.
- ASTM, 1991. Standard guide for conducting sediment toxicity tests with freshwater invertebrates. M.K.Nelson, C.G. Ingersoll and F.J.Dwyer, p1-20, in: *Annual Book of ASTM standards*. Vol.11.04. (1991)
- Armstrong, W. 1978. Root aeration in the wetland condition. In *Plant life in anaerobic environments*. D.D. Hook and R.M.M. Crawford, Eds, pp 269-297. Ann Arbor, MI Ann Arbor Science Publishers.
- Barbas JT, Sigman ME, Dabestani R (1996) Photochemical of phenanthrene sorbed on silica gel. *Environ Sci Technol* 30 :1776-1780.
- Beji, A., Izard, D., Gavini, H., Leclerc, H., Leseigne-Delstanche, M., Krembel, J. (1987) A rapid chemical procedure for isolation and purification of chromosomal DNA from Gram-negative bacilli. *Anal. Biochem.* 162, 18-23.
- Boonchan, S., Britz, M.L., Stanley, G. (1998) Surfactant-enhanced biodegradation of high molecular weight polycyclic aromatic hydrocarbons by *Stenotrophomonas maltophilia*. *Biotechnol. Bioeng.* 59, 482-494.
- Borgmann U. (1994). Chronic toxicity of ammonia to the amphipod *Hyaella azteca* : importance of ammonium ion and water hardness, *Environ. Pollut.*, 86 :329-335.
- Brunk B.K., Jirka G.H., Lion L.W., 1997, Effects of salinity changes and the formation of dissolved organic matter coatings on the sorption of phenanthrene : implications for pollutant trapping in estuaries, *Environ. Sci. Technol.*, 31, 1, 119-125.
- Buffle J., Deladoey P., 1982, Analysis and characterization of natural organic matter in freshwaters (II), *Schweiz. Z. Hydrol.*, 44, 2, 363-391.
- Cabaniss S.E., Zhou Q., Maurice P.A., Chin Y-P., Aiken G.R., 2000, A log-normal distribution model for the molecular weight of aquatic fulvic acids, *Environ. Sci. Technol.*, 34, 6, 1103-1109.
- Chefetz B., Deshmukh A.P., Hatcher P.G., Guthrie E.A., 2000, Pyrene sorption by natural organic matter, *Environ. Sci. Technol.*, 34, 14, 2925-2930.
- Cheung P.Y., Kinkle B.K. (2001) Mycobacterium diversity and pyrene mineralization in petroleum-contaminated soils. *Appl. Environ. Microbiol.* 67 :2222-2229.
- Cheung, P.Y. and Kinkle, B.K. (2001) *Mycobacterium* diversity and pyrene mineralization in petroleum-contaminated soils. *Appl. Environ. Microbiol.* 67, 2222-2229.
- Chin Y-P, Aiken G.R., Daniels K.M., 1997, Binding of pyrene to aquatic and commercial humic substances : the role of molecular weight and aromaticity, *Environ. Sci. Technol.*, 31, 6, 1630-1635.
- CHIOU C.T., McGroddy S.E., KILE D.E., 1998, Partition characteristics of polycyclic aromatic hydrocarbons on soils and sediments, *Environ. Sci. Technol.*, 32, 2, 264-269.
- Clemens W.D., Haegel F.-H., Schwuger M.J., 1994, Concurrence of solubilization and adsorption in multicomponent suspensions of layer silicates, *Langmuir*, 10, 1366-1369.
- Clément B. et Cadier C. Development of a new laboratory freshwater/sediment microcosm test, *Ecotoxicology*, 7: 279-290, (1998).
- Clément B., Muller C., Verriest G. (2000). Influence of exposure conditions on the bioavailability of fluoranthene to *Daphnia magna* (Cladocera), *Polycyclic Aromatic Compounds*, 20 : 259-274.
- Conrad A.U., Comber S.D., Simkiss K. (2002). Pyrene bioavailability; effect of sediment-chemical contact time on routes of uptake in an oligochaete worm, *Chemosphere*, 49 : 447-454.
- David B., Boule P (1993) Phototransformation of hydrophobic pollutants in aqueous suspension. *Chemosphere* 26:1617-1630.
- Dean-Ross D., Cerniglia CE (1996) Degradation of pyrene by *Mycobacterium flavescens*. *Appl Microbiol Biotechnol* 46:307-312.
- Delbès C, Moletta R, Godon J-J (2000) Monitoring of activity dynamics of an anaerobic digester bacterial community using 16S rRNA polymerase chain reaction-single-strand conformation polymorphism analysis. *Environ Microbiol* 2, 506-515.
- Devos O., Saber A-I., Paturol L., Jarosz J., 2000, Direct analysis of PAH in water by synchronous fluorescence, *Luminescence*, 15, 2, 69-71.
- Di Toro, D.M., Zarba, C.S., Hansen, D.J., Berry, W.J., Swartz, R.C., Cowan, C.E., Pavlou, S.P., Allen, H.E., Thomas, N.A., Paquin P.R. (1991). Technical basis for establishing sediment quality criteria for nonionic organic chemicals using equilibrium partitioning. *Environ. Toxicol. Chem.* 10 : 1541-1583.

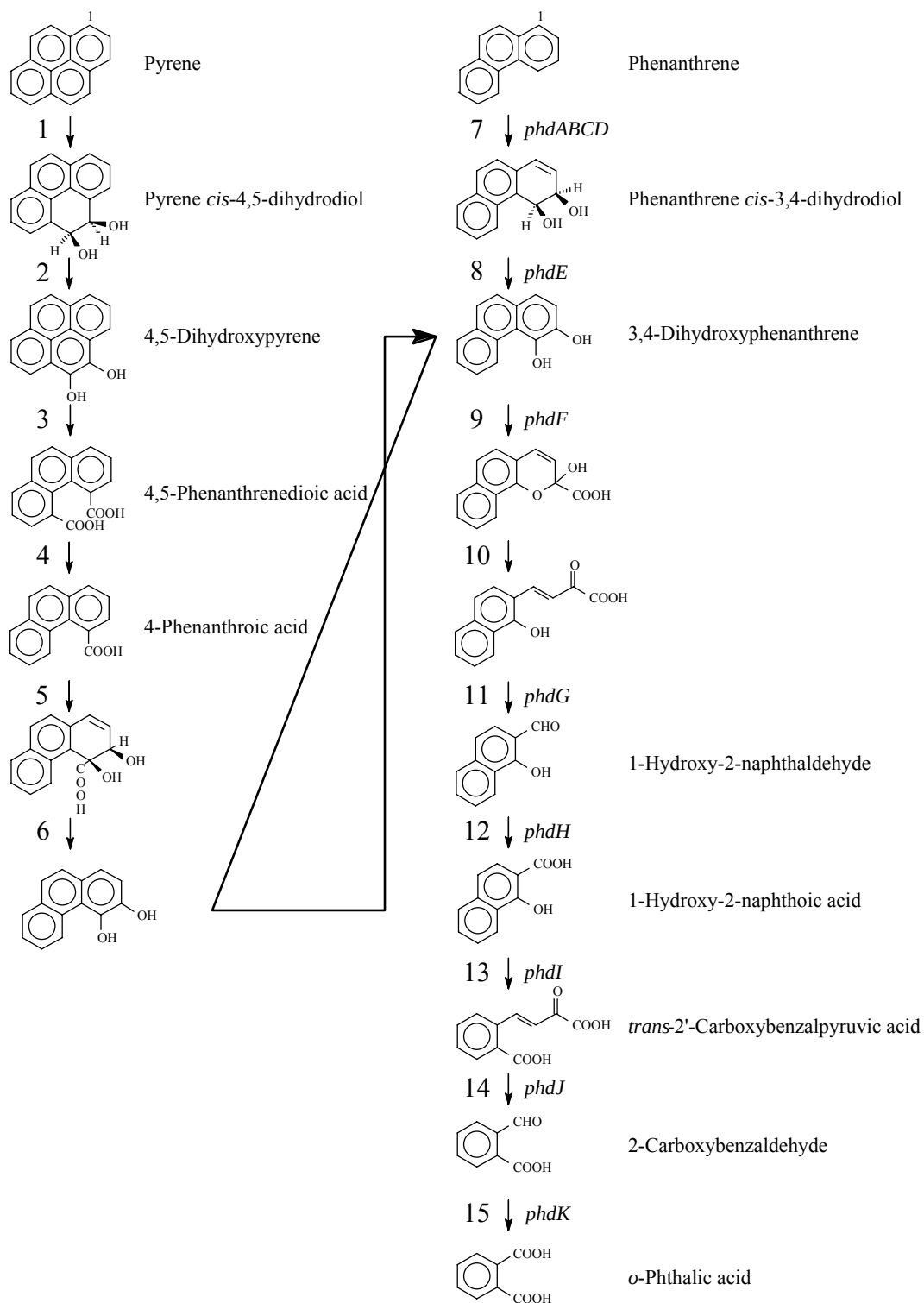
- Ditsworth, G.R., Schults, D.W. (1990). Preparation of benthic substrates for sediment toxicity testing. *Environ. Toxicol. Chem.* 9 : 1523-1529
- Elendt B.P., and Bias W.R. (1990). Trace nutrient deficiency in *Daphnia magna* cultured in standard medium for toxicity testing. Effects of the optimization of culture conditions on life history parameters of *D. magna*. *Water Res.* 24:1157-1167.
- Emerson K., Russo R.C., Lund R.E., Thurston R.V. (1975). Aqueous ammonia equilibrium calculations : effect of pH and temperature, *J. Fish. Res. Board Can.*, 32 :2379-2383.
- Eschenbach A, Wienberg R, Mahro B (1998) Fate and stability of nonextractable residues of [<sup>14</sup>C]PAH in contaminated soil under environmental stress conditions. *Environ Sci Technol* 32, 2585-2590.
- Etudes des Agences de l'Eau N° 76, Bioessais sur sédiments, méthodologies et application à la mesure de la toxicité de sédiments naturels, (2000).
- Giesy J.P. and Hoke R.A. Freshwater sediment toxicity bioassessment: rationale for species selection and test design. *Great Lakes Res.*, 15, p539-569, (1989).
- Gourlay C., Miège C., Tusseau-Vuillemin M.H., Garric J., Mouchel J.M. (2002). The use of spectrophotometry for monitoring the bioaccumulation and the biotransformation of polycyclic aromatic hydrocarbons in *Daphnia magna*, *Polycyclic Aromatic Compounds*, in press.
- Guerrero N.R. V., M.G. Taylor, N.A. Davies, M.A.M. Lawrence, P.A. Edwards, K. Simkiss, E.A. Wider (2002). Evidence of differences in the biotransformation of organic contaminants in three species of freshwater invertebrates, *Environ. Pollut.*, 117 : 523–530
- Guthrie EA, Bortiatynski JM, Van Heemst JDH, Richman JE, Hardy KS, Kovach EM, Hatcher PG (1999) Determination of [C-13]pyrene sequestration in sediment microcosms using flash pyrolysis GC-MS and C-13 NMR. *Environ. Sci. technol.* 33, 119-125.
- Hatch A.C., Burton Jr. G.A. (1999). Photo-induced toxicity of PAHs to *Hyalella azteca* and *Chironomus tentans* : effects of mixtures and behavior, *Environ. Pollut.* 106 157-167.
- Herbert B.E., Bertsch P.M., Novak J.M., 1993, Pyrene sorption by water-soluble Organic Carbon, *Environ. Sci. Technol.*, 27, 2, 398-403.
- Huang X.D., Dixon D.G. & Greenberg B.M., 1995, Toxicity of polycyclic aromatic hydrocarbons to the duckweed *Lemna gibba* L. G-3 in natural sunlight, *Ecotoxicol. Environ. Safety*, 32, 194-200.
- Irwin, R.J., M. VanMouwerik, L. Stevens, M.D. Seese, and W. Basham. Environmental Contaminants Encyclopedia. National Park Service, Water Resources Division, Fort Collins, Colorado. Distributed within the Federal Government as an Electronic Document, (1997).
- ISO (1989). Qualité de l'eau - Essai d'inhibition de la croissance des algues d'eau douce avec *Scenedesmus subspicatus* et *Selenastrum capricornutum*, Norme ISO 8692.
- ISO (1995). Qualité de l'eau : Détermination de la mobilité de *Daphnia magna* straus (Cladocera, Crustacea). Essai de toxicité aiguë, DIS 6341.2.
- Johnson W.P., Amy G.L., 1995, Facilitated transport and enhanced desorption of polycyclic aromatic hydrocarbons by natural organic matter in aquifer sediments, *Environ. Sci. Technol.*, 29, 3, 807-817.
- Jones K.D., Tiller C.L., 1999, Effect of solution chemistry on the extent of binding of phenanthrene by a soil humic acid : comparison of dissolved and clay bound humic, *Environ. Sci. Technol.*, 33, 4, 580-587.
- Jouanneau Y, Rodarie D, Willison JC. (1999). Dégradation microbiologique des hydrocarbures aromatiques polycycliques: Rapport Ademe, pp. 156
- Kanally RA, Harayama S (2000) Biodegradation of high-molecular-weight polycyclic aromatic hydrocarbons by bacteria. *J Bacteriol* 182 :2059-2067.
- Kastner M, Breuer-Jammali M, Mahro B (1994) Enumeration and characterization of the soil microflora from hydrocarbon-contaminated soil sites able to mineralize polycyclic aromatic hydrocarbons (PAH). *Appl Microbiol Biotechnol* 41 : 267-273.
- Ko S-O., Schlautman M.A., Carraway E.R., 1998, Effects of solution chemistry on the partitioning of phenanthrene to sorbed surfactants, *Environ. Sci. Technol.*, 32, 22, 3542-3548.
- Konkalova, H. 1990. Anatomical adaptations to waterlogging in roots of wetland graminoids: limitations and drawbacks. *Aquatic Botany* 38:127-134.
- Kraepiel A.M.L., Keller K., Morel F.M.M., 1998, On the acid-base chemistry of permanently charged minerals, *Environ. Sci. Technol.*, 32, 19, 2829-2838.
- Krivobok S, Kuony S, Meyer C, Louwagie M, Willison JC, Jouanneau Y (2003) Identification of pyrene-induced proteins in *Mycobacterium* sp. 6PY1 : Evidence for two ring-hydroxylating dioxygenases. *J Bacteriol* 185, 3828-3841.
- Krylov S.N., Huang X.D., Zeiler L.F., Dixon D.G., Greenberg B.M. (1997). Mechanistic quantitative structure-activity relationship model for the photoinduced toxicity of polycyclic aromatic hydrocarbons: I. Physical model based on chemical kinetics in a two-compartment system, *Environ. Toxicol. Chem.*, 16 : 2283-2295.
- Kukkonen J. and Landrum P.F. (1994). Toxicokinetics and toxicity of sediment-associated pyrene to *Lumbriculus variegatus* (Oligochaeta), *Environ. Toxicol. Chem.* 9 : 1457-1468.

- Labbe P., Reverdy G., 1988, Adsorption characteristics of polycyclic aromatic compounds on clay : pyrene as a photophysical probe on laponite, *Langmuir*, 4, 419-425.
- Landrum P.F., Dupuis W.S., Kukkonen J. (1994). Toxicokinetics and toxicity of sediment-associated pyrene and phenanthrene in *Diporeia* spp.: examination of equilibrium-partitioning theory and residue-based effects for assessing hazard, *Environ. Toxicol. Chem.*, 13 : 1769-1780.
- Landrum P.F., Lee II H., Lydy M.J. (1992). Toxicokinetics in aquatic systems: model comparisons and use in hazard assessment, *Environ. Toxicol. Chem.*, 11 : 1709-1725.
- Launen L, Pinto L, Wiebe C, Kieklmann E, Moore M (1995) The oxidation of pyrene and benzo[a]pyrene by nonbasidiomycete soil fungi, *Can J Microbiol* 41:477-488.
- Loi canadienne sur la protection de l'environnement, liste des substances d'intérêt prioritaire, Rapport d'évaluation, Hydrocarbures aromatiques polycycliques, (1997).
- MacDonald DD, Ingersoll CG, Berger TA. (2000). Development and evaluation of consensus-based sediment quality guidelines for freshwater ecosystems. *Archives Environ. Contam. Toxicol.*, 39:20-31.
- Mao Y, Iu KK, Thomas JK (1994) Chemical reaction of pyrene and its chlorinated derivative on Silica-Alumina surfaces induced by ionizing radiation. *Langmuir* 10:709-716.
- Mccarthy J.F., JIMENEZ B.D., 1985, Interactions between polycyclic aromatic hydrocarbons and dissolved humic material : binding and dissociation, *Environ. Sci. Technol.*, 19, 11, 1072-1076.
- Monda D.P., Galat D.L., Finger S.E., Kaiser M.S. (1995). Acute toxicity of ammonia (NH<sub>3</sub>-N) in sewage effluent to *Chironomus riparius*. II. Using an generalized linear model, *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, 28 :385-390.
- Mouné, S., Eatock, C., Matheron, R., Willison, J.C., Hirschler, A., Herbert, R. Caumette, P. (2000) *Orenia salinaria* sp. nov., a fermentative bacterium isolated from anaerobic sediments of Mediterranean salterns. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 50, 721-729.
- Muyzer G, de Waal E, Uitterlinden A (1993) Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. *Appl Environ Microbiol* 59, 695-700.
- OCDE (1993). Algal Growth Inhibition Test, #201, adopted 7 June 1984, OCDE Guideline for testing of chemicals
- Parker C.A., 1968, Photoluminescence of Solutions, Elsevier Publishing Company, 220-234.
- Pennak R.W. (1989). Freshwater invertebrates of the United States. John Wiley and Sons, Inc, New York 628 p..
- Perminova I.V., Grechishcheva N.Y., Petrosyan V.S., 1999, Relationships between structure and binding affinity of humic substances for polycyclic aromatic hydrocarbons : relevance of molecular descriptors, *Environ. Sci. Technol.*, 33, 21, 3781-3787.
- Peuravuori J., 2001, Binding of pyrene on lake aquatic humic matter : the role of structural descriptors, *Anal. Chim. Acta*, 429, 75-89.
- Peuravuori J., Pihlaja K., 1997, Molecular size distribution and spectroscopic properties of aquatic humic substances, *Anal. Chim. Acta*, 337, 133-149.
- Ravelet, C., Krivobok, S., Sage, L., Steiman, R. (2000). Biodegradation of pyrene by sediment fungi. *Chemosphere* 40, 557-563.
- Rav-Acha Ch., Rebhun M., 1992, Binding of organic solutes to dissolved humic substances and its effects on adsorption and transport in the aquatic environment, *Wat. Res.*, 26, 12, 1645-1654.
- Ren L., Huang X.D., Mcconkey B.J., Dixon D.G., Greenberg B.M.(1994). Photoinduced toxicity of three polycyclic aromatic hydrocarbons (Fluoranthene, Pyrene, and Naphthalene) to the Duckweed *Lemna gibba* L. G-3. *Ecotoxicol. Environ. Safety*, 28, 160-171.
- Reyes CA, Medina M, Crespo-Hernandez C, CedenoMZ, Arce R, Rosario O, Steffenson DM, Ivanov IN, Sigman ME, Dabestini R (2000) Photochemistry of pyrene on unactivated and activated silica surfaces. *Environ Sci Technol* 34:415-421.
- Richnow HH, Eschenbach A, Mahro B, Seifert R, Wehrung P, Albrecht P, Michaelis W (1998) The use of <sup>13</sup>C-labelled polycyclic aromatic hydrocarbons for the analysis of their transformation in soil. *Chemosphere* 36, 2211-24.
- Rockne KJ, Strand SE (1998) Biodegradation of bicyclic and polycyclic aromatic hydrocarbons in anaerobic enrichments. *Environ Sci Technol* 32:3962-3967.
- Roling WFM, Milner MG, Jones DM, Lee K, Daniel F, Swannell RJP, Head IM (2002) Robust Hydrocarbon Degradation and Dynamics of Bacterial Communities during Nutrient-Enhanced Oil Spill Bioremediation. *Appl Environ Microbiol* 68 :5537-5548.
- Schmitt D., Kumke M., Seibel F., Frimmel F.H., 1999, The influence of natural organic matter on the desorption kinetics of pyrene and naphthalene from quartz, *Chemosphere*, 38, 12, 2807-2824.
- Schneider J, Grosser R, Jayasimhulu K, Xue W, Warshawsky D (1996) Degradation of pyrene, benz[a]anthracene, and benzo[a]pyrene by *Mycobacterium* sp. strain RJGII-135, isolated from a former coal gasification site. *Appl Environ Microbiol* 62:13-19.

- Schwieger F, Tebbe CC (1998) A New Approach To Utilize PCR-Single-Strand-Conformation Polymorphism for 16S rRNA Gene-Based Microbial Community Analysis. *Appl Environ Microbiol* 64, 4870-4876.
- Shallow K.C., Taghizadeh K., Weakland S., Plummer E.F., Busby W.F., and Lafleur L., (1991) *International Journal Environmental Analytical Chemistry*, 60, 113-122.
- Siciliano SD, Germida JJ, Banks K, Greer CW (2002) Changes in Microbial Community Composition and Function during a Polyaromatic Hydrocarbon Phytoremediation Field Trial. *Appl Environ Microbiol* 69 :483-489.
- Sigman ME, Schuler PF, Ghosh MM, Dabestani RT (1998) Mechanism of pyrene photochemical oxidation in aqueous and surfactant solutions. *Environ Sci Technol* 32:3980-3985.
- Singer AC, Crowley DE, Thompson IP (2003) Secondary plant metabolites in phytoremediation and biotransformation. *Trends in Biotechnology* 21 :123-130.
- Smith JH, Mabey WR, Bahunos N, Holt BR, Chou TW, Lee SS, Wenberger DC, Mill T (1979) Environmental pathways of selected chemicals in fresh water system. US Environmental Protection Agency, EPA-600/7-78-074
- Sobral O., Chastinet C., Nogueira A., Soares A.M.V.M. (2001). *In vitro* development of parthenogenetic eggs : a fast ecotoxicity test with *Daphnia magna* *Ecotoxicol. Environ. Safety* 50 : 174-179.
- Sparks DL (1995) Inorganic soil components. In: Academic Press (ed) *Environmental Soil Chemistry*, London, pp 23-28.
- Specht C.H., Kumke M.U., Frimmel F.H., 2000, Characterization of NOM adsorption to clay minerals by size exclusion chromatography, *Wat. Res.*, 34, 6, 4063-4069.
- Swartz, R.C., Ferraro, S.P., Lamberson, J.O., Cole, F.A., Ozretich, R.J., Boese, B.L., Schults, D.W. (1997). Photoactivation and toxicity of mixtures of polycyclic aromatic hydrocarbon compounds in marine sediment. *Environ. Toxicol. Chem.* 16 : 2151-2157.
- Thurman E.M., 1985, *Organic Geochemistry of Natural Waters*, Nijhoff/Junk Publishers, Dodrecht, The Netherlands.
- Tolley, M.D., Delaune, R.D. et Patrick, W.H., Jr. 1986. The effect of sediment redox potential and soil acidity on nitrogen uptake, anaerobic root respiration, and growth of rice (*Oryza sativa*). *Plant and Soil* 93: 323-331.
- US EPA. (1994). Methods for measuring the toxicity and bioaccumulation of sediment-associated contaminants with freshwater invertebrates. EPA/600/R-94/024. Office of research and development. Washington DC 20460.
- Van Olphen H., 1977, dans « Clay Colloid Chemistry », Wiley and Sons New-York, 66-67.
- Verrhiest G., Clément B., Volat B., Montuelle B., Perrodin Y. (2002). Interaction between a polycyclic aromatic hydrocarbons mixture and the microbial communities in a natural freshwater sediment, *Chemosphere*, 46 : 187-196.
- Vindimian, E., M. Bisson, R. Dujardin, P. Flammarion, J. Garric, M. Babut, M.-H. Lamy, J.-M. Porcher and E. Thybaud (2000). Complément au SEQ-Eau : méthode de détermination des seuils de qualité pour les substances génotoxiques. Rapport final", 2000, 151 p, INERIS, Agence de l'eau Rhin-Meuse - Verneuil-en-Halatte - avril 2000.
- Vo-Dinh T., 1981, Synchronous excitation spectroscopy, *Modern Fluorescence Spectroscopy* 4<sup>th</sup>, Wehry EL Ed., Plenum Press New-York, 167-192.
- Wernersson A.-S., Dave G. (1997). Phototoxicity identification by solid phase extraction and photoinduced toxicity to *Daphnia magna*, *Archives of Environ. Contam. and Toxicol.*, pp 268-273.
- Wetzel ,S.C., Banks, M.K., Schwab ,A.P. (1997). Rhizosphere effect on the degradation of pyrene and anthracene in soil, in *Phytoremediation of Soil and Water Contaminants*, American Chemical Society, Washington DC.
- Zepp RG, Schlotzhauer PF (1979) Photoreactivity of selected aromatic hydrocarbons in water. In: Ann Arbor Science Publishers (ed) *Polynuclear aromatic hydrocarbons*, pp 141-158.
- Zhou J, Bruns MA, Tiedje JM (1996) DNA recovery from soils of diverse composition. *Appl Environ Microbiol* 62, 316-22.
- Zhou J.L., Rowland S., Mantoura F.C., Braven J., 1994, The formation of humic coatings on mineral particles under simulated estuarine conditions – a mechanistic study, *Wat. Res.*, 28, 3, 571-579.



## ANNEXE 1



### Voie catabolique de dégradation du pyrène par les bactéries du genre *Mycobacterium*

Les étapes 1-6 sont spécifiques de la dégradation du pyrène, les étapes 9-15 sont communes à la dégradation du phénanthrène et du pyrène, et conduisent à la formation de *o*-phthalate. Les gènes codant les enzymes connues de la voie de dégradation sont indiqués en italique. Selon Kanaly et Harayama (2000), Krivobok et al. (2003).

## ANNEXE 3

## FACTEURS ABIOTIQUES: MATERIELS ET METHODES

Spéciation du pyrène

La kaolinite ( $[Al_4Si_4O_{10}(OH)_8]$ , kaolin blanc en poudre, Merck) est préalablement lavée par cinq rinçages dans de l'eau UHQ (Elga Maxima), centrifugée 15 mn à  $3000 \text{ tr.min}^{-1}$  et séchée. Cette procédure permet d'éliminer les sels solubles (0,025% de Ca - 0,025% Cl - 0,1%  $SO_4$ ). L'argile lavée est rendue homo-ionique par mise en suspension dans une solution aqueuse  $10^{-2} \text{ M}$  de  $NaNO_3$  dont le pH est ajusté à 6,5 par ajout d' $HNO_3$  durant 1 heure. Cette opération permet l'élimination des cations divalents, qui pourraient d'une part favoriser l'adsorption des AH sur le solide par complexation de surface, d'autre par modifier la conformation des AH et diminuer leur capacité de liaison avec le pyrène. La siccité est déterminée pour chaque essai par centrifugation à  $3000 \text{ tr.min}^{-1}$  durant 15 mn et séchage à l'étuve à  $100^\circ\text{C}$  du culot de centrifugation (12 h) après pesée. La masse en eau représente environ 50% du total. Le culot de centrifugation de la suspension homo-ionique, pâte de kaolinite hydratée, est conservé à  $4^\circ\text{C}$  en flacon verre hermétiquement bouché. La distribution granulométrique de la solution colloïdale de kaolinite à pH 6,5 et force ionique  $10^{-2} \text{ M}$  est comprise entre  $0,1 \mu\text{m}$  et  $70 \mu\text{m}$ , avec un maximum à  $8,2 \mu\text{m}$ . Les particules de dimension inférieures à  $3,9 \mu\text{m}$  représentent 30,1% du solide en suspension.

L'acide humique est commercialisé sous forme du sel de sodium, (lot n° 61852-095, référence 1,675-2, Aldrich). Un gramme de produit commercial est dissous dans environ 250 mL de solution concentrée de NaOH à pH 11 durant 24 h. La solution est centrifugée à  $3000 \text{ tr.min}^{-1}$  durant 15 mn puis filtrée à  $0,45 \mu\text{m}$  pour éliminer les impuretés insolubles en milieu basique. Les acides humiques dissous dans le filtrat sont précipités à pH 1 en milieu HF durant 12 h (permettant la dissolution des silicates). Le précipité récupéré après centrifugation ( $3000 \text{ tr.min}^{-1}$  durant 15 mn) est lavé trois fois par 300 mL d'eau UHQ. Chaque lavage est suivi d'une centrifugation. L'acide humique obtenu est séché à  $45^\circ\text{C}$  durant 6 h puis conservé en flacon fermé.

Le pyrène est un HAP à quatre noyaux, de masse moléculaire  $202 \text{ g.mole}^{-1}$  et de solubilité dans l'eau  $162 \mu\text{g.L}^{-1}$ . Le produit utilisé est disponible sous la référence 177 auprès du bureau de référence BCR de la Commission de la Communauté Européenne, est utilisé sans purification préalable. Une solution mère méthanolique à  $125 \text{ mg.L}^{-1}$  est conservée en flacon ambré à  $4^\circ\text{C}$ .

Adsorption du pyrène sur la kaolinite

Quatorze essais correspondant à des masses de kaolinite déshydratée variant de 200 à 2500 mg ont été réalisés. La masse adéquate de pâte de kaolinite hydratée est mise en suspension dans 25 mL d'une solution aqueuse de  $NaNO_3 \ 10^{-2} \text{ M}$  à pH 6,5 contenant  $25 \mu\text{g.L}^{-1}$  de pyrène durant 24 h. La suspension est agitée mécaniquement 2 mn toutes les 6 h puis centrifugée durant 15 mn à  $3000 \text{ tr.min}^{-1}$ . Le pyrène soluble dans la phase aqueuse surnageante est extrait par 5 mL de cyclohexane sous agitation va-et-vient à 100 coups.min<sup>-1</sup> durant 20 mn. La phase organique récupérée est soumise à un courant d'azote pour évaporation du cyclohexane. Le résidu sec est dissous dans l'acétonitrile et analysé par chromatographie liquide haute pression (HPLC) à détection de fluorescence (chaîne Merck Hitachi L6200-A F-1080). Les conditions chromatographiques sont les suivantes : colonne Merck Lichrospher 250-4, éluant acétonitrile HPLC Baker, débit  $1 \text{ mL.min}^{-1}$ , température  $20^\circ\text{C}$ , détection de fluorescence  $\lambda_{\text{ex}}=333 \text{ nm}$   $\lambda_{\text{obs}}=382 \text{ nm}$ .

Adsorption de l'acide humique sur la kaolinite

Onze essais ont été réalisés avec des masses de kaolinite déshydratée variant de 200 à 2500 mg. La masse de pâte de kaolinite hydratée est mise en suspension durant 24 h dans 25 mL d'une solution aqueuse de  $NaNO_3 \ 10^{-2} \text{ M}$  à pH 6,5 contenant  $50 \text{ mg.L}^{-1}$  d'acide humique (soit  $16,2 \text{ mg.C.L}^{-1}$ ). La suspension est agitée mécaniquement 2 mn toutes les 6 h puis centrifugée durant 15 mn à  $3000 \text{ tr.min}^{-1}$ . La phase aqueuse surnageante est alors analysée par chromatographie d'exclusion stérique haute pression (CESHP) et quantification du COD.

Le poids moléculaire des composés humiques a été déterminé par CESHP. L'instrumentation est constituée de la chaîne chromatographique Merck-Hitachi décrite en 2.2 et d'une colonne et pré-colonne TSK G3000SW. Le système CESHP a été calibré selon la méthode d'étalonnage décrite par PEURAVUORI et PIHLAJA (1997). La phase mobile est constituée d'une solution de nitrate de sodium  $10^{-2} \text{ M}$  à pH 6,5, dont le débit est fixé à  $0,8 \text{ mL.min}^{-1}$ . La détection UV est fixée à 280 nm, la détection de fluorescence est obtenue avec  $\lambda_{\text{ex}} \ 330 \text{ nm}$  et  $\lambda_{\text{obs}} \ 440 \text{ nm}$ . Le poids moléculaire moyen en nombre est calculé selon l'étalonnage  $\log M_n = 5,34 - 2,85 K_{AV}$  ( $R^2 \ 0,97$ ).

Le contenu en Carbone Organique Dissous des échantillons a été déterminé au moyen d'un appareillage réalisé au laboratoire. Ce dispositif permet l'oxydation de la matière carbonée par voie humide au moyen de

peroxydisulfate de potassium sous irradiation UV et la quantification du CO<sub>2</sub> formé par conductimétrie après redissolution et réaction avec une solution titrée d'hydroxyde de sodium. La précision de la mesure est de 0,1 mg C.L<sup>-1</sup> sur l'étendue de travail (0,1 à 20 mg C.L<sup>-1</sup>).

#### Interaction du pyrène avec l'acide humique

Les expériences de complexation du pyrène par l'acide humique Aldrich ont été conduites en triplicats en flacon en verre ambré de 60 mL, fermé par un joint PTFE. Un volume de 106 µL d'une solution de pyrène dans le dichlorométhane à 583 µg.L<sup>-1</sup> est évaporé sous léger courant d'azote. Un volume de 3 mL de solution aqueuse d'acide humique (de concentration comprise entre 5 et 50 mg.L<sup>-1</sup>) à pH 6,5 et force ionique 10<sup>-2</sup> M (NaNO<sub>3</sub>) est ajouté pour la dissolution du pyrène. L'homogénéisation est favorisée dans un bain à ultrasons (40 kHz) durant 1 minute. Après 24 h de mise à l'équilibre, un dégazage permettant l'élimination de l'oxygène dissous (quencher de fluorescence du pyrène) est réalisé sous vide de 40 mbars pendant 3 mn. La concentration d'oxygène dissous est alors inférieure à 1 mg.L<sup>-1</sup>.

L'échantillon est regazé à l'azote (P<sub>N2</sub> 1050 mbars). La mesure d'extinction de fluorescence du pyrène lié aux acides humiques est réalisée au moyen d'un spectrofluorimètre conçu au laboratoire et décrit précédemment (DEVOS et al, 2000). La solution est transférée dans une cuve de quartz Suprasil miroitée face arrière (semi-micro 114 FR-QS Hellma) puis mise sous vide de 40 mbars. Les mesures de fluorescence sont réalisées après 1 minute à une longueur d'onde d'excitation de 313 nm (bande passante de 4 nm) et une longueur d'onde d'émission de 383,6 nm (bande passante de 0,5 nm). Afin de minimiser les réactions photochimiques, l'obturateur n'est ouvert que pendant la mesure (1 seconde de stabilisation de la valeur du photomultiplicateur, suivie de 8 millisecondes d'acquisition du signal correspondant à 50 valeurs moyennées). Les effets de filtre interne, absorption du rayonnement d'excitation et/ou du rayonnement de fluorescence par la solution, sont corrigés selon la méthode décrite par PARKER (1968). L'absorbance UV a été mesurée avec un spectrophotomètre à barrette de diodes Hewlett-Packard 8453 en cuve quartz Suprasil (1 cm de trajet optique).

### **Photo-oxydation du pyrène**

#### Techniques analytiques

- Le suivi analytique du pyrène et des photoproduits formés a été réalisé par HPLC Waters 600E avec un détecteur à barrette de diodes PAD 996, un éluant composé d'un mélange MeOH/H<sub>2</sub>O, avec une séparation sur colonne C18 de 5 µm et de 25 cm × 4,6 mm.
- La détermination des photoproduits est réalisée et GC/MS Agilent 6890 avec détecteur 5973 MSD, équipé d'une colonne HP5 de 30m×0,32mm×0,25µm, avec une programmation de température de 100 à 220°C à 10°C/min. La température de l'injecteur est de 250°C, les échantillons sont injectés en mode splitless. Le volume injecté est de 4 µL et le débit en He de 2 mL/min.

#### Préparation des échantillons de pyrène sur supports solides

Les supports solides contaminés à la concentration de 20 ppm en pyrène (Fluka 99%) sont préparés en mouillant le support solide avec une solution de pyrène dissous dans du cyclohexane suivi d'une évaporation du solvant au rotavapor (sans vide). Pour la contamination à la concentration de 10 000 ppm de Pyrène, 10 mg de pyrène sont broyés dans un mortier en présence 1 g de support (SiO<sub>2</sub> (99,5%, 60-220µm, SDS), CaCO<sub>3</sub> (Prolabo) ou Montmorillonite KSF (Aldrich)) jusqu'à obtention d'un mélange parfaitement homogène.

En présence d'une colonne d'eau désionisée, l'adsorption se fait comme précédemment, le support dopé à 1% de pyrène est placé dans un bécher contenant 50 mL d'eau distillée et recouvert d'un film alimentaire de type polyester, matériau n'absorbant pas la lumière solaire. Avant d'irradier les échantillons, ceux-ci sont placés à l'abri de la lumière pendant 2 h pour assurer l'équilibre de distribution du pyrène entre la phase solide et l'eau.

#### Traitement des supports solides après irradiation

Après irradiation des échantillons de Pyrène adsorbé sur SiO<sub>2</sub>, CaCO<sub>3</sub> et Montmorillonite, dans l'enceinte de simulation Suntest, ceux-ci sont extraits à l'acétone (rendement moyen d'extraction 93 ± 8 %), puis analysés par HPLC.

Pour extraire le pyrène adsorbé sur les différents supports secs, nous introduisons 1 g d'échantillon (pyrène +support) dans un flacon hermétique avec 10 mL d'acétone. L'extraction s'effectue au bac à ultrasons Branson

1200 (47 kHz) pendant 10 mn. Après décantation, nous prélevons quelques mL du surnageant, qui sera centrifugé pendant 5 mn. Les concentrations en pyrène extrait sont déterminées par GC. A titre d'exemple, les rendements d'extraction du pyrène adsorbé sur les différents supports sont donnés dans le tableau ci-dessous.

Tableau : Pourcentage moyen de pyrène extrait des supports modèles.

|                            | Solvant d'extraction | Rendement d'extraction moyen<br>par g de support |
|----------------------------|----------------------|--------------------------------------------------|
| Pyrène sur Silice          | Acétone              | $(90 \pm 8) \%$                                  |
| Pyrène sur Silice          | méthanol             | $(74 \pm 6) \%$                                  |
| Pyrène sur Calcite         | acétone              | $(90 \pm 8) \%$                                  |
| Pyrène sur Montmorillonite | acétone              | $(100 \pm 10) \%$                                |

L'intervalle d'incertitude a été calculé en utilisant la loi de Student avec un intervalle de confiance de 95%, un nombre d'analyse de  $n=4$  et un  $t_{\alpha/2, \gamma} = 2,7764$ .

En présence d'eau distillée, quelques mL d'eau sont prélevés après irradiation avec une seringue et filtrés à l'aide d'un filtre Whatman à  $0,45 \mu\text{m}$ . Le filtrat est analysé par HPLC. L'eau est séparée du support après décantation. Le support est mis à sécher sous hotte puis il est extrait comme précédemment.

## ANNEXE 4

### BIOESSAIS MONOSPECIFIQUES : MATERIELS ET METHODES

#### I/ Tests en phase aqueuse

##### I-1/ Préparation des solutions mères à tester

La gamme de concentrations à réaliser pour les essais en phase liquide est la suivante (exprimée en µg/L de pyrène) : 0-10-18-32-56-100 et 180. Pour cela, on utilise du pyrène à l'état cristallin (ALDRICH, pureté 98 %) que l'on dissout dans un co-solvant qui est ici l'acétone. Les solutions mères sont préparées à partir d'une solution initiale à 1g/L. Au final, les différentes solutions de pyrène à tester ne doivent pas dépasser 0.02 % de solvant (soit 0.02 mL pour 100 mL). Les solutions sont alors complétées au volume adéquat par le milieu nécessaire pour la réalisation de chaque test.

##### I-2/ Tests sur daphnies *Daphnia magna*

###### I-2-1/ Conditions d'élevage de *Daphnia magna*

L'élevage des daphnies se fait dans des récipients en verre transparents d'une contenance de 2 L. Le milieu d'élevage est du milieu M4 (Elendt et Bias, 1990). Les solutions mères sont stockées au réfrigérateur et renouvelées tous les deux mois. Le renouvellement du milieu d'élevage s'effectue par moitié une fois par semaine. Il est conseillé de ne pas dépasser 25 à 30 individus par litre, une trop grande densité de population pouvant entraîner une dégradation de l'élevage. Les daphnies sont nourries chaque jour avec un mélange d'algues vertes, *Pseudokirchneriella subcapitata* et *Chlorella vulgaris*. Les cultures algales sont régulièrement repiquées sous hotte dans le but d'éviter la contamination des cultures. Les cultures très vertes sont conservées au réfrigérateur. Dans le but de limiter la densité de population dans les différents élevages, les jeunes daphnies sont éliminées tous les jours œuvrés. Les jeunes sont soit éliminés, soit servent au renouvellement des élevages ou encore sont utilisés pour les essais d'écotoxicité.

###### I-2-2/ Protocole du test

Les tests d'immobilisation 24h et 48h du microcrustacé *D. magna* sont inspirés des normes NF ISO 6341 (1995) et AFNOR (1983). Le milieu utilisé pour la réalisation des solutions à tester est un milieu reconstitué à partir de quatre solutions de calcium, sodium, magnésium et potassium, de dureté  $250 \pm 25$  mg  $\text{CaCO}_3/\text{L}$ . Ce milieu de dilution est préparé la veille du test et agité une partie de la nuit pour saturer le milieu en oxygène. Avant son utilisation, le milieu est ajusté à pH  $7.8 \pm 0.2$  et filtré à  $0.22 \mu\text{m}$  pour éliminer au maximum les particules sur lesquelles le pyrène pourrait s'adsorber. Le test se déroule en tubes à essai contenant 10 mL de solution à tester et 5 daphnies d'âge inférieur à 24h. Quatre réplicats sont réalisés pour chaque concentration. Différentes conditions sont étudiées : obscurité et lumière. Pour les tests en présence de lumière, la photopériode retenue est 16h de jour et 8h de nuit. Il s'agit d'un éclairage fluorescent de type « coolwhite » émettant environ 10% d'UV (à 1500 lux on mesure une irradiance de  $566 \text{ W}/\text{cm}^2$  dans le domaine 220-1150 nm avec  $54 \mu\text{W}/\text{cm}^2$  d'UV(220-385 nm), Clément *et al.* 2000). Les critères de validité pour ce test sont une mortalité inférieure à 10 % chez les témoins et une  $\text{CE}_{50}$  du dichromate de potassium voisine de 1 mg/L quand un test sur ce toxique est réalisé.

##### I-3/ Test sur amphipodes *Hyalella azteca*

###### I-3-1/ Conditions d'élevage de *Hyalella azteca*

L'élevage des hyalles se fait dans des aquariums. Le milieu d'élevage est du milieu M4, le même que celui utilisé dans le test sur daphnie. Les organismes sont nourris avec du Tetramin® deux fois par semaine. Le renouvellement du milieu se fait une fois par semaine et par moitié. Trois élevages ont été réalisés: un aquarium contenant les adultes, un aquarium contenant les jeunes utilisés lors des tests, le dernier servant au renouvellement des populations. Les jeunes organismes devant avoir un âge compris entre 7 et 14 jours, les jeunes de l'aquarium pour adultes sont récupérés une fois par semaine, le même jour, et isolés dans l'aquarium

pour jeunes où ils vont se développer pour atteindre l'âge désiré pour la réalisation des tests. Les jeunes et les adultes sont triés de la même manière que les daphnies.

#### I-3-2/ Protocole du test

Le test sur *H. azteca* en phase aqueuse reprend une procédure analogue à celle du test daphnie. Les récipients utilisés sont des Erlenmeyers de 50 mL contenant 20 mL de solution à tester et 5 organismes par récipient. Trois réplicats sont réalisés pour chaque concentration.

#### I-4/ Test sur lentilles d'eau *Lemna minor*

##### I-4-1/ Conditions de culture de *Lemna minor*

*L. minor* est plus communément appelée la petite lentille d'eau. L'élevage des lentilles se fait dans des Erlenmeyers de 250 mL à col large sous une lumière avoisinant les 3500 lux. Les milieux de culture et de dilution (utilisé dans le test) sont les mêmes. Ces milieux sont préparés à partir d'un concentré nutritif issu de sept solutions mères (AFNOR, 1996). Le pH du concentré nutritif est ajusté si nécessaire à  $3.8 \pm 0.3$ . Le concentré nutritif est préparé juste avant son emploi. Le milieu de culture est lui constitué à 10 % de ce concentré nutritif et 90 % d'eau distillée. Son pH est alors ajusté à  $5.5 \pm 0.5$  puis le milieu est stérilisé à l'autoclave (120°C et 1 bar pendant 20 mn).

##### I-4-2/ Protocole du test

Avant réalisation d'un test définitif, il est nécessaire d'effectuer un test préliminaire. Les concentrations ainsi testées lors de ce premier test sont les suivantes : 0-18-56 et 180 µg/L de pyrène. Le test se déroule dans des béchers de 400 mL contenant 200 mL de solution à tester. Quatre réplicats sont réalisés pour chaque concentration. Chaque récipient contient 6 colonies de deux frondes identiques. Le test se déroule sous un éclairage continu de 3500 lux. La durée du test est de 6 jours. Le comptage du nombre de frondes a lieu tous les jours à la même heure.

#### I-5/ Test sur microalgues *Pseudokirchneriella subcapitata*

##### I-5-1/ Conditions de culture de *Pseudokirchneriella subcapitata*

L'espèce utilisée lors de ce test est une algue verte planctonique d'eau douce, *Pseudokirchneriella subcapitata*. L'observation de cette algue au microscope optique lui donne la forme d'un croissant. L'élevage au laboratoire se fait dans des Erlenmeyers de 500 mL contenant le même volume de milieu de culture. Le milieu utilisé pour la culture des algues est du milieu ISO (1989).

##### I-5-2/ Protocole du test

La gamme de concentrations testée est la même que pour les tests sur daphnies et hyalelles. Le milieu utilisé pour la réalisation des essais est du milieu OCDE (1993). L'inoculum est prélevé dans une culture en phase exponentielle de croissance. Le test se déroule dans des Erlenmeyers de 50 mL contenant 20 mL de solution à tester. La densité initiale est de 10000 cellules/mL. La durée du test est de trois jours. Différentes intensités lumineuses sont testées sous éclairage continu. La mesure de la densité algale se fait tous les jours à la même heure au moyen d'un compteur Coulter (modèle Z1, seuil de coupure : 3.6 µm).

## II/ Tests sur sédiments

### II-1/ Protocole de dopage des sédiments

La gamme de concentrations de pyrène retenue pour le dopage des sédiments est 0-2-20 et 200 mg/kg poids frais. Pour le test sur chironomes, deux types de sédiments sont préparés en vue d'étudier l'influence du mode de nutrition des organismes sur l'effet du pyrène :

- le premier sédiment reçoit une quantité définie de nourriture (Tétramin®) en même temps que son dopage est réalisé.
- dans le deuxième sédiment, il n'y a pas d'injection de nourriture, l'alimentation des organismes se fera quotidiennement.

Pour le test sur amphipodes, seul le deuxième type de sédiment a été testé (alimentation progressive en cours de test).

Les solutions mères de pyrène sont préparées dans l'acétone. Les volumes nécessaires à la contamination des sédiments sont introduits dans des flacons en verre de 1L. Les flacons ouverts sont alors mis à rouler sous une hotte pour laisser l'acétone s'évaporer et ainsi laisser se déposer le pyrène sur les parois du flacon (Ditsworth et

Schults, 1990). Après avoir homogénéisé les sédiments, les quantités de sédiments et, le cas échéant, de nourriture nécessaires au test sont incorporées dans les flacons. Une fois fermés, les flacons sont mis à rouler 4h. Pour la réalisation des témoins, le volume d'acétone ajouté est celui correspondant à la concentration maximale (200 µg/g).

## **II-2/ Test sur amphipodes *Hyalella azteca***

Les paramètres suivis lors de cet essai sont la survie et la croissance des organismes. Une mesure de bioaccumulation a également été effectuée sur une partie des organismes le dernier jour. Les jeunes hyalles utilisées sont en majorité âgées de 7 à 14 jours au début de l'essai, mais nous avons dû compléter avec des jeunes de 1 à 7 jours (environ 3 pour 10). La durée du test est de 14 jours. Les récipients utilisés sont des béciers de 400 mL contenant 150 g de sédiment frais. Le volume de milieu surnageant est de 200 mL (milieu OCDE (1993) modifié : milieu OCDE + 1mL/litre de solution D (vitamines) de M4). L'eau surnageante est introduite avec précaution de façon à minimiser la remise en suspension du sédiment. Le système est alors laissé au repos 4 jours, ce qui permet d'atteindre un certain équilibre dans la partition du pyrène entre les différentes phases. Un éclairage de 1300 à 1500 lux est fourni 16 h par jour. Dix individus sont introduits par bécier et quatre réplicats sont réalisés pour chaque concentration. Un contrôle du pH, de la conductivité, de la température et de l'oxygène dissous est fait régulièrement, ainsi qu'un dosage du  $\text{NH}_4^+$  et une mesure de COT en début et fin de test. L'alimentation des organismes se fait quotidiennement par apport de Tetramin® (1 mg/individu/jour)

Pour les mesures de bioaccumulation, les amphipodes sont récupérés, égouttés entre deux feuilles de papier, pesés (poids frais) et placés par groupes de 3 dans des puits d'une plaque 96 puits (Costar). 200 µL de méthanol sont ajoutés dans chaque puits et une gamme de teneurs en pyrène de 0 à 100 mg/L dans le méthanol est réalisée en parallèle sur chaque plaque. Le pyrène extrait et dissous dans le méthanol est détecté par fluorimétrie (fluorimètre Fluostar, excitation : 355 nm ; émission : 390 nm). La quantification (doses en µg pyrène/g de matière) est réalisée en transformant les unités de fluorescence relative en teneurs en pyrène des solutions de méthanol et en rapportant les quantités de pyrène extraites à la biomasse fraîche des amphipodes. Une correction est réalisée avec des amphipodes témoins (non contaminés) pour tenir compte de leur fluorescence naturelle ainsi que de celle du solvant.

## **II-3/ Test sur chironomes *Chironomus riparius***

### **II-3-1/ Conditions d'élevage au laboratoire**

Les chironomes (*C. riparius*) sont élevés dans des aquariums constitués de deux éléments identiques accolables, qui contiennent pour l'un un sédiment reconstitué à base de sable et une colonne d'eau (milieu M4) où se développent les larves jusqu'au stade nymphal, le second ayant pour but de récupérer les chironomes après émergence des nymphes. Régulièrement (2 à 3 fois par semaine), les pontes issues de la cage où sont placés les adultes, mâles et femelles, sont récupérées puis placées dans les élevages pour un renouvellement des populations ou isolées en vue de la réalisation d'un test.

### **II-3-2 / Protocole du test**

Les paramètres testés lors de cet essai sont la survie et la croissance des organismes. Les jeunes chironomes utilisés sont des larves isolées âgées de 2 à 4 jours après éclosion. La durée du test est de 10 jours. Les récipients utilisés sont des béciers de 400 mL contenant 120 g de sédiment. Le volume de milieu surnageant est de 200 mL (milieu OCDE (1993) modifié comme pour les tests sur *Hyalella azteca*). L'eau surnageante est introduite de façon à minimiser la remise en suspension du sédiment. Le système est alors laissé au repos 3 à 4 jours. Un éclairage de 1300 à 1500 lux est apporté 16 h/jour. Dix individus sont introduits par bécier et quatre réplicats sont réalisés pour chaque concentration. Un contrôle du pH, de la conductivité, de la température et de l'oxygène dissous est fait régulièrement, ainsi qu'un dosage du  $\text{NH}_4^+$  et une mesure de COT en début et fin de test sur eaux interstitielles et eaux surnageantes. La nourriture des organismes est soit incorporée initialement au sédiment (140 mg), soit apportée quotidiennement (1 mg/individu/jour).

## **II-4/ Analyses du pyrène**

Un dosage du pyrène dans le sédiment, les eaux interstitielles et les eaux surnageantes a été réalisé à J0 (jour d'introduction des organismes) et J14 (fin du test) au cours du test sur amphipodes. L'objectif était de (i) vérifier que le rendement du dopage par la technique utilisée est suffisant, (ii) connaître la partition du pyrène au moment de l'introduction des organismes et (iii) voir comment cette partition évolue sur les 2 semaines du test.

A J0, 3 réplicats de chaque concentration (2, 20, 200 mg/kg frais) ont été sacrifiés. Les eaux surnageantes ont été récupérées par siphonnage, mélangées en proportions identiques pour constituer un échantillon moyen, filtrées à 0.8 µm (filtres Whatman GF/F en fibre de verre ; l'utilisation de filtres 0.45 µm en nitrate de cellulose peut conduire à des interactions avec le pyrène) de façon à doser la fraction dissoute, conservées dans des flacons en verre à l'abri de la lumière et à 4°C. Les eaux interstitielles ont été récupérées par centrifugation (4000 tr/mn pendant 30 mn à 4°C) sur une partie des sédiments et ont suivi le même processus que les eaux surnageantes. Les sédiments frais des réplicats d'un même traitement ont été récupérés, mélangés en proportions identiques et 40 à 50 g par traitement ont été conservés dans des flacons en verre à l'abri de la lumière à 4°C. Les échantillons ont été envoyés au Service Central d'Analyse du CNRS de Solaize (Vernaizon, 69) pour un dosage du pyrène dans les différentes matrices dans un délai de 1.5 à 2 mois. L'analyse du pyrène est effectuée par HPLC avec détecteur d'UV à 240 nm, sur une colonne Hypersil ODS C18 5 µm (200 x 2.1 mm) et un gradient d'élution eau/acétonitrile. Les échantillons d'eau sont injectés directement, avec des volumes d'injection importants (boucle jusqu'à 1500 µL). Après homogénéisation des sédiments et déshydratation par addition de sulfate de sodium anhydre ou de diatomite, le pyrène est extrait au moyen de toluène à chaud et sous pression (extracteur Dionex ASE). Les extraits sont dosés selon le même protocole que pour les échantillons aqueux.



## ANNEXE 5

### EXPÉRIENCES EN MICROCOSMES CLOS : MATERIELS ET METHODES

#### **Dispositif expérimental et suivi analytique**

Le descriptif des microcosmes et de l'installation expérimentale a déjà été présenté dans le chapitre 5 de ce rapport.

#### Mesure du $^{14}\text{CO}_2$

L'effluent gazeux des microcosmes était relié à deux piège à  $^{14}\text{CO}_2$  consécutifs contenant respectivement 15 et 10 ml de soude 1N. Tous les 7 jours, la solution de soude était renouvelée. La radioactivité piégée a été mesurée dans des flacons à scintillation contenant 1 ml de solution de chaque piège et 7 ml de cocktail scintillant (Ready Value, Beckman). Après 1h à une nuit d'incubation pour laisser se dissiper la luminescence parasite due à la soude, la radioactivité a été déterminée à l'aide d'un compteur (Inter technique ou Beckman). Les données sont exprimées en cpm ou en pourcentage de la radioactivité initiale contenue dans le  $^{14}\text{C}$ -pyrène.

#### Réglage et mesure des débits d'air

Le flux d'air traversant les microcosmes a été mesuré à l'aide d'un débitmètre à bulle de savon branché sur la tubulure de sortie. Le débit était ajusté entre 1 et 1,5 L/h à l'aide d'une vanne micrométrique placée sur le circuit d'alimentation en air et par des pinces de Mohr sur les tubulures d'entrée des microcosmes.

#### Préparation d'échantillons de sédiments, de phase aqueuse et de plantes pour analyse

En fin d'incubation, soit après 61 jours pour les sédiments crayeux, les microcosmes ont été traités de la manière suivante :

Les plantes et les lentilles d'eau ont été retirées, rincées, soumises à diverses mesures (comptages, longueur des tiges et des feuilles, pesée), et conditionnées séparément. Les plantes provenant de la même série de microcosmes (1-3 et 4-6) ont ensuite été regroupées, puis fractionnées en cinq lots selon la nature des organes : racines, base des tiges, extrémité des tiges, base des feuilles, extrémité des feuilles. Ces lots ont ensuite été soumis à des extractions au méthanol pour doser le pyrène (HPLC) ou la radioactivité incorporée.

Près décantation, l'eau surnageante de chaque microcosme a été filtrée sous vide sur des unités stériles comportant une membrane 0,2  $\mu\text{m}$ , diam. 75 mm (Nalgene) et recueillie dans des flacons stériles. Après comptage de la radioactivité, les lots de phases aqueuses ont été conservés à 4-7°C à l'abri de la lumière jusqu'aux extractions et analyses par CCM.

Trois lots de env. 1,5 g de sédiments humides par microcosme ont été placés dans des tubes Falcon stériles, puis conservés à 4-7°C (comptages de bactéries) ou à -20°C (analyses d'ADN).

Des lots de 50 g de sédiments humides ont été placés dans des fioles de 250 ml contenant 100 ml de Tris-HCl, 0,1 M, pH 7,5, et agités 16 h à 20°C puis décantés 24 h à 4-7°C. Le surnageant, contenant le liquide interstitiel des sédiments, a ensuite été filtré sur microfibre de verre (filtres Whatman, type GF/B, 1  $\mu\text{m}$ ), analysé par comptage de radioactivité, puis stocké dans des tubes stériles à 4-7°C à l'abri de la lumière. Les sédiments ainsi lavés et décantés ont ensuite été soumis à une extraction en solvant organique.

#### Extractions du $^{14}\text{C}$ -pyrène et des métabolites de l'eau et des sédiments

Les échantillons de sédiments ou de plantes ont été extraits à sec en utilisant un appareil de Soxhlet. Le sédiment humide (10 g) a été broyé avec 30 g de sulfate de sodium anhydre puis placé en cartouches de cellulose pour l'extraction dans un appareil automatique Buchi. L'extraction a été effectuée pendant 5 h par du dichlorométhane 100% ou parfois par du méthanol. Les extraits ont été concentrés au rotavapor à environ 4 ml et conservés en flacons en verre inactinique.

Les échantillons aqueux (25 à 40 ml) ont été acidifiés avec de l'acide trichloracétique (0,1% final), puis déposés sur cartouche d'extraction en phase solide (SPE) de type C18U-S-500/6 (Upticlean, Interchim). Après lavage par 10 ml d'eau acidifiée, les colonnes ont été éluées successivement par du méthanol 50% et 100% (5 ml de chaque).

Les éluats 50% meOH contenant l'essentiel de la radioactivité extraite, ont été évaporés par lyophilisation avant analyse par CCM.

#### Analyse du $^{14}\text{C}$ -pyrène et des métabolites par chromatographie sur couche mince (CCM)

Les échantillons à analyser, des extraits méthanoïques, ont été déposés à l'aide de micro pipettes en verre, à raison de 2 à 10  $\mu\text{l}$  par dépôt, sur une plaque de silice 60 de 20x20 cm (Merck n° 1. 053735) à 1 cm du bord inférieur. Des étalons des produits purs suivants ont servi de référence :  $^{14}\text{C}$ -pyrène, acide 4,5-diphénantroïque, pyrène 4,5-dihydrodiol, acide phtalique. La plaque a été développée dans une cuve de chromatographie par le mélange hexane/acétone, 8/2. Après séchage, la plaque a été chromatographiée à nouveau par le mélange benzène/acétone/acide acétique, 85/10/5. Après quoi, la plaque était exposée à un film de type Kodak Biomax pendant 1 à 4 semaines à 20°C. Le film a ensuite été révélé comme un film photographique, pour mettre en évidence les taches radioactives.

### **Méthodes micro biologiques**

#### Extraction des bactéries des sédiments

Des échantillons de sédiments (1 à 1,5 g) ont été repris dans 3 volumes de tampon phosphate stérile, homogénéisés vortex pendant 10 s puis traités aux ultrasons pendant 1 min dans un bain à ultrasons (Fisherbrand FB 11011). Après 3 cycles de ce traitement, les suspensions ont été laissées à décanter pendant 5 min et 1 ml de la partie supérieure a été transféré dans un tube stérile puis stocké à 4°C.

#### Comptages au microscope

Les bactéries en suspension ont été colorées en utilisant le LIVE/DEAD BacLight Bacterial Viability Kit (Molecular Probes, Oregon, USA). Cent  $\mu\text{l}$  de suspension ont été mélangés avec 100  $\mu\text{l}$  d'un mélange 1:1 de SYTO 9 nucleic acid stain et de propidium iodide et incubées pendant 15 min à l'obscurité. Ensuite, 5  $\mu\text{l}$  du mélange sont étalés sur une lame de microscope et observé par épifluorescence avec un microscope Zeiss Axioskop (objectif Plan NEOFLUAR 40x, filtre FITC). Les cellules colorées vertes (bactéries vivantes) ou rouges (bactéries mortes) sont comptées sur 10 champs de vue différents. Le nombre total de bactéries par g de sédiment humide ( $N_i$ ) est calculé en multipliant le nombre moyen par champ ( $N_c$ ) par  $10^6$  (facteur de conversion établi par étalonnage préalable avec *Escherichia coli* W6) et par 3,5 (facteur de dilution déterminé en supposant un taux d'humidité des sédiments de 50%).

#### Comptages sur boîtes de Pétri

Le nombre de bactéries capables de dégrader le pyrène sur milieu gélosé a été déterminé comme suit. Des boîtes de Pétri en verre contenant du milieu MSM gélosé ont été préalablement étalées avec 1/100 de volume de cycloheximide (5 mg/ml; stérilisé par filtration à 0,22  $\mu\text{m}$ ) afin d'empêcher le développement des moisissures. Ensuite, une solution de pyrène à 1 mg/ml dans l'acétone, a été étalée à raison de 4 x 1 ml sur une boîte de 15 cm en diamètre contenant 100 ml de milieu gélosé, en laissant évaporer l'acétone sous Sorbonne entre chaque étalement. Enfin, sur la couche blanche de pyrène ainsi formée est étalé 100  $\mu\text{l}$  de suspension bactérienne, non diluée ou diluée 10x et 100x dans du tampon phosphate stérile. Après séchage sous hotte à flux laminaire, la boîte est refermée avec du parafilm et incubée dans une étuve à 30°C pendant 15 jours. Au bout de ce temps, le nombre de zones translucides de dégradation dans la couche de pyrène est comptabilisé et ramené à la quantité par g de sédiment humide en tenant compte de la dilution effectuée. Pour les zones de petite taille, une meilleure visualisation est obtenue en observant les boîtes aux UV (transilluminateur TFX-20M, 312 nm).

#### Isolement de souches

A partir des zones de dégradation du pyrène, des bactéries ont été prélevées à l'intérieur de ces zones et repiquées par étalement sur une nouvelle boîte de milieu gélosé du même type. Dès lors qu'une croissance bactérienne était décelable à l'intérieur la nouvelle zone de dégradation (au bout de 10 à 15 jours d'incubation) les bactéries ont été étalées sur milieu gélosé PTYG20 de manière à obtenir des colonies isolées. Plusieurs colonies issues de cette première étape de purification sont retestées pour leur capacité de dégrader le pyrène. Des colonies positives subissent encore deux cycles de purification (étalement sur milieu PTYG20 et repiquage de colonies isolées) afin de s'assurer de l'homogénéité et de la stabilité phénotypique de la souche isolée. Les bactéries sont conservées à -80°C, sous forme de billes (Microbank<sup>TM</sup> Storage System, PRO-LAB Diagnostics, Canada).

Identification de souches bactériennes par séquençage du gène codant pour l'ARN 16S

De l'ADN chromosomique a été isolé à partir de cellules cultivées sur milieu PTYG20 gélosé, en utilisant la méthode décrite par Beji et al. (1987). Le gène codant pour l'ARN ribosomal 16S a été amplifié par PCR et séquençé selon Mouné et al. (2000). La séquence obtenue a été utilisée pour interroger les bases de données de séquences nucléiques (Genbank) en utilisant le programme BLAST, afin d'identifier l'espèce ou la souche bactérienne la plus proche.

**Méthodes de biologie moléculaire**Mise au point d'une procédure d'extraction d'ADN des sédiments

L'objectif est d'extraire l'ADN microbien du sédiment sans isolement préalable des microorganismes. La méthode d'extraction est basée sur celle décrite par Zhou et al. (1996).

## Etapes d'extraction

1. Lyse bactérienne in situ en présence de lysozyme (10 mg/ml), puis de SDS (2%),
2. Trois cycles de congélation à  $-172^{\circ}\text{C}$ /décongélation à  $65^{\circ}\text{C}$ ,
3. Centrifugation : extrait soluble 1,
4. Extractions phénol et chloroforme,
5. Précipitation à l'isopropanol et solubilisation dans l'eau : extrait soluble 2

## Etapes de purification

6. Filtration sur micro-colonne tamis moléculaire de sephacryl S400 HR (Amersham Biosciences)
7. Purification sur micro-colonne de silice DNeasy (Qiagen)

## Conditions testées

Pour chaque type de sédiment (sans ajout de pyrène), 2 lots de 5 g chacun ont été traités en parallèle, dont l'un a été enrichi par *Mycobacterium* 6PY à raison de  $10^8$  bactéries /g.

La procédure a permis d'extraire une quantité appréciable d'ADN à partir de chacun des sédiments. L'extrait obtenu à partir du sédiment tourbeux (extrait soluble n°2) est cependant contaminé par une (des) substance brune qui empêchent la quantification d'ADN par la mesure de l'absorption à 260 nm.

Lors des étapes de purification, la coloration brune n'est que partiellement éliminée sur colonne de silice. L'élimination est meilleure sur colonne de tamis moléculaire qui exclut l'ADN et retient l'essentiel de la coloration. La purification en 2 étapes sur micro-colonnes de tamis moléculaire puis de silice (DNeasy) a donné les meilleurs résultats.

Tableau A5 1 : Rendement d'extraction et de purification d'ADN des sédiments crayeux et tourbeux.

| Tableau 15 : Rendement d'extraction et de purification d'ADN des sédiments Crayeux et Tourbeux. |                                           |                          |                                   |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------|--------------------------|-----------------------------------|
| Sédiment                                                                                        | Ext. Soluble n°2<br><br>µg ADN/g sédiment | Purif sur µcolone DNeasy | Purif sur µcolonne S400 et DNeasy |
|                                                                                                 |                                           | µg ADN/g sédiment        | µg ADN/g sédiment                 |
| Crayeux                                                                                         | 16                                        | 14.6                     | 6.8                               |
| Crayeux + Myco                                                                                  | 23.9                                      | 15.0                     | 11.1                              |
| Tourbeux                                                                                        | nm                                        | nm                       | 29.2                              |
| Tourbeux + Myco                                                                                 | nm                                        | nm                       | 40.0                              |

nm : non mesurable

Pour le sédiment crayeux, le rendement de purification d'ADN sur les 2 µcolonnes à partir de l'extrait soluble 2 varie entre 42 et 46 %. L'ADN purifié à partir du sédiment tourbeux est sans doute un peu surestimé du fait de la persistance de contaminants colorés dans la préparation.

### Tests de qualité des préparations d'ADN et amplification par PCR

Les préparations d'ADN ont été testées dans deux types d'expérience : une digestion par une enzyme de restriction et une amplification par PCR.

Après digestion par l'enzyme *EcoR1* dans des conditions standard, les fragments d'ADN obtenus ont été séparés par électrophorèse sur gel d'agarose et visualisés par coloration au bromure d'éthidium. La comparaison entre ADN digéré et non digéré montre que la digestion n'est que très partielle. On peut en déduire qu'il y a probablement des contaminants dans la préparation qui inhibent la digestion enzymatique.

Pour le test d'amplification par PCR, nous avons choisi des amorces universelles permettant d'amplifier tous les gènes bactériens codant les ARN ribosomaux 16S. Deux dilutions de l'ADN ont été testées, 1/2 et 1/10. De l'ADN purifié de *Mycobacterium* a servi de témoin positif. L'analyse des produits de PCR sur gel d'agarose a montré que seuls les extraits du sédiment crayeux ont donné un résultat positif. Des fragments d'ADN de taille moyenne env. 1,6 kb ont été obtenus, taille comparable à celle du fragment amplifié à partir de l'ADN purifié de *Mycobacterium* (contrôle positif). Ce résultat a été obtenu à la dilution de 1/10, la réaction de PCR étant apparemment inhibée à la dilution au 1/2 par des contaminants de la préparation.

Pour améliorer la qualité de l'ADN obtenu, notamment à partir du sédiment tourbeux, une étape supplémentaire de purification sur colonne S400 HR a été faite. Un produit de PCR de taille correcte a alors été obtenu.

### Essais d'analyse de la diversité bactérienne des sédiments par TGGE ou SSCP

L'objectif est d'obtenir une image de la diversité des espèces bactériennes dans les sédiments. A terme, en comparant de telles images avant et après contamination par le pyrène, nous voulions observer l'incidence et les perturbations induites par cette contamination sur l'équilibre et la diversité d'espèces de la communauté bactérienne. Au plan technique, l'image est obtenue par l'analyse d'un gène commun à toutes les bactéries et codant une sous-unité de l'ARN des ribosomes (ARNr 16S). La séquence nucléotidique de ce gène varie selon l'espèce. L'amplification par PCR de ce gène (ou d'un fragment) à partir de l'ADN d'une communauté de bactéries donne un mélange de double-brins d'ADNr 16S de même taille qu'il est possible de séparer par électrophorèse selon une technique initialement mise au point par Muyzer et al. (1993) et appelée DGGE (denaturing gradient gel electrophoresis). L'image obtenue est un profil de bandes d'intensités variables qui est le reflet de la diversité des espèces présentes. Une variante de cette méthode est appelée TGGE (temperature gradient gel electrophoresis). Ces techniques séparent les double-brins d'ADN selon les paramètres de dénaturation (température), c'est-à-dire selon les conditions à partir desquelles les brins se dissocient : ces paramètres sont directement fonction de la séquence des brins d'ADN.

Une autre technique appelée SSCP (single strand conformation polymorphism), consiste à séparer les 2 brins d'ADN avant de les séparer par électrophorèse.

### ***Essais d'analyse d'ADNr 16S par SSCP***

Nous avons appliqué la méthode décrite par Schweiger et Tebbe (1998). Celle-ci consiste à amplifier un fragment du gène ADNr 16S de 400 bp env., puis à dénaturer l'ADN et à séparer les simples brins par électrophorèse haute résolution. A l'usage ; la méthode s'est révélée délicate à mettre en œuvre. Notamment nous n'avons pas trouvé les conditions permettant la dénaturation complète des double-brins d'ADN. Une autre approche, basée sur la méthode décrite par l'équipe de J.-J. Godon de Narbonne (Delbès et al. 2000), sera testée prochainement.

### Essais d'analyse d'ADNr 16S par TGGE

Sachant que ce sont souvent des bactéries de type actinomycètes qui participent à la dégradation du pyrène, nous avons réalisé des amplifications par PCR ciblées, c'est-à-dire destinées à amplifier seulement l'ADNr 16S de ce type de bactéries, en employant un couple d'amorces d'ADN approprié (Tableau A5.1). En parallèle, des amorces dites universelles ont été employées pour obtenir un mélange de fragments d'ADNr 16S représentatif de tous les genres bactériens.

L'ADN a été extrait à partir des sédiments des microcosmes 1, 6, 7, et 9 selon la méthode décrite ci-dessus. Ces 4 préparations ont ensuite servi de matrices pour amplifier par PCR soit la région universelle soit la région spécifique actinomycètes.

Des fragments de la taille attendue (220 bp) ont bien été obtenus avec les amorces universelles, mais seules les préparations des microcosmes 1, 6 et 7 ont donné une bande de taille correcte (310 bp) dans le cas des amorces spécifiques actinomycètes. Ce résultat indique que le microcosme 9 est moins riche en bactéries de ce type. On pouvait s'y attendre, car contrairement aux microcosmes 6 et 7 ; le n° 9 n'a pas étéensemencé avec la souche 6 PY1. La présence d'actinomycètes dans le microcosme 1 est en accord avec l'isolement d'espèces du genre *Mycobacterium* dans ce cas là (cf. 5.8).

**Tableau 5A.1** Amorces employées pour l'amplification par PCR de fragments d'ADNr 16S

| Amorces           | Séquence                                        | Région amplifiée | Taille du fragment | Spécificité   |
|-------------------|-------------------------------------------------|------------------|--------------------|---------------|
| F341 GC<br>RV 518 | [GC1]ACTCCTACGGGAGGCAGCAG<br>ATTACCGCGGCTGCTGG  | 341-518          | 217 pb             | universelle   |
| R513 GC<br>F243   | [GC2]GCCGCGGCTGCTGGCACGTA<br>GGATGAGCCCGCGGCCTA | 243-513          | 310 pb             | actinomycètes |
| 16SC<br>16SD      | AGAGTTTGATCCTGGCTCA<br>ACGGGCGGTGTG(A/G)C       |                  | 1400 pb            | universelle   |

[GC1] représente la séquence suivante : CGCCCGCCGCGCGCGGGCGGGGCGGGGGCACGGGGGG et  
[GC2] : CGCGGGGCGCGCCCCGGGCGGGGCGGGGGCACGGGGGGCG

L'analyse par TGGE a été réalisée à l'aide d'un appareil d'électrophorèse (D-Code system, Biorad) permettant d'augmenter par gradient la température du bain de 50 à 65 °C pendant la durée d'électrophorèse (16 h). Les conditions opératoires étaient inspirées de celles décrites par Cheung et Kinkle (2001). En dépit de plusieurs essais de mise au point, nous n'avons pas réussi à obtenir une image nette et exploitable : à défaut du résultat escompté (une série de bandes échelonnées de bas en haut du gel d'électrophorèse) les mélanges de brins d'ADN provenant des microcosmes ont donné des traînées diffuses. Ces difficultés techniques nous ont contraint à renoncer à cette approche.

## ANNEXE 6

## ESSAIS EN MICROCOSMES OUVERTS : MATERIELS ET METHODES

**1. Elevage des organismes**

Les conditions sont les mêmes que celles présentées pour les tests monospécifiques (cf annexe 4)

**2. Prélèvement, préparation, et dopage des sédiments**

Les méthodes sont les mêmes que celles présentées pour les tests monospécifiques (cf annexe 4)

**3. Mise en oeuvre des bioessais****3.1. Mise en place des phases aqueuse et sédimentaire**

Le tableau 1 résume les modalités expérimentales mises en œuvre dans les bioessais présentés dans ce rapport.

Tableau 1 : Principales conditions expérimentales observées dans les bioessais durant cette étude

| Bioessais               | Type de contenant  | Masse de sédiment | Volume de milieu d'essai |
|-------------------------|--------------------|-------------------|--------------------------|
| Essai mono              | Bécher de 400 ml   | 50 grammes        | 300 ml                   |
| Essais pluri1 et pluri2 | Bécher de 2 litres | 100 grammes       | 2 litres                 |

La phase aqueuse utilisée dans ces bioessais est un milieu de type OCDE (OCDE, 1993). Il est introduit dans les béchers après introduction de la phase sédimentaire, en prenant soin de minimiser les turbulences et la remise en suspension du sédiment. Un film alimentaire percé de quelques trous est apposé sur l'ouverture du bécher et maintenu par un élastique. Ce film permet de limiter les pertes par évaporation et de piéger les chironomes émergents. L'oxygène est délivré par une pompe à air couplée à un système répartiteur qui permet l'alimentation de plusieurs béchers. Un filtre à air (maille de 0.22 µm) est disposé en amont du réseau d'alimentation. Pour les essais pluri1 et pluri2, les systèmes ainsi équipés sont placés pendant 7 jours à l'obscurité et à une température de 20°C. A l'issue de cette période, ils sont soumis à un éclairage de type jour long (16 h/24h) d'une intensité de 2000 Lux. Pour l'essai mono les systèmes sont immédiatement soumis au même éclairage et des mesures sur bactéries (activités enzymatiques et densités bactériennes) et sur daphnies (bioaccumulation) sont effectuées dès la 1<sup>ère</sup> semaine.

**3.2. Introduction des organismes (essais pluri1 et pluri2)**

Les organismes sont introduits dans les microcosmes 7 jours après la mise en place de la phase aqueuse et de la phase sédimentaire, à l'exception de la souche *Mycobacterium* 6PY1 qui est introduite dans le sédiment, par le biais d'une suspension incorporée de façon homogène avant adjonction du milieu d'essai (donc à J0).

Les caractéristiques des organismes introduits dans les microcosmes sont présentées dans le tableau 2.

Tableau 2 : Caractéristiques des organismes introduits dans le cadre des bioessais plurispécifiques en microcosmes

| Organismes                 | Caractéristiques         | nombre                             |
|----------------------------|--------------------------|------------------------------------|
| <i>Lemna minor</i>         | Colonies de 2 frondes    | 6                                  |
| <i>Daphnia magna</i>       | Individus âgés de moins  | 10                                 |
| <i>Hyalella azteca</i>     | Individus âgés de 7 à 14 | 10                                 |
| <i>Chironomus riparius</i> | Larves au deuxième stade | 25                                 |
| <i>Mycobacterium</i> 6PY1  | Souche                   | 1.5. 10 <sup>7</sup> individus par |

### 3.3. Paramètres et conditions de réalisation des bioessais

Durant la totalité du test, soit 28 jours, les microcosmes sont maintenus en chambre climatisée à 20°C. L'éclairement d'une intensité comprise entre 2000 lux est délivré par des tubes fluorescents de type lumière du jour, la photopériode est de type jour long (16 heures par jour).

Les apports en nourriture sont réalisés quotidiennement par adjonction au milieu d'une suspension de Tétramin® dans de l'eau distillée. La quantité apportée est de 5 mg par jour ; cette quantité a été retenue à la suite de l'essai préliminaire sans contaminant.

Aucun renouvellement de milieu n'est réalisé pendant la durée des bioessais.

### 3.4. Suivi des paramètres physicochimiques

#### 3.4.1. Sédiment

Le pH, la teneur en eau et la perte au feu des sédiments sont mesurés lors des sacrifices. La teneur en pyrène est également mesurée sur un échantillon constitué par homogénéisation de sous-échantillons de trois grammes de sédiment provenant des microcosmes sacrifiés. Les échantillons sont envoyés au Service central d'Analyses du CNRS à Solaize. Les protocoles utilisés ont été décrits dans l'annexe « matériels et méthodes des essais monospécifiques ».

#### 3.4.2. Eaux surnageantes

Le pH, la conductivité, la température et la teneur en oxygène dissous et le taux de saturation en oxygène dissous sont mesurés 2 fois par semaine sur 5 microcosmes par traitement. A l'occasion des sacrifices, la teneur en chlorophylle a est mesurée après filtration d'une partie de la colonne d'eau (1000 à 1500 mL selon la densité algale appréciée par observation visuelle), suivant la méthode ASTM (1993). Sur les eaux filtrées à cette occasion, sont également réalisées l'analyse des anions et cations en solution est réalisée par chromatographie ionique sur résine échangeuse d'ions (analyseur de type DIONEX), le dosage du COT par oxydation sous UV du carbone organique au persulfate de sodium et détection infra-rouge (COTmètre LAB TOC, Spectra-France/PPM), le dosage du pyrène (sur un échantillon constitué d'un mélange d'eaux surnageantes de plusieurs microcosmes sacrifiés) selon le protocole présenté plus haut (annexe « matériels et méthodes des essais monospécifiques »).

#### 3.4.3. Eaux interstitielles

Le sédiment obtenu après sacrifice des microcosmes est poolé pour chaque traitement. Les quatre lots de sédiment sont ensuite centrifugés à 4000 tours/minute à 4 °C pendant 30 mn. Le sédiment de type tourbe fournit un volume d'eaux interstitielles suffisant pour les analyses ultérieures. Dans le cas du sédiment de type craie, le volume récupéré peut être relativement faible. Il est dans ce cas ajusté à 100 ml avec de l'eau déminéralisée. Les eaux interstitielles sont ensuite filtrées à 0.7 µm sur un filtre Whatman GF/F. Les échantillons d'eau interstitielles sont stockés à 4 °C et à l'obscurité. Sur ces eaux sont réalisées les mesures suivantes : teneurs en anions et cations, teneur en COT, teneur en pyrène (même protocole que pour les eaux surnageantes).

### 3.5. Exposition des daphnies et dosage du pyrène bioaccumulé au cours de l'essai mono

#### 3.5.1. Mode d'exposition des daphnies

Les organismes utilisés dans cette partie de l'étude sont des daphnies juvéniles âgées de moins de 48 heures provenant des élevages entretenus au laboratoire.

Le tableau 3 présente les différents modes d'exposition auxquels ont été soumises les daphnies ainsi que les temps d'exposition retenus. A l'issue de l'exposition, les daphnies survivantes sont dénombrées et font l'objet de dosages de pyrène.

Tableau 3 : Modalités et durées d'exposition des organismes pour le bioessai monospécifique ((\*): eaux surnageantes récupérées lors de sacrifices dans lesquelles les daphnies sont donc exposées en l'absence de sédiment)

| Date d'exposition | Mode d'exposition     | Temps d'exposition |
|-------------------|-----------------------|--------------------|
| J17 à J18         | Eaux surnageantes (*) | 24 heures          |

|                                                                    |                                                      |                     |
|--------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------|---------------------|
| J0 à J1, J0 à J2, J2 à J3, J7 à J8, J14 à J15                      | Eaux surnageantes (*) filtrées à 0,8 $\mu\text{m}$ . | 24, 48 et 72 heures |
| J-4 à J-3, J-3 à J0, J0 à J1, J0 à J2, J2 à J3, J7 à J8, J14 à J15 | Sédiment et eaux surnageantes des microcosmes        | 24, 48 et 72 heures |

### 3.5.2. Dosage du pyrène bioaccumulé

Le protocole s'inspire de celui de Gourlay *et al.* (2002). 15 à 17 daphnies vivantes (préalablement séchées ou humides) sont broyées dans un tube à essai en verre au moyen d'une tige de verre, puis 2 mL de méthanol sont ajoutés. La suspension obtenue est introduite dans une seringue et filtrée à 0.45  $\mu\text{m}$  (Minisat®, SARTORIUS). Le filtrat est ensuite introduit dans une cuve en quartz poli pour permettre la lecture de l'échantillon au spectrofluorimètre. L'excitation du pyrène en solution est réalisée à une longueur d'onde de 332 nm ; le spectre d'émission résultant est obtenu entre 350 et 475 nm. Le pic de fluorescence retenu pour la quantification se situe à une longueur d'onde de 393 nm. En parallèle à la lecture de chaque échantillon, une gamme étalon de solutions de pyrène dans du méthanol est également lue afin de déterminer la relation entre fluorescence et teneur en pyrène des solutions.

## 3.6. Suivi des paramètres biologiques (organismes supérieurs des essais pluri1 et pluri2)

### 3.6.1. Daphnies

#### 3.6.1.1. Survie des mères

Le suivi et la numération des daphnies sont réalisés par prélèvement des individus au moyen d'une pipette graduée retournée. Les daphnies sont alors placées dans un peu d'eau surnageante de leur microcosme d'origine, puis dénombrées et observées (croissance, couleur, présence d'œufs chez les daphnies mères, présence de mâles). Le milieu d'essai et les daphnies sont alors réintroduits avec précaution dans le microcosme.

#### 3.6.1.2. Reproduction et dosage du pyrène dans les daphnies juvéniles

Lors du dénombrement des adultes, les jeunes daphnies éventuellement présentes sont dénombrées après les avoir récupérées par aspiration (siphonnage d'une partie de la colonne d'eau et tamisage). Les individus issus de microcosmes ayant reçu le même traitement sont placés dans un tube à essai contenant 2 mL de méthanol à 90%. Les échantillons sont ensuite placés à 4°C à l'obscurité en attendant de fournir des mesures de bioaccumulation du pyrène chez les jeunes daphnies.

### 3.6.2. Amphipodes

Le taux de survie des amphipodes est déterminé lors des sacrifices des microcosmes. Les amphipodes sont capturés à l'aide d'une œuse ou d'une pince à la surface du sédiment et stockés dans une petite quantité d'eau surnageante de leur microcosme d'origine. Les individus sont alors dénombrés et observés (croissance, formation de couples).

### 3.6.3. Chironomes

Le taux de survie des larves de chironomes est déterminé lors du sacrifice des microcosmes. Les larves sont extraites du sédiment et placées dans une petite quantité d'eau surnageante provenant de leur microcosme d'origine. Les individus sont alors dénombrés et observés (croissance). Les adultes qui ont émergé sont triés par sexe et dénombrés tous les jours à partir de J10. Les individus sont ensuite placés dans des piluliers en polyuréthane et stockés au congélateur pour dosage ultérieur du pyrène.

### 3.6.4. Lentilles d'eau

Le développement des lentilles est suivi lors du dénombrement des daphnies mères. Les colonies sont dénombrées, le nombre de frondes qui composent chaque colonie est également relevé. Une observation de l'aspect général est ensuite réalisée afin de noter l'éventuelle apparition de signes de dégénérescence (frondes jaunies ou chlorotiques).

### 3.6.5. Mesures de poids frais et sec

Les organismes survivants sont rapidement essuyés sur une feuille de papier absorbant, leur poids frais est mesuré, puis ils sont placés pendant 24 heures dans une étuve à 60°C. Les mesures de poids frais et sec sont



réalisées sur la totalité des individus d'un microcosme. Le poids moyen est obtenu par division de la valeur obtenue par le nombre d'individus.

### 3.7. Suivi du compartiment bactérien

#### 3.7.1. Activités exoenzymatiques

Les mesures d'activités enzymatiques bactériennes retenues dans cette partie de l'étude sont l'activité leucine-aminopeptidase et l'activité  $\beta$ -glucosidase. Les protocoles de mesures mis en œuvre sont basés sur l'utilisation de l'épifluorescence de groupements chromophores greffés à des substrats enzymatiques (tableau 4). L'hydrolyse de ces complexes permet la libération du groupement chromophore qui émet alors un rayonnement fluorescent après excitation.

Tableau 4 : Substrats chromophores utilisés dans les mesures d'activités exoenzymatiques leucine-aminopeptidase et  $\beta$ -glucosidase.

| Activité enzymatique   | Gamme étalon                     | Concentration saturante en substrat                       | Mesure de l'activité enzymatique des échantillons | Lecture des échantillons           |
|------------------------|----------------------------------|-----------------------------------------------------------|---------------------------------------------------|------------------------------------|
| Leucine-Aminopeptidase | 7-amino-4-méthyl-coumarine (MCA) | L-Leucine-7-amino-4-méthyl-coumarine (Leu-MCA)            | L-Leucine-7-amino-4-méthyl-coumarine              | Excitation : 380<br>Emission : 440 |
| $\beta$ -D-glucosidase | 4-Méthylumbelliférone (MUF)      | 4-Méthylumbelliféryl $\beta$ -D-glycopyranoside (MUF-Glp) | 4-Méthylumbelliféryl $\beta$ -D-glycopyranoside   | Excitation : 365<br>Emission : 460 |

La réalisation des mesures d'activité enzymatique comprend deux étapes :

- détermination de la concentration saturante en substrat,
- détermination du niveau d'activité enzymatique des échantillons en référence à une gamme étalon de chromophore.

Les différentes gammes de substrats sont réalisées à partir de solutions mères de substrats dissous dans du Méthylcellosolve. Les dilutions successives sont réalisées avec de l'eau distillée.

La concentration saturante en substrat est définie comme la concentration minimale non limitante pour les consortiums bactériens. Cette valeur est estimée graphiquement : elle correspond à la plus forte concentration en substrat utilisée, avant le plateau de saturation de la courbe exprimant le niveau de fluorescence relative en fonction de la concentration en chromophore. Cette concentration saturante, évaluée lors de mesures préliminaires sur des échantillons de sédiment, a été fixée à 1500  $\mu\text{mol/L}$  pour les deux sédiments utilisés. Cette concentration a été ensuite utilisée dans l'ensemble des mesures effectuées au cours de cette étude. Lors de la lecture des échantillons au fluorimètre, la réalisation de tubes stériles permet de s'affranchir du bruit de fond de fluorescence lié à la nature du sédiment. Les unités de fluorescence relatives sont donc calculées par soustraction de ces stériles :

$$\text{UFR (réelle)} = \text{UFR (échantillon)} - \text{UFR (stérile)}$$

La quantité de substrat hydrolysée par les échantillons est déterminée grâce à la gamme étalon. Les tubes Eppendorf sont étuvés 24 heures à 105°C, le poids sec des échantillons de sédiment est déterminé par soustraction du poids des tubes vides au poids de l'ensemble tube + sédiment sec. Les résultats sont exprimés en  $\mu\text{M}$  de substrat hydrolysé par heure et par gramme de sédiment sec.

### 3.7.2. Densité bactérienne

L'estimation de la densité bactérienne des sédiments s'effectue en microscopie à épifluorescence après marquage des bactéries au DAPI (4'-6 diamidino-2-phénylindole dihydrochlorure). Le DAPI est un chromophore fluorescent qui se fixe aux acides nucléiques après diffusion passive dans les cellules bactériennes. Le complexe ADN-DAPI est excité sous UV à 340-380 nm. Le protocole expérimental mis en œuvre figure en annexe 3.

Le nombre total de bactéries est obtenu par l'équation suivante :

$$\text{Nombre de bactéries/g de sédiment frais} = (\text{Sf} \times \text{Ve} \times \text{N} \times \text{D} \times 0,9) / (\text{Sm} \times \text{Vf})$$

Avec : Sf = surface utile du filtre = 176,71 mm<sup>2</sup>

Ve = volume d'extraction = 9 mL

N = nombre de bactéries par champ microscopique prospecté

D = dilution

Sm = Surface du champ microscopique à x 1000 = 0,0314 mm<sup>2</sup>

Vf = volume de filtration = 4,5 mL

Selon Trousselier (1985), il faut retenir la dilution permettant de compter 30 bactéries par champ, et en comptant 300 bactéries la précision finale de la numération est de 10%.

### 3.7.3. Mise en évidence de souches dégradant le pyrène

Les souches dégradant le pyrène sont mises en évidence dans des boîtes de Pétri en verre contenant 30 mL d'un milieu gélosé sur lequel 0,175 mL d'une solution de pyrène dans l'acétone à 2 mg/l a été évaporé. Pour chaque microcosme sacrifié, 0,1 mL de suspension bactérienne diluée 100 et 1000 fois est déposé dans les boîtes de Pétri stérilisées. L'opération est effectuée sous hotte stérile et dans des conditions d'asepsie maximum. Les boîtes sont ensuite mises en incubation à 30°C et à l'obscurité. Une observation régulière des boîtes est réalisée afin de déceler le développement de colonies et la disparition de l'opacité due à la couche de pyrène se trouvant déposée sur le milieu gélosé.